

# Vplyv BAF<sup>®</sup> na bunkovú líniu multiformného glioblastómu

**Hatok J., Škovierová H., Blahovcová E., Murín R.**

*Ústav lekárskej biochémie, Jesseniova lekárska fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Malá Hora 4, 036 01 Martin, SLOVENSKO*

## **Abstrakt**

Multiformný glioblastóm (GBM) je najčastejším a zároveň najzhubnejším druhom mozgového nádoru. Navyše má GBM svoje podtypy, ktoré samozrejme inak reagujú na chemoterapiu a rádioterapiu. Z toho vyplýva, že na terapiu jednotlivých podtypov GBM bude potrebné vyvinúť odlišné lieky a aj preto sme sa rozhodli otestovať zmes fosfolipidov BAF<sup>®</sup> na bunkovej línii T98G. Pomocou klasického testu viability (MTT) sme jednoznačne dokázali významný vplyv aktívneho BAF<sup>®</sup> oproti kontrolnej vzorke, a to pri každom dni kultivácie (1-3). Navyše sme testovali 4 rôzne koncentrácie z ktorých najúčinnějšía bola 0,1%-tná. Aktívny BAF<sup>®</sup> pôsobil na bunky inhibične jednak samostatne, ale taktiež aj v kombinácii s vybranými cytostatikami, kedy znižoval ich koncentráciu účinku, tzn. LC50 hodnotu. Ako ďalšie metódy na stanovenie percenta usmrtených buniek sme použili histologické farbenie (May-Grünwald/Giemsa) a fluorescenčne (DAPI), kde sme potvrdili apoptotický efekt pôsobenia BAF<sup>®</sup>.

Naším ďalším cieľom bude určenie detailného mechanizmu a to ako na úrovni génovej, tak bielkovinovej. Táto práca bola podporená projektom " Identifikácia nových markerov v diagnostickom paneli neurologických ochorení" spolufinancovaným zo zdrojov ES a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

## **Materiál a metódy**

### Zmes fosfolipidov

Používali sme dve formy zmesi fosfolipidov: neaktívnu N-BAF<sup>®</sup> (APLC-E-111018) a aktívnu A-BAF<sup>®</sup> (APLC-E-111017) v základnom obsahu

15%. Pri in vitro experimentoch sme používali percentuálne obsahy BAF® v rozpätí od 0,025–0,2%.

### Bunková línia

Na realizáciu experimentov sme využili bunkovú líniu T98G, tzn. „ľudský kaukazský glioblastóm“, získanú od European Collection of Cell Cultures (Kat. č.:92090213). Samotná kultivácia buniek prebiehala v CO2 inkubátore pri teplote 37°C. Bunky sme podľa potreby 1-3 x do týždňa pasážovali a kultivovali v médiu s takýmto zložením: EMEM + 2mM glutamín + 1% NEAA + 1% pyruvát sodný + 10% fetálne prasacie sérum a 1% penicilín/streptomycín.

### Farbenie podľa May-Grünwalda a Giemsa

Toto farbenie sme používali pri 12 jamkových platniach, kedy sme pomocou vákuovej pumpy odsali staré médium a následne bunky premyli roztokom PBS. Po adherencii buniek sme použili základné histologické farbivá roztoky May-Grünwald a Giemsa-Romanowski na zistenie vplyvu BAF® v týchto koncentráciách (0,025-0,2%).

### Fluorescenčné farbenie pomocou DAPI

Farbička DAPI, čiže 4,6-diamíno-2-fenylindol, prechádza cez intaktnú membránu, preto je vhodná na detekciu živých a fixovaných buniek. Pomocou fluorescenčnej mikroskopie sme zisťovali prítomnosť jadier nádorových buniek po pôsobení BAF®.

### Metyl-tiazol tetrazoliový test

Na stanovenie počtu viabilných buniek sme použili metyl-tiazol tetrazoliový (MTT) test v 96 jamkovej platničke. Princíp testu je založený na schopnosti živých buniek redukovať žltú rozpustnú tetrazolióvu soľ mitochondriálnym enzýmom sukcinátdehydrogenázou na nerozpustný modrý formazán, ktorý sa po pôsobení detergentu rozpustí a následne sa odčíta absorbanca. Využili sme ho v dvoch experimentoch a to ako na určenie rastového profilu pri rôznych koncentráciách BAF®, tak na zistenie účinku BAF® na pôsobenie vybraných cytostatík. Na základe nameraných absorbancií pri 540 nm sme určili koncentráciu LC50 (letálna koncentrácia liečiva, ktorá usmrcuje 50% bunkovej populácie – najúčinnější). Neskôr sme porovnávali získané údaje medzi kontrolou, neaktívnym a aktívnym BAF®.

## Výsledky

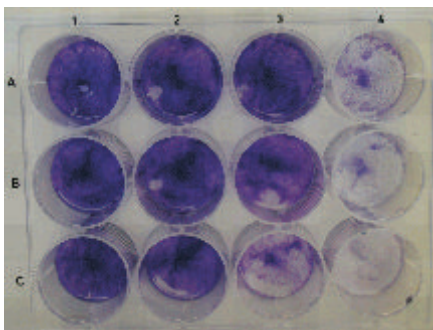
Samotné výsledky sme podľa použitých metódik rozdelili na 3 oblasti: histologicú, profilového rastu a cytostaticú. V histologickej sme pomocou dvoch odlišných farbiacich techník určili hustotu populácie buniek resp. jadier nádorových buniek po aplikáciách rôznych koncentrácií aktívnej a neaktívnej formy BAF<sup>®</sup>. Po úspešnej 48 hod adherencii buniek na dno kultivačných jamiek sme nariedili príslušné roztoky podľa tab. 1.

	1	2	3	4
A	ctrl	0,075	ctrl	0,075
B	0,025	0,1	0,025	0,1
C	0,05	0,2	0,05	0,2

**N-BAF<sup>®</sup>**                      **A-BAF<sup>®</sup>**

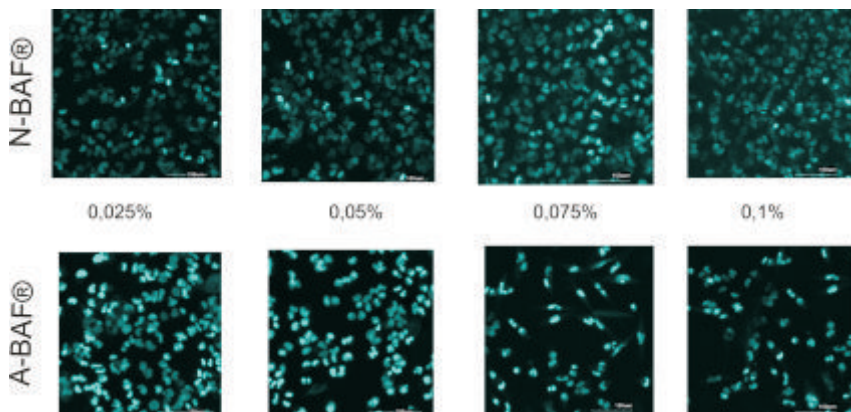
Tabuľka 1: Rozdielne koncentrácie BAF<sup>®</sup> [%] v 12-jamkovej platni (ctrl-kontrola).

Zvolili sme percentuálne koncentrácie, ktoré sa ukazovali za účinné ešte z predchádzajúcej štúdie BAF<sup>®</sup> na nádorových bunkách. Na obrázku 1 môžete vidieť eminentný rozdiel po 72 hod kultivácii línie T98G medzi formami BAF<sup>®</sup>, N-BAF<sup>®</sup> na ľavej strane platne a A-BAF<sup>®</sup> na pravej. V stĺpci č.4 od koncentrácie 0,075% smerom nadol sme zaznamenali výrazný úbytok populácie buniek, kde dokonca pri ostatnej jamke (vpravo dole) sme dosiahli takmer totálne usmrtenie nádorových buniek.



Obrázok : Sledovanie hustoty buniek v jamke pomocou farbenia May-Grünwald a Giemsa-Romanowski a podľa obsadenia v tab. 1.

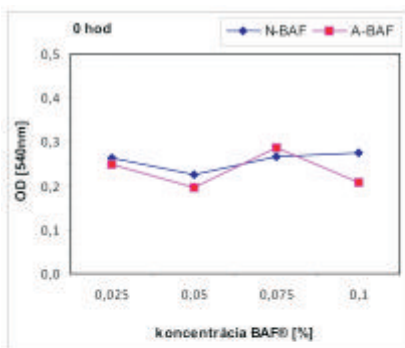
Podobný efekt sme sledovali aj pomocou fluorescenčného farbenia DAPI, kde na obr. 2 môžeme vidieť pokles jadier buniek (živých)



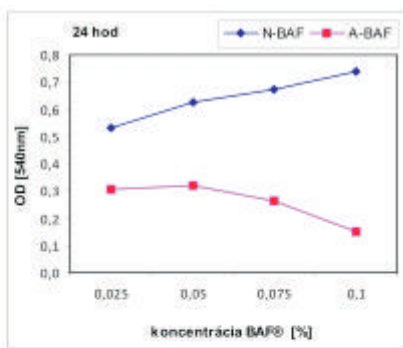
Obrázok : Fluorescenčné farbenie jadier buniek pomocou DAPI.

Na základe našej štúdie, kedy sme sa rozhodli zistiť vplyv zmesi fosfolipidov BAF® na bunky ľudského glioblastómu v in vitro podmienkach môžeme zhodnotiť nasledovné závery:

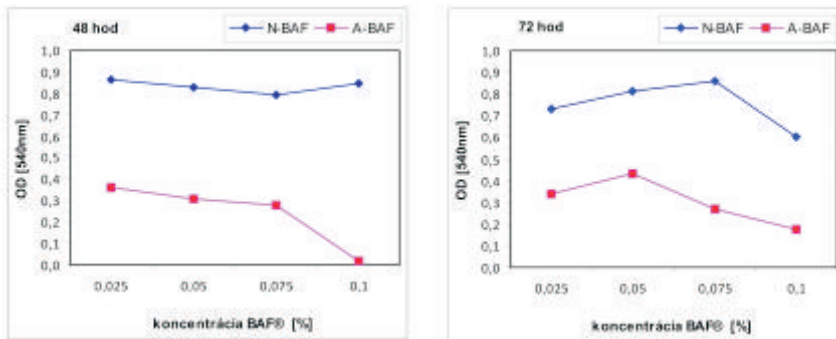
- proliferácia buniek je ovplyvnená už pri 24 hod kultivácii s aktívnou zmesou BAF®, oproti neaktívnej forme, resp. kontrole;
- aplikácia vyšších koncentrácií preukazovala totálny cytotoxický



48 hod

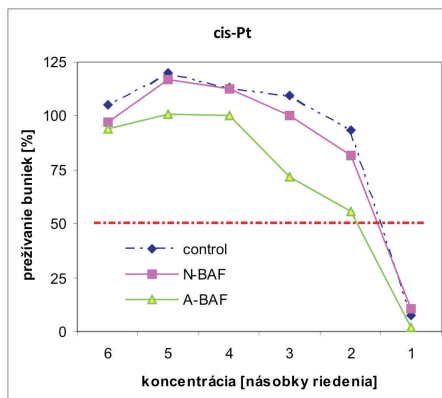


72 hod



Obrázok : Časová závislosť pôsobenia rôznych koncentrácií BAF®.

- efekt na danú populáciu buniek;  
 - dokázali sme, že in vitro podanie A-BAF® zvyšuje citlivosť buniek na vybrané cytostatiká – v klinickej praxi to môže znamenať,



Obrázok : Vplyv BAF® na cis-platinu in vitro podmienkach.

že kombinácia chemoterapeutík a A-BAF® je účinnejšia ako len samotné podanie cytostatickej látky.  
 Môžeme teda skonštatovať, že zmes aktívnych fosfolipidov pod značkou BAF® má protinádorový účinok, avšak na určenie presného mechanizmu pôsobenia je potrebné uskutočniť ďalšie experimenty na proteomickej, po prípade molekulárnej úrovni.