



Självständigt arbete (examensarbete), 15 hp
Kandidatexamen i biomedicinsk laboratorievetenskap
VT 2017

Analys av apoptos hos Docetaxel- och manganbehandlade prostata- cancer celler

Markus Holmquist

Sektionen för lärande och miljö

Populärvetenskaplig sammanfattning

Kampen mot prostatacancer: sökandet efter nya och effektiva behandlingsalternativ

Prostatacancer tillhör den form av cancer som i Sverige är vanligast förekommande hos män, i synnerhet äldre män. Behandlingsalternativen varierar beroende på den drabbade mannens hälsa, ålder och tumörens karaktär. Vid en icke-aggressiv och långsamväxande variant kan aktiv monitorering vara tillräcklig, då patienten kontrolleras med jämna mellanrum för att övervaka tumören. Andra behandlingsformer inkluderar strålning och prostatektomi där hela prostatan, och därmed den inkapslade tumören, avlägsnas. Svårare former kan innebära att hormonbehandlingar kommer att ingå som en del av behandlingsstrategin. Syftet är att minska halten testosteron i kroppen, eftersom tumörcellerna behöver testosteron för tillväxt och överlevnad. Dessvärre utvecklas ofta en cancerform som slutar att svara på hormonbehandlingar, kastrationsresistent prostatacancer (CRPC), vilken är obotlig och har dålig prognos. Förstahandsval av läkemedel vid CRPC är cytostatikan Docetaxel som tumörcellerna med tiden dock kommer utveckla resistens mot. Då Docetaxel är ett av få verksamma läkemedel vid CRPC föreligger ett behov av att utveckla kombinationsbehandlingar med denna cytostatika i syfte att förbättra effekten. I detta fall kan mangan vara en lämplig kandidat; det är billigt, det är vanligt förekommande, och tidigare studier har visat att i tillräcklig hög koncentration har ämnet en förmåga att få celler att genomgå en kontrollerad celledöd, apoptos. Det är därför möjligt att Docetaxel tillsammans med mangan i framtiden skulle kunna innebära en behandling som är kraftfullare, men samtidigt billigare och med färre biverkningar för patienten.

Traditionellt ställs apoptos mot begreppet nekros. En cell i apoptos dör under ordnade förhållanden, och tas om hand av kroppen. En cell i nekros dör däremot ofta under dramatiska omständigheter och kommer att lyseras, det vill säga spricka. Cellens innehåll läcker därmed ut och orsakar ett inflammatoriskt gensvar från kroppens immunsystem. Det är därför viktigt att behandlingar som ska avdöda cancerceller gör det via apoptos för att undvika att orsaka större skada hos patienten.

Syftet med denna studie var att undersöka om Docetaxel i kombination med mangan kunde medföra att en större andel prostatacancer celler går i apoptos jämfört med obehandlade celler. Cellerna odlades och behandlades i olika tidsintervall, för att sedan infärgas med ämnena Annexin V och propidiumjodid (PI). Beroende på hur cellen mår, kommer den märkas in i

olika kombinationer av Annexin V och PI. Med hjälp av analysapparaten flödescytometer kan cellerna beroende på sin infärgning sorteras i tidig apoptos, sen apoptos samt nekros. Resultaten visade att det sker en ökning av apoptos hos kombinationsbehandlade celler, men det gick inte att helt säkert avgöra om denna ökning faktiskt berodde på behandlingen eller om det var slumpen som spelade in. Av denna anledning kan det vara intressant att i framtiden upprepa försöket fast med högre koncentrationer av Docetaxel och mangan för att se om den apoptotiska effekten blir större. Dessutom skulle det vara av värde att använda sig av andra analysmetoder som inte bara visar att cellerna går i apoptos, utan även hur de går i apoptos. Dessa framtida studier skulle i sådana fall kunna ta forskningen ytterligare ett litet steg närmare en behandlingsform som kan hjälpa miljoner män världen över.

Författare

Markus Holmquist

Titel

Analys av apoptos hos Docetaxel- och manganbehandlade prostatacancer celler

Handledare

Helena Tassidis, Dr Medicinsk vetenskap, Leg. BMA

Examinator

Bodil Hernroth, Prof Biomedicinsk laboratorievetenskap, Leg. BMA

Sammanfattning

Prostatacancer är idag den vanligaste cancerformen i Sverige, och drygt 10 000 män årligen blir diagnostiserade med sjukdomen. En obotlig variant med dödlig utgång är kastrationsresistent prostatacancer som behandlas primärt med Docetaxel. Tumör cellerna utvecklar dock med tiden resistens mot cytostatikan, och det föreligger därför ett stort behov av att utveckla kombinationsbehandlingar med Docetaxel som grund. Mangan har i flera studier visat sig kunna inducera apoptos hos olika celltyper, och är därför intressant som ett möjligt komplement till Docetaxelbehandling. Syftet med studien var att analysera apoptos hos prostatacancer celler från cellinjen PC3 som exponerats för Docetaxel i kombination med mangan. Cellerna odlades och behandlades med Docetaxel i kombination med mangan under 24, 48 och 72 timmar. Analys av apoptos utfördes med flödescytometer efter infärgning med Annexin V och propidiumjodid. Beroende på cellernas tillstånd färgas de in i olika kombinationer och kan därmed detekteras som tidigt respektive sent apoptotiska, eller som nekrotiska. Resultaten visade på en ökning av apoptos hos kombinationsbehandlade celler, men ingen signifikant skillnad förelåg i jämförelse med obehandlade celler. Ytterligare försök bör därför upprepas med ökad koncentration av Docetaxel i kombination med olika koncentrationer av mangan, och även med andra prostatacancer cellinjer såsom DU145 och LnCaP. Dessutom bör analyser av apoptotiska markörer genomföras, i syfte att bekräfta apoptos.

Ämnesord: PC3, Docetaxel, mangan, apoptos, Annexin V, propidiumjodid

Analysis of apoptosis in prostate cancer cells treated with docetaxel and manganese**Abstract**

Prostate cancer is the most common form of cancer in Sweden today, and approximately 10 000 men are diagnosed on a yearly basis. The castration-resistant prostate cancer is an incurable and deadly variant, treated primarily with Docetaxel. The tumour cells will with time, however, develop a resistance against the cytostatics, which implies the need for the development of combination therapies with Docetaxel. In several studies, manganese has been shown to induce apoptosis in different types of cells, and this makes it interesting as a possible complement to Docetaxel therapy. The aim of this study was to analyze apoptosis in prostate cancer cells from the cell line PC3, exposed to Docetaxel in combination with manganese. The cells were cultivated and treated with Docetaxel in combination with manganese for 24, 48 and 72 hours, respectively. Analysis of apoptosis was performed via flow cytometry after staining of the cells with Annexin V and propidium iodide. Depending on the state of the cells, they are stained in different combinations which allows for detection of early or late apoptotic, and necrotic, cells. The results showed an increase in apoptosis regarding cells treated with a combination of Docetaxel and Manganese, but no significant difference from untreated cells was to be found. Therefore, this experiment should be repeated with a higher dose of Docetaxel, with different concentrations of manganese, and with other prostate cancer cell lines, such as DU145 and LnCaP. Furthermore, analysis of apoptotic markers should be performed in order to confirm apoptosis.

Keywords: PC3, docetaxel, manganese, apoptosis, Annexin V, propidium iodide

Innehållsförteckning

1. Inledning.....	6
2. Material och metod.....	9
2.1 Cellodling	9
2.2 Cellbehandling	9
2.3 Flödescytometrisk analys	10
2.4 Statistisk analys	10
3. Resultat.....	10
4. Diskussion	12
5. Slutsatser	14
Tackord.....	14
Referenser.....	15

1. Inledning

Prostatacancer är globalt sett den näst vanligaste cancerformen hos män (World Health Organisation (WHO), 2014) med 1,1 miljon diagnostiserade fall år 2012 (Ferlay et al, 2014). I Sverige är sjukdomen den vanligaste cancerformen och drabbar främst äldre män där uppskattningsvis hälften av de insjuknade är över 70 år (Cancerfondsrapporten, 2017; Hägglöf & Bergh, 2012). Riskfaktorerna omfattar huvudsakligen ålder, familjär förekomst, etnicitet, samt genetisk disposition där exempelvis mutationer i generna *BRCA1* och *BRCA2* har associerats till aggressivare former av prostatacancer (Lavery et al, 2015). Prostata är en körtel placerad under urinblåsan och som omsluter urinröret (Timms, 2008). Körtelns primära funktion är produktion och utsöndring av sekret som utgör merparten av sädesvätskan. Utifrån morfologi och funktion kan prostata delas in i tre zoner, där 95 % av prostatacancern utgår som adenocarcinom från de glandulära perifera och periuretrala zonerna medan mindre vanliga varianter inkluderar sarkom och neuroendokrina tumörer (Costello & Franklin, 2016; Pullar & Shah, 2016; Grignon, 2004). Sjukdomens karaktär varierar från långsamt växande till att vara mycket aggressiv. Prognosen är därför beroende av stadium, tumörgrad och patientens ålder och generella hälsa. För patienter med lokaliserad och låggradig tumörutveckling är prognosen god då över 90 % beräknas överleva 5 år (Cooper & Linch, 2016) medan den metastaserande formen idag inte har någon bot (Hägglöf & Bergh, 2012).

Behandling utgår från faktorer såsom cancers stadium och patientens allmänna hälsa och ålder. Vid lokaliserad lågriskcancer kan så kallad aktiv övervakning vara tillräcklig, där patienten kontrolleras regelbundet. Andra alternativ innefattar strålbehandling, prostatektomi då hela körteln avlägsnas eller hormonbehandlingar (Damber & Aus, 2008).

Prostatacancer cellerna behöver testosteron för tillväxt och överlevnad, och målet med hormonbehandlingen är därmed att reducera testosteronhalten genom kirurgisk eller kemisk kastrering (Kirby & Madhavan, 2010). Alternativt genomgår patienten antiandrogenterapi där en variant syftar till en signalblockering av de adrenogenreceptorer med hög affinitet för testosteron (Knudsen & Scher, 2009). Behandlingarna visar initialt god effekt, men efter 2–3 år utvecklar cancer cellerna resistens och sjukdomen fortskrider trots fortsatt hormonterapi. Detta stadium är känt som kastrations-resistent prostatacancer (CRPC). Den metastaserande formen av CRPC är obotlig och har dålig prognos där den genomsnittliga överlevnadstiden ligger runt 16 till 18 månader (Karantanos et al, 2013).

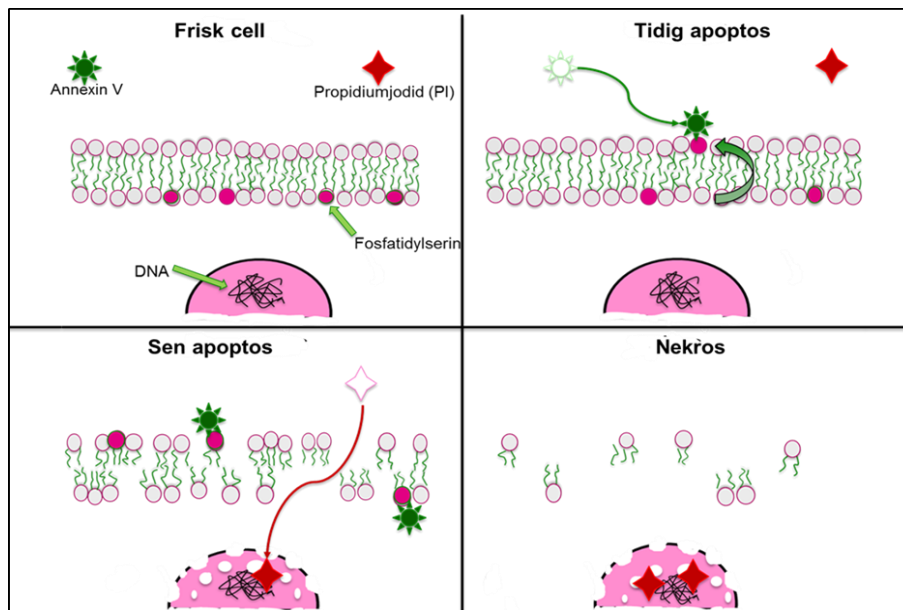
Vid CRPC blir det ofta aktuellt med cytostatikabaserad behandling. Förstahandsvalet är Docetaxel, som tillhör läkemedelsgruppen taxaner. Utmärkande för Docetaxel som cytostatika är dess farmakodynamiska förmåga att hyperstabilisera mikrotubuli (Montero et al, 2005). Mikrotubuli består av mindre funktionella heterodimera enheter, alfa- och beta-tubulin, och fyller ett flertal centralt viktiga funktioner i cellen såsom under celldelning (Andreopoulou & Muggia, 2008). Docetaxel verkar dels genom stimulering av fritt tubulin till bildning av mikrotubuli, och dels genom att förhindra dissociation av nämnda mikrotubuli (McKeage, 2012). De stabila och icke-fungerande komplexen av mikrotubuli resulterar i förhindrandet av mitos genom cellcykel-arrest i G2/M-fasen med apoptos som följd (Andreopoulou & Muggia, 2008). Dessvärre svarar inte alla patienter mot denna behandling, och hos de individer där Docetaxel ger effekt utvecklas med tiden resistens mot behandlingsformen (Lorente & De Bono, 2014). I sin studie pekar Antonarakis & Armstrong (2011) på ett flertal mekanismer som föreslås ligga bakom resistensen, däribland effluxpumpar som medför en lägre cellulär koncentration av läkemedel, och strukturella förändringar av mikrotubuli med lägre affinitet för Docetaxel. Sammantaget resulterar resistensen i en minskad verkningsgrad. Docetaxel var den första cytostatikan med dokumenterad klinisk effekt mot CRPC och är idag standardvalet för behandling (Hwang, 2012). Av denna anledning föreligger ett stort intresse och ett behov av att utveckla nya behandlingsmetoder med just Docetaxel som grundkomponent.

Försök utförda på Högskolan Kristianstad (HKR) med mangan, separat och i kombination med Docetaxel, syftade till att undersöka påverkan på prostatacancer celler från olika prostatacancer cellinjer (opublicerat data). Resultaten visade att cellviabiliteten minskade under exponering av mangan, både enskilt och tillsammans med Docetaxel. Mangan är ett vanligt och naturligt förekommande ämne i naturen (Das et al, 2014). Det är som spårämne essentiellt och innehar flera nyckelroller såsom kofaktor i flertalet enzymatiska reaktioner och i metabolismen för lipider, kolhydrater och proteiner (Takeda, 2004). Mangan upptas vanligtvis oralt genom föda eller genom inhalation (O'Neal & Zheng, 2015). Överexponering av ämnet och dess neurotoxiska effekter är väl dokumenterat sedan 1837 då sjukdomen manganism beskrevs för första gången (Michalke & Fernsebner, 2014). Det neurodegenerativa tillståndets symtom liknar de hos Parkinson-patienter med tremor, bradykinesi (förlångsammade rörelser) och stelhet (Kwakye et al, 2014). På det cellulära planet har mangan visats inducera apoptos hos olika celltyper, såsom humana B-celler, neurala stamceller och NIH3T3-celler (El Mchichi et al, 2007; Tamm et al, 2008; Oubrahim et al, 2002). Mangan har även observerats ha en apoptotisk effekt på hematopoietiska

stamceller hos havskräfta (Oweson et al, 2006). Dessa egenskaper tillsammans med ett kostnadsperspektiv gör mangan intressant som ett potentiellt komplement till Docetaxelbehandlingen.

Apoptos är en genetisk kodad funktion vilken tillåter celler att genomgå en programmerad form av celldöd. Mekanismen är en grundläggande förutsättning för flercelliga organisms utveckling då skadade, gamla eller infekterade celler avlägsnas under kontrollerade former (Portt et al, 2011). Genom denna process minskar risken att sådana celler påverkar eller stör normala funktioner i organismen. Vid många patologiska tillstånd, i synnerhet cancer, har cellerna förlorat förmågan att genomgå apoptos vilket leder till en okontrollerad celldelning (Mohammad et al, 2015). Mot apoptos ställs av tradition nekros, en okontrollerad celldöd som följer efter något slags trauma, såsom toxisk påverkan eller fysisk skada (Nikoletopoulou et al, 2013; Edinger & Thompson, 2004). Den nekrotiska cellen lyserar och det intracellulära innehållet läcker ut vilket orsakar ett inflammatoriskt gensvar (Golstein & Kroemer, 2007). Detektion av apoptotiska respektive nekrotiska celler kan utföras med infärgning av Annexin V och propidiumjodid (PI), följt av analys med flödescytometer. Det fluorokrom-konjugerade proteinet Annexin V har hög affinitet för fosfolipiden fosfatidylserin (FS) medan propidiumjodid interkalerar med DNA i cellkärnan. Hos friska celler förekommer FS enbart på den cytosoliska sidan av cellmembranet som dessutom är impermeabelt för Annexin V och PI. Friska celler färgas därför inte. Vid tidig apoptos translokaliseras FS till den extracellulära membransidan varpå Annexin V tillåts binda in. Senare apoptos medför en uppluckring av cellmembranen vilket möjliggör för interaktion mellan DNA och PI, och Annexin V kan därutöver även binda in till FS på den cytosoliska membransidan. Dessa celler blir därför dubbelfärgade. Vid nekrotiskt tillstånd sker ett fortsatt bortfall av membranen, och infärgning med PI dominerar. De olika infärgningskombinationerna möjliggör därmed en bedömning av apoptosgrad och nekros hos analyserade celler (figur 1).

Syftet med denna studie var att med flödescytometrisk analys undersöka apoptos hos mangan- och Docetaxelbehandlade prostatacancer celler från cellinjen PC3 med hjälp av infärgning med Annexin V och propidiumjodid.



Figur 1. Schematisk illustration över infärgning med Annexin V och propidiumjodid (PI). Annexin V har hög affinitet för fosfatidylserin medan propidiumjodid interkalerar med DNA i cellkärnan. (Markus Holmquist).

2. Material och metod

2.1 Cellodling

Till studien användes humana prostatacancer celler från cellinjen PC3, erhållna från Högskolan Kristianstad (HKR). Cellerna odlades i Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco) med tillsatt 10 % Fetal Calf Serum (FCS) och 1 % penicillin-streptomycin (PenStrep (10,000 units of penicillin, 10,000 µg av streptomycin); Gibco) i 5 % CO₂ vid 37°C. Cellantalet till försöken beräknades med Bürkers kammare där 500 000 celler såddes ut i 6 cm petriskålar (Sarstedt, Tyskland) i komplett medium, de inkuberades sedan över natt för att tillåtas fästa upp. Vid behandling byttes medium till DMEM med 5 % FCS och utan antibiotika.

2.2 Cellbehandling

Hundra millimolar mangan spädades med HEPES-buffert (10 mM HEPES; 0,14 M NaCl, pH 7,6) till en slutkoncentration på 5 mM. Docetaxel spädades med 100 % dimetylsulfoxid (DMSO; Sigma Aldrich, MO, USA) till en slutkoncentration på 500 nM. Inför behandlingarna dekanterades mediet, och cellerna tvättades en gång med sterilt D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, utan CaCl₂ och MgCl₂; Gibco) innan nytt medium kompletterat

med 5 % FCS tillsattes. Cellerna behandlades med Docetaxel och mangan, var för sig och i kombination, som utspätt i mediet gav koncentrationerna 10 nM respektive 50 μ M, och inkuberades under 24, 48 och 72 timmar i 5 % CO₂ vid 37 °C. Som kontroll användes vid samtliga tider obehandlade celler med tillsatt dimetylsulfoxid (DMSO, 0,2%).

2.3 Flödescytometrisk analys

Analys av eventuell inducerad apoptos efter infärgning med Annexin V Apoptosis Detection Kit FITC (eBioscience, CA, USA) utfördes med flödescytometer NovoCyte (ACEA Biosciences Inc, San Diego). Mediet med eventuellt döda celler samt trypsinerade celler från respektive platta överfördes till 12x75mm-rör (Sarstedt, Tyskland) och centrifugerades därefter i 500xg under 5 minuter i RT (Beckman Avanti J-20, Fullerton). Supernatanten avlägsnades och cellerna tvättades i D-PBS en gång och därefter en tvätt i 200 μ l bindingbuffer (1X, eBioscience, USA). Cellerna resuspenderades i 100 μ l bindingbuffer och 5 μ l Annexin V (eBioscience, USA) tillsattes och inkuberades mörkt i 15 min vid RT. Efter inkubering tillsattes 200 μ l bindingbuffer 1X och rören centrifugerades i 500xg under 5 minuter i RT. Supernatanten dekanterades, och cellerna resuspenderades i 200 μ l bindingbuffer, 5 μ l PI tillsattes innan analys med flödescytometer som utfördes med ett tröskelvärde på 150 000 och en flödeshastighet på 33 μ l/min.

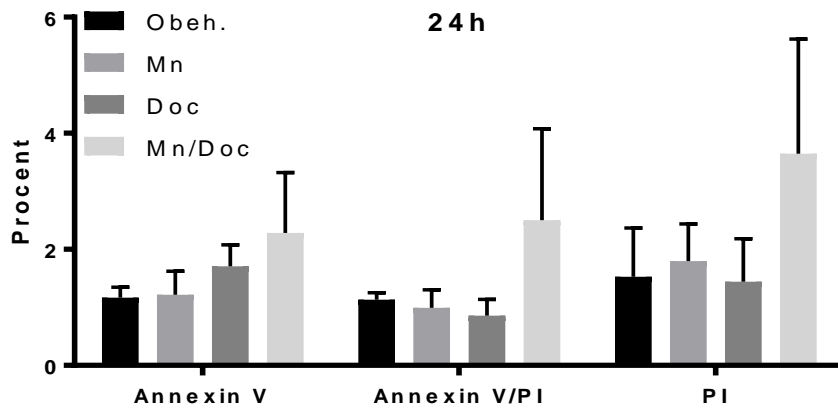
2.4 Statistisk analys

Statistisk analys utfördes med tvåvägs-ANOVA (GraphPad Prism 7 (trial), GraphPad Software Inc, CA, USA) där de oberoende variablerna utgjordes av behandling och tid från fem oberoende försök.

3. Resultat

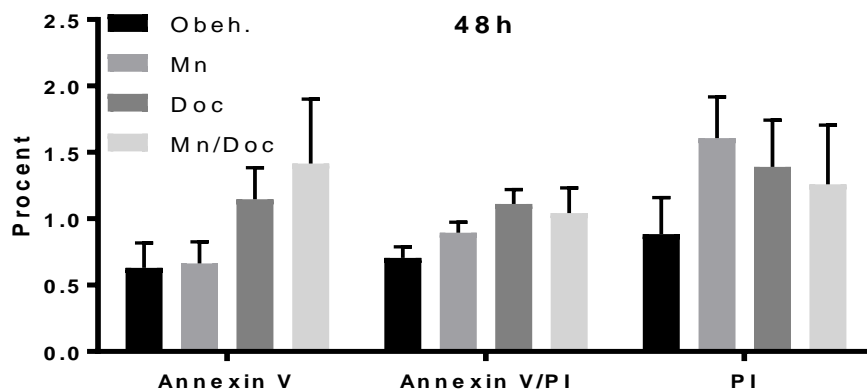
Totalt analyserades fem kompletta behandlingsomgångar (n=5). Statistisk analys med tvåvägs ANOVA visade ingen signifikant skillnad mellan behandlingarna, oavsett behandlingsform eller exponeringstid. Celler i tidig apoptos infärgas enbart med Annexin V, infärgning med både Annexin V och PI motsvarar sen apoptos, och infärgning med PI indikerar nekros. Resultaten efter 24 timmars behandling visade en succesiv ökning av tidig apoptos på uppskattningsvis 1–2 procentenheter vid behandling med Docetaxel och vid kombinationsbehandling med mangan, jämfört med obehandlade celler. En procentuell ökning av sen apoptos observerades enbart vid kombinationsbehandling med mangan (2

procentenheter), och en marginell ökning av nekros sågs hos manganbehandling och kombinationsbehandling, jämfört med obehandlade celler (0,5–2 procentenheter) (figur 2).



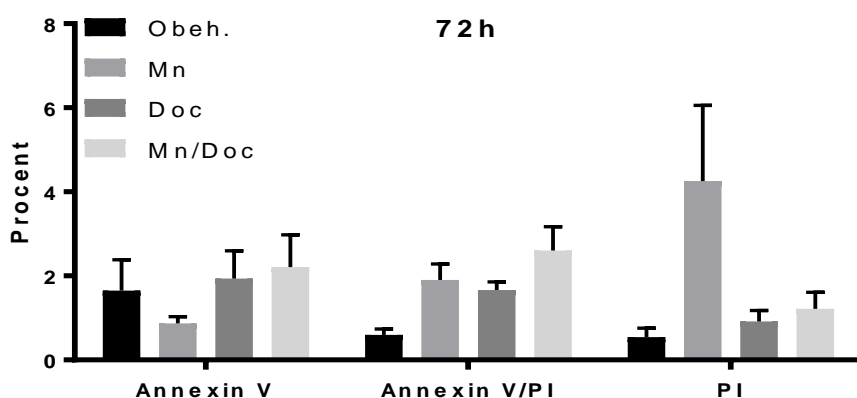
Figur 2. PC3-celler efter 24 timmars behandling med Docetaxel (10 nM) och mangan (50 μM), var för sig och i kombination. Medelvärde och standardavvikelse av samtliga behandlingsomgångar (n=5). Annexin V = tidig apoptos, Annexin V/PI = sen apoptos, PI = nekros.

Efter 48 timmar sågs vid kombinationsbehandling (Mn/Doc) en ökning av tidig apoptos på cirka 0,5–1 procentenheter, och även sen apoptos på 2 procentenheter observerades, jämfört



Figur 3. PC3-celler efter 48 timmars behandling med Docetaxel (10 nM) och mangan (50 μM), var för sig och i kombination. Medelvärde och standardavvikelse av samtliga behandlingsomgångar (n=5). Annexin V = tidig apoptos, Annexin V/PI = sen apoptos, PI = nekros.

med kontrollen. Vid nekros ses en marginell ökning av samtliga behandlingar (figur 3). Efter 72 timmar avtar ökningen av tidig apoptos och nekros för Docetaxelbehandlingen respektive kombinationsbehandlingen, medan manganbehandlingen visade störst nekrotisk påverkan med cirka 4 procentenheter, jämfört med obehandlade celler. En marginell ökning av sen apoptos kunde ses efter alla behandlingar (figur 4).



Figur 4. PC3-celler efter 24 timmars behandling med Docetaxel (10 nM) och mangan (50 μ M), var för sig och i kombination. Medelvärde och standardavvikelse av samtliga behandlingsomgångar (n=5). Annexin V = tidig apoptos, Annexin V/PI = sen apoptos, PI = nekros

4. Diskussion

Cancer celler, liksom friska celler, genomgår ett naturligt åldrande och kommer således gå i apoptos på naturlig väg. Detta kan därmed bidra till en naturlig apoptos utöver den apoptos som orsakats av behandlingarna och på så sätt verka till större variationer mellan behandlingsomgångarna. En stor andel nekrotiska celler observerades dessutom i behandlingsomgångarna. Preanalytiska faktorer kan ha en inverkan då cellerna utsätts för stress via trypsinering, centrifugering och infärgning vilket kan leda till att celler som är i apoptotisk fas går sönder och kan då analyseras som nekrotiska eller som debris. Propidiumjodid innehar cytotoxiska egenskaper, och kan även upptas av viabla celler efter tillräckligt lång inkubationstid (Henry et al, 2013), och även infärgning med Annexin V har setts ha toxisk effekt på cellerna vid tidigare analyser på laboratoriet. Det är därför troligt att den nekrotiska populationen är överrepresenterad och dessutom hindrar detektion av tidigt

apoptotiska celler (enbart färgning med Annexin V). Inför framtida försök bör därför inkuberingsstid med propidiumjodid och Annexin V hållas minimal.

Inga publicerade studier finns vad gäller prostatacancer celler som exponerats för Docetaxel i kombination med mangan. Däremot har Docetaxel visats kunna påverka cellviabiliteten negativt, och även kunna inducera apoptos hos PC3-celler under varierande exponeringstid. I sin studie kan Heinemann et al (2011), efter infärgning med Annexin V och PI och flödescytometrisk analys, visa på en ökning av apoptos på 5–7% hos PC3-celler som behandlats med 20 nM Docetaxel efter 24 timmar, och en lika stor ökning efter 48 timmar. Freitas et al (2011) undersökte PC3-celler som behandlats med 100 nM Docetaxel och natriumselenit, enskilt och i kombination, under 24 timmar. Behandling enbart med Docetaxel följt av flödescytometrisk analys efter infärgning med Annexin V och PI resulterade i en ökad apoptos (Annexin V + Annexin V/PI) på ca 15 %. Appliceras dessa resultat på erhållna resultat i denna studie där en mindre koncentration på 10 nM Docetaxel använts är en apoptotisk effekt på ca 2 procentenheter efter 24 och 48 timmar rimligt. Detta påvisar även att behandlingens effekt är dosberoende, och att behandling med högre koncentrationer av Docetaxel därför bör medföra en högre grad av apoptos hos PC3-celler. Olika cellinjer uppvisar också varierad känslighet för Docetaxel. Morse et al visade i sin studie (2005) att bröstcancer celler (MCF-7, MDA-mb-231) som exponerats för 10 nM Docetaxel under 48 timmar uppvisade en marginell ökning men inte någon signifikant skillnad i tidig apoptos jämfört med kontrollen. Detta överensstämmer med vårt resultat, och kan innebära att PC3-celler har minskad sensitivitet för Docetaxel jämfört med andra cellinjer. Samtidigt är PC3-celler mer känsliga för Docetaxel i jämförelse med prostatacancer celler från cellinjerna DU145 och LnCaP (Galaup et al, 2003). Framtida försök bör därför inkludera olika cellinjer, i synnerhet DU145 och LnCaP, för att utreda huruvida någon skillnad i känslighet kan föreligga.

Mangans effekt på cellviabilitet och apoptos hos olika celltyper har dokumenterats tidigare (Oubrahim et al, 2001; Park & Park, 2010; Yoon et al, 2011). Mangan har visats inducera apoptos hos humana bronkepitelceller (16HBe) behandlade med en koncentration på 0,375 mM. Flödescytometrisk analys efter Annexin V/PI-infärgning resulterade i en ökning på 10,1 % och 24,8 % efter 24 respektive 48 timmars exponering (Zhang et al, 2013). Yan et al (2010) undersökte mangans effekt på neuroblastomceller (SH-SY5Y), där en koncentration på 0,5 mM efter 18 timmars exponering inducerade apoptos på 30–35% hos cellerna. I vår studie behandlades cellerna med en lägre koncentration mangan (50 µM), varför en maximal

apoptotisk effekt (Annexin + Annexin V/PI) på drygt 3 procentenheter är rimligt. Samtidigt kunde en uttalad ökning av nekros efter 72 timmar konstateras. Anledningen till detta kan vara faktorer som beskrivna ovan. Eventuella variationer i resultat kan också bero på att olika Annexin V och PI ingått i respektive studie, samt att analys av data från flödescytometri utförts subjektivt. De sammanlagda resultaten från dessa studier och vår studie pekar dock mot att manganbehandlingen, liksom hos Docetaxel, är dosberoende. Sammantaget skulle det därför vara intressant att upprepa detta försök med ökad koncentration av Docetaxel och i kombination med mangan i olika koncentrationer, och därutöver med olika cellinjer. Detta för att observera om någon skillnad föreligger mellan olika cellinjer, i synnerhet mellan cancercellinjerna PC3, DU145 och LnCaP.

De bakomliggande mekanismerna till hur mangan inducerar apoptos är inte helt fastställda, men det finns vissa studier som analyserat olika kaspaser. Schrantz et al (1999) visar att mangan inducerar apoptos hos humana B-celler via olika kaspaser (kaspas 1 och 3). Detta stöds av El Mchichi et al (2007) där lymfoma B-celler genomgick apoptos via kaspas 8- och 3-beroende mitokondriell aktivering. Däremot finns inga studier som visar mangans påverkan på epitelceller och framtida analyser av kaspasaktiviteten och dess roll i dessa celler är därför av stor vikt för förståelse av manganinducerad apoptos.

5. Slutsatser

Erhållna resultat från denna studie visade på en ökning av apoptos hos prostatacancer celler som behandlats med Docetaxel i kombination med mangan. Kombinationsbehandlings apoptotiska inverkan visade dock ingen signifikant skillnad i jämförelse med obehandlade celler. Fler försök bör därför upprepas med en högre koncentration av Docetaxel i kombination med olika koncentrationer av mangan. Även andra cellinjer, i synnerhet DU145 och LNCaP, bör ingå i försöken för att studera eventuella skillnader i känslighet. Dessutom bör kompletterande analyser av olika apoptotiska signalvägar, såsom kaspasisk aktivitet, också utföras i syfte att bekräfta apoptos hos behandlade celler.

Tackord

Jag vill rikta ett stort tack till min handledare Helena Tassidis, för all stöttning och värdefull vägledning i såväl det laborativa som det skriftliga arbetet.

Referenser

- Andreopoulou, E. & Muggia, F. (2008). Pharmacodynamics of Tubulin and Tubulin-Binding Agents: Extending Their Potential Beyond Taxanes. *Clinical Breast Cancer*, 8, ss. 54–60.
- Antonarakis, E.S. & Armstrong, A.J. (2011). Evolving standards in the treatment of docetaxel-refractory castration-resistant prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 14(3), ss. 192–205.
- Cancerfonden (2017). *Cancerfondersrapporten 2017*. Stockholm: Cancerfonden.
<http://res.cloudinary.com/cancerfonden/image/upload/v1491294472/documents/cancerfondersrapporten-2017.pdf>
- Cooper, S. & Linch, M. (2016). Prostate cancer. *InnovAiT*, 9(5), ss. 275–283.
- Costello, L.C. & Franklin, R.B. (2016). A comprehensive review of the role of zinc in normal prostate function and metabolism; and its implications in prostate cancer. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 611, ss 100–112.
- Damber, J-E. & Aus, G. (2008). Prostate cancer. *The Lancet*, 371(9625), ss. 1710–1721.
- Das, A.P., Ghosh, S., Mohanty, S. & Sukla, L.B. (2014) Consequences of manganese compounds: a review. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 96(7), ss. 981–997.
- Edinger, A.L. & Thompson, C.B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(6), ss. 663–669.
- El Mchichi, B., Hadji, A., Vazquez, A. & Leca, G. (2007). p38 MAPK and MSK1 mediate caspase-8 activation in manganese-induced mitochondria-dependent cell death. *Cell Death and Differentiation*, 14(10), ss. 1826–1836.
- Ferley, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D. & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), ss. 369–386.
- Freitas, M., Alves, V., Sarmiento-Ribeiro, A.B. & Mota-Pinto, A. (2011). Combined effect of sodium selenite and Docetaxel on PC3 metastatic prostate cancer cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 408(4), ss. 713–719.
- Galaup, A., Opolon, P., Bouquet, C., Li, H., Opolon, D., Bissery, M-C, Tursz, T., Perricaudet, M. & Griscelli, F. (2003). Combined effects of docetaxel and angiostatin gene therapy in prostate tumor model. *Molecular Therapy*, 7(6), ss. 731–740.
- Golstein, P. & Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), ss. 37–43.
- Grignon, D.J. (2004). Unusual subtypes of prostate cancer. *Modern Pathology*, 17(3), ss. 316–327.

- Heinemann, L., Simpson, G.R., Boxall, A., Kottke, T., Relph, K.L., Vile, R., Melcher, A., Prestwich, R., Harrington, K.J., Morgan, R. & Pandha, H.S. (2011). Synergistic effects of oncolytic reovirus and docetaxel chemotherapy in prostate cancer. *BMC Cancer*, 11(1), ss. 221–229.
- Henry, C.M., Hollville, E. & Martin, S.J. (2013). Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods*, 61(2), ss. 90–97.
- Hwang, C. (2012). Overcoming docetaxel resistance in prostate cancer: a perspective review. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 4(6), ss. 329–340.
- Hägglöf, C. & Bergh, A. (2012). The Stroma – A Key Regulator in Prostate Function and Malignancy. *Cancers*, 4(2), ss. 531–548.
- Karantanos, T., Corn, P.G. & Thompson, T.C. (2013). *Oncogene*, 32(49), ss. 5501–5511.
- Kirby, R. & Madhavan, S.G. (2010). Prostate cancer. *Surgery (Oxford)*, 28(12), ss. 594–598.
- Knudsen, K. & Scher, H.I. (2009). Starving the Addiction: New Opportunities for Durable Suppression of AR Signaling in Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*, 15(15), ss. 4792–4798.
- Kwakye, G.F., Paoliello, M.M.B., Mukhopadhyay, S., Bowman, A.B. & Aschner, M. (2015). Manganese-Induced Parkinsonism and Parkinson's Disease: Shared and Distinguishable Features. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(7), ss. 7519–7540.
- Lavery, A., Kirby, R.S. & Chowdhury, S. (2016). Prostate Cancer. *Medicine*, 44(1), ss. 47–51.
- Li, Y., Sun, L., Cai, T., Zhang, Y., Lv, S., Wang, Y. & Ye, L. (2010). α -Synuclein overexpression during manganese-induced apoptosis in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Brain Research Bulletin*, 81(4), ss. 428–433.
- Lorente, D. & De Bono, J.S. (2014). Molecular alterations and emerging targets in castration resistant prostate cancer. *European Journal of Cancer*, 50(4), ss. 753–764.
- McKeage, K. (2012). Docetaxel. *Drugs*, 72(11), ss. 1559–1577.
- Michalke, B. & Fernsebner, K. (2014). New insights into manganese toxicity and speciation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 28(2), ss. 106–116.
- Mohammad, R.M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H.Y., Lin, L.T., Siegelin, M.D., Fimognari, C., Kumar, N.B., Dou, Q.P., Yang, H.J., Samadi, A.K., Russo, G.L., Spagnuolo, C., Ray, S.K., Chakrabarti, M., Morre, J.D., Coley, H.M., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A.G., Amedei, A., Niccolai, E., Amin, A., Ashraf, S.S., Helferich, W.G., Yang, X.J., Boosani, C.S., Guha, G., Bhakta, D., Ciriolo, M.R., Aquilano, K., Chen, S., Mohammed, S.I., Keith, W.N., Bilsland, A., Halicka, D., Nowsheen, S. & Azmi, A.S. (2015). Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 35, ss. 78–103.

- Montero, A., Fossella, F., Hortobagyi, G. & Valero, V. (2005). Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. *The Lancet Oncology*, 6(4), ss. 229–239.
- Morse, D.L., Gray, H., Payne, C.M. & Gilles, R.J. (2005). Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4(10), ss. 1495–1504.
- Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K. & Tavernarakis, N. (2013). Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *BBA – Molecular Cell Research*, 1833(12), ss. 3448–3459
- O’Neal, S. & Zheng, W. (2015). Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in Review. *Current Environmental Health Reports*, 2(3), ss. 315–328.
- Oubrahim, H., Boon Chock, P. & Stadtman, E.R. (2001). Mitochondria play no roles in Mn(II)-induced apoptosis in HeLa cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(17), ss. 9505–9510.
- Oubrahim, H., Boon Chock, P. & Stadtman, E.R. (2002). Manganese(II) Induces Apoptotic Cell Death in NIH3T3 Cells via a Caspase-12-dependent Pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 277(23), ss. 20135–20138.
- Oweson, C.A.M., Baden, S.P. & Hernroth, B.E. (2006). Manganese induced apoptosis in haematopoietic cells of *Nephrops norvegicus* (L.). *Aquatic Toxicology*, 77(3), ss. 322–328.
- Park, E-J. & Park, K. (2010). Induction of oxidative stress and inflammatory cytokines by manganese chloride in cultured T98G cells, human brain glioblastoma cell line. *Toxicology in vitro*, 24(2), ss. 472–479.
- Portt, L., Norman, G., Clapp, C., Greenwood, M. & Greenwood, M.T. (2011). Anti-apoptosis and cell survival: A review. *BBA – Molecular Cell Research*, 1813(1), ss. 238–259.
- Pullar, B. & Shah, N. (2016). Prostate cancer. *Surgery (Oxford)*, 34(10), ss. 505–511.
- Schranz, N., Blanchard, D.A., Mitenne, F., Auffredou, M.T., Vazquez, A. & Leca, G. (1999). Manganese induces apoptosis of human B cells: caspase-dependent cell death blocked by Bcl-2. *Cell Death and Differentiation*, 6(5), ss. 445–453.
- Tamm, C., Sabri, F. & Ceccatelli, S. (2008). Mitochondrial-Mediated Apoptosis in Neural Stem Cells Exposed to Manganese. *Toxicological Sciences*, 101(2), ss. 310–320.
- Takeda, A. (2003). Manganese action in brain function. *Brain Research Reviews*, 41(1), ss. 79–87.
- Timms, B.G. & Hofkamp L.E. (2011). Prostate development and growth in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation*, 82(4–5), ss. 173–183.
- World Health Organisation (WHO) (2014). *World Cancer Report 2014*. Geneva, WHO Press. <http://publications.iarc.fr/Non-Series-Publications/World-Cancer-Reports/World-Cancer-Report-2014>

Yoon, H., Kim, D-S., Lee, G-H., Kim, K-W., Kim, H-R. & Chae, H-J. (2011). Apoptosis Induced by Manganese on Neuronal SK-N-MC Cell Line: Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Mitochondria Dysfunction. *Environmental Health and Toxicology*, 26, ss. e2011017.

Zhang, L., Sang, H., Liu, Y. & Li, J. (2013). Manganese activates caspase-9-dependent apoptosis in human bronchial epithelial cells. *Human and Experimental Toxicology*, 32(11), ss. 1155–1163.