

DLHODOBÝ EFEKT PÔSOBNIA BAF® NA ADHERENTNÉ BUNKOVÉ LÍNIE

Jozef Hatok, Katarína Kliková, Tatiana Matáková a Dušan Dobrota

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

Abstrakt

Už niekoľko desiatok rokov sú známe priaznivé účinky derivátov éter-fosfolipidov na prevenciu voči vzniku nádorových ochorení. Firma Areko, spol. s r.o. vyvinula zmes biologicky aktívnych fosfolipidov pod ochrannou známkou BAF®. Práve túto zmes fosfolipidov, ako aj jej neaktívnu formu sme sa rozhodli testovať na nádorovej bunkovej línii DLD-1 (adenokarcinóm kolorekta) počas dlhodobej kultivácie. Po celkovej 18-dňovej kultivácii buniek s 0,05% obsahom BAF®, ktorého prítomnosť v médiu nepôsobila na bunky letálne, sme následne pomocou histologického farbenia pozorovali zmeny v bunkovom raste pri ďalších hodinách kultivácie. V pokuse sme okrem kontroly (bez BAF®) použili aj zvyšujúce sa koncentrácie ako aktívnej zmesi BAF® (A-BAF®), tak neaktívnej BAF® (N-BAF®). Zistili sme, že už pri 24 hod pôsobil 0,1% obsah A-BAF® na bunky cytolyticky. Pri 72 hod pôsobení tejto koncentrácie preživalo iba niečo cez 10% nádorovej populácie buniek oproti kontrole, resp. neaktívnej zmesi BAF®. Percentuálne vyššie koncentrácie A-BAF® (0,2 a 0,3%) viedli k totálnemu usmrteniu nádorových buniek.

Navyše sme po základnej dlhodobej kultivácii buniek s BAF® testovali aj vplyv na citlivosť, resp. rezistenciu voči *in vitro* aplikovaným cytostatikám (n= 8) pomocou MTT testu. U väčšiny testovaných cytostatík sme nezistili výrazný vplyv A-BAF®, výnimkou však boli mitomycín-C a paklitaxel, kde sme zistili signifikantné zmeny, avšak tieto cytostatiká sa pri liečbe kolorektálnych karcinómov nepoužívajú.

Na pochopenie detailnejšieho mechanizmu pôsobenia aktívneho BAF® sú však potrebné ďalšie experimenty na proteomickej, po prípade na molekulárnej úrovni.

Materiál a metodiky

Zmes fosfolipidov

Používali sme dve formy zmesi fosfolipidov: neaktívnu N-BAF® a aktívnu A-BAF® v obsahu 0,05% pri základnej kultivácii. Ďalej sme tiež testovali rôzne percentuálne obsahy BAF® v rozpätí od 0,025 – 0,4%.

Bunková línia

V tomto experimente sme používali bunkovú líniu DLD-1, tzn. bunky kolorektálneho karcinómu, získané od medzinárodnej banky ATCC (Kat. č.: CCL-221™). 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: základné médium „Dulbecco's Modified Eagle's Medium“ (DMEM), fetálne prasacie sérum (FBS, 10%) a penicilín/streptomycín (1%). Navyše sme použili tieto typy kultúr: C= kontrolnú (bez zmesi fosfolipidov), N-BAF®= neaktívnu (zmes neaktívnych fosfolipidov; 0,05%) a A-BAF®= aktívnu (zmes aktívnych fosfolipidov; 0,05%). Po základnej kultivácii (18 dní, dlhodobá) v 75 cm² fľašiach potom ešte nasledovala 2-dňová kultivácia v 12 resp. 96 jamkových platniach.

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. Potom sme k bunkám pridali 200 µL May-Grünwaldovho roztoku a nechali pôsobiť 10 min. Po skončení 1. farbenia sme roztok odobrali a bunky opäť premyli pomocou PBS. Ako 2. farbičku sme použili roztok Giemsa-Romanowski (200 µL) a nechali pôsobiť 5 min. Nakoniec sme bunky premyli a nechali uschnúť.

Metyl-tiazol tetrazoliový test

Na *in vitro* testovanie chemorezistencie sme použili metyl-tiazol tetrazoliový (MTT) test. Princíp testu je založený na schopnosti živých buniek redukovať žltú rozpustnú tetrazoliovú soľ mitochondriálnym enzýmom sukcinátdehydrogenázou na nerozpustný modrý formazán. Suspenziu buniek (100 µL) o koncentrácii 15 000/ mL sme nasadili v nultý deň na 96 jamkovú platničku. Potom sme ich nechali adherovať počas dvoch dní a následne sme pridali rôzne cytostatiká (okrem vnútornej kontroly) a po 72 hod sme stanovili rezistenciu, resp. citlivosť. Na základe nameraných absorbancií pri 540 nm sme určili koncentráciu LC₅₀ (letálna koncentrácia liečiva, ktorá usmrcuje 50% bunkovej populácie – najúčinnšia). Neskôr sme porovnávali získané údaje medzi kontrolnou kultúrou – neaktívnou a aktívnou.

Výsledky

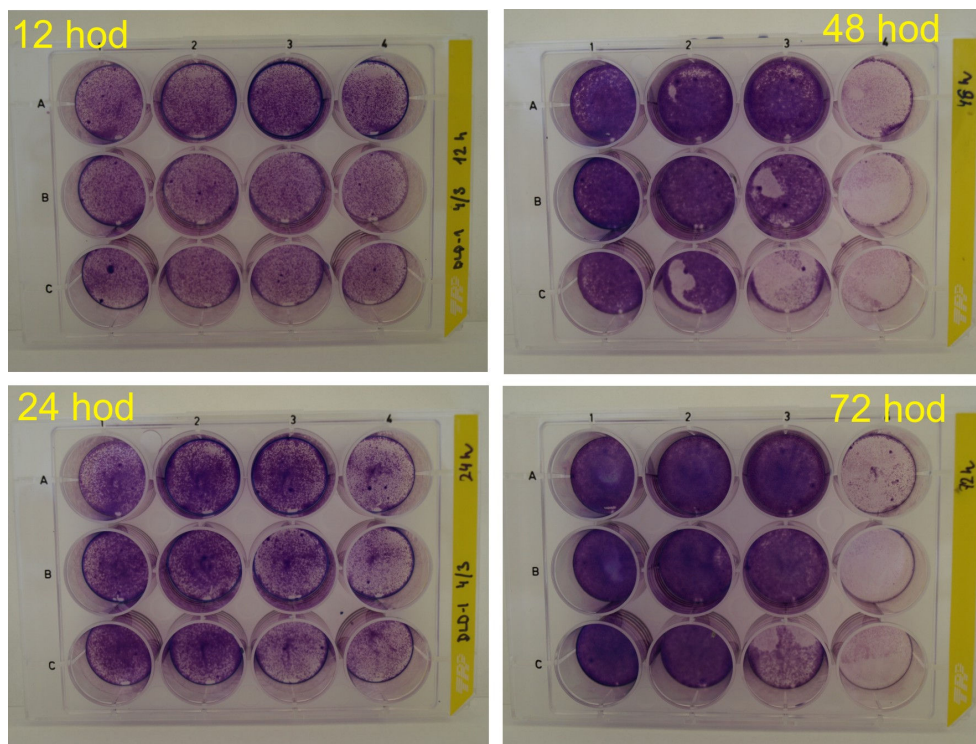
Získané výsledky by sme podľa použitej metodiky rozdelili do dvoch oblastí. Na oblasť mikroskopickú (12-formátovú) a testovaciú (96-formátovú).

V tej prvej sme sa hlavne zamerali na určenie vplyvu rôznych koncentrácií BAF®, či už neaktívnej alebo aktívnej formy. Po 18-dňovej základnej kultivácii DLD-1 buniek s 0,05%-tnými roztokmi BAF® v 75cm² fľašiach, sme následne bunky nasadili do 12-jamkovej platne o koncentrácii 50 000 buniek/ mL v objeme 1 mL kultivačného média. Po ďalších dvoch dňoch kultivácie sme médium odstránili a doplnili nové s prídavkom rôznych koncentrácií BAF® (okrem kontrolnej jamky), tak ako to uvádzame v tab. 1.

Tabuľka 1: Rozdielne koncentrácie BAF® v 12-jamkovej platni.

N-BAF®		A-BAF®	
A1= kontrola	A2= 0,1%	A3= kontrola	A4= 0,1%
B1= 0,05%	B2= 0,2%	B3= 0,05%	B4= 0,2%
C1= 0,075%	C2= 0,3%	C3= 0,075%	C4= 0,3%

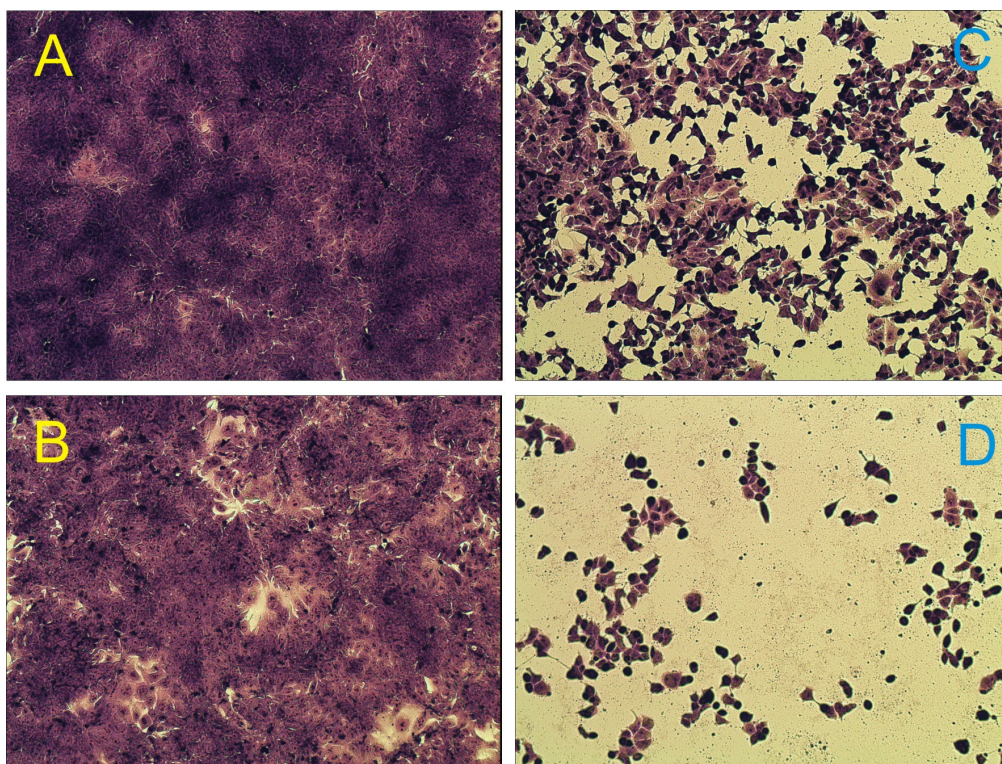
Prichytené bunky o dno platne sme pozorovali pri rozličných časových intervaloch (12-24-48 a 72 hod) s narastajúcou koncentráciou obidvoch zmesí fosfolipidov BAF®. Všetky platne v závislosti od počtu hodín kultivácie znázorňujeme na obr. 1.



Obrázok 1: Časová kultivácia buniek DLD-1 s rôznym obsahom BAF®.

V ľavom rohu obr. 1 znázorňujeme 12 hodinovú kultiváciu buniek s prídavkom BAF® (1-2 stĺpec= N-BAF® a 3-4 stĺpec= A-BAF®), kde oproti kontrolným jamkám (A1 a A3) sme nepozorovali žiaden úbytok počtu buniek. Pri 24 hod kultivácii (vľavo dole) sme zistili pokles počtu buniek v závislosti od narastajúcej koncentrácie A-BAF®, ale až od C3= 0,075%. Výrazné odumieranie buniek sme pozorovali pri 48 a 72 hod kultiváciách, kedy sa najmä koncentrácie 0,2 a 0,3% A-BAF® prejavovali letálne na nádorové bunky. V prvých dvoch stĺpcoch každej platničky sa nachádza, už spomínaná zmes neaktívnych BAF® v narastajúcej koncentrácii, samozrejme okrem jamky A1, kde je iba samotné médium. Ako máme možnosť vidieť, práve oproti kontrole nepozorujeme žiadny rozdiel v obsahu buniek na dne platničky.

Detailný pohľad na štrukturálne zmeny buniek uvádzame na obr. 2, kde sme použili zábery zo 48 hod kultivácie.



Obrázok 2: Snímky DLD-1 buniek po 48 hod kultivácii. A – kontrola; B – 0,05% A-BAF®; C – 0,1% A-BAF®; D – 0,3% A-BAF®

V druhej časti výsledkov by sme sa chceli venovať vplyvu BAF® na účinok testovaných cytostatík. Tento experiment sme realizovali na 96-jamkových platniach, kedy sme opäť po 18-dňovej základnej kultivácii DLD-1 buniek s 0,05%-tnými roztokmi BAF® v 75cm² fľašiach nasadili do spomínanej platne bunky o koncentrácii 15 000 buniek/ mL v objeme 100 µL. Po ďalších dvoch dňoch kultivácie sme k bunkám pridali rôzne cytostatiká (n= 8), kde sme navyše rozlišovali vplyv prítomnosti oboch foriem BAF®. Preto sme mali 3 typy platní (C, N a A): C= kontrola (bez BAF®), N= neaktívny BAF® a A= aktívny

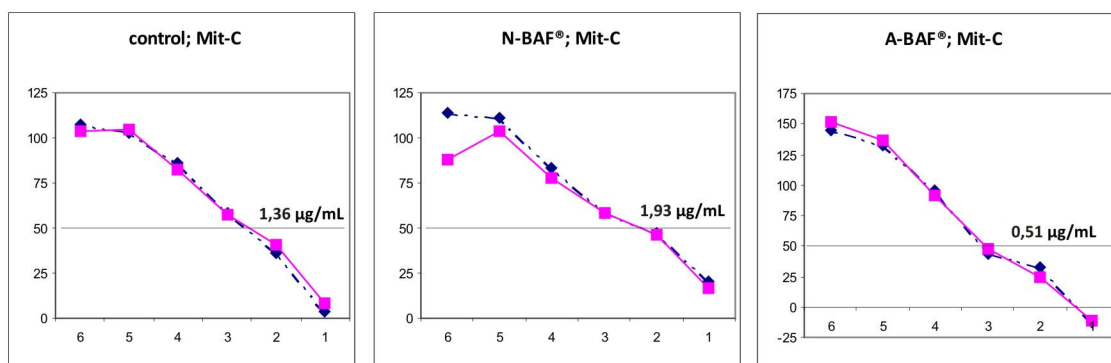
BAF®, pričom každá z platní obsahovala svoju vlastnú kontrolu (bez cytostatík) a blank (bez buniek, iba médium). Po následnej 72 hod kultivácii sme určili pre každé cytostatikum hodnotu LC₅₀ a vzájomne ich porovnávali (tab. 2).

Tabuľka 2: Zoznam testovaných cytostatík a určenie vplyvu BAF® podľa hodnoty LC₅₀.

Cytostatikum	Testovaná koncentrácia [rozpätie: µg/mL]	Kontrola [LC ₅₀]	N-BAF® [LC ₅₀]	A-BAF® [LC ₅₀]
5-Fluorouracil	(0,25 – 250)	1,15	16,7 #	13,675 #
Cis-Platina	(0,1 – 100)	3,75	4,16	3,76
Etopozid	(0,05 – 50)	ns	ns	31,66
Doxorubicín	(0,008 – 8)	5,88	ns	6,8
Gemcitabín	(0,3 – 300)	12,20	25,5	ns
Mitomycín-C	(0,01 – 10)	1,36	1,93	0,577 *
Mitoxantrón	(0,001 – 1)	0,55	ns	0,44
Paklitaxel	(0,05 – 50)	4,92	5,72	1,95 *

Legenda: LC₅₀ - letálna koncentrácia liečiva (µg/mL), ktorá usmrcuje 50% bunkovej populácie; * - P<0,05; # - P<0,01; ns- nebolo stanovené.

Najlepší efekt pôsobenia A-BAF® sme zistili pri kombináciách s mitomycínom-C a paclitaxelom, kde sme dokonca stanovili aj štatistickú významnosť (P<0,05). Naopak opačný vplyv A-BAF® sme zistili pri cis-platine. U väčšiny testovaných liečiv sme nezistili výrazné zmeny hodnoty LC₅₀ medzi kontrolou a neaktívnym, resp. aktívnym BAF®. Ako reprezentatívny obrázok MTT testu sme vybrali porovnanie nameraných kriviek pri mitomycíne-C (obr. 3). Na tomto obrázku môžeme vidieť výrazný pokles krivky, teda hodnoty LC₅₀, pri A-BAF® oproti kontrole. Navyše N-BAF® má približne rovnakú hodnotu ako kontrola. Obdobne sme to zaznamenali aj pri paklitaxeli.



Obrázok 3: Výsledné krivky stanovenia rezistencie DLD-1 buniek na mitomycín-C v závislosti od prítomného BAF® a určenie hodnoty LC₅₀. Os „y“ predstavuje percentuálne prežívanie buniek a os „x“ stupeň nariedenia používaného cytostatika.

Podakovanie

Táto práca bola realizovaná firmou Areko® a taktiež podporená projektom "Centrum translačnej medicíny" spolufinancovaným zo zdrojov ES a Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Záver

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

- pri dlhodobej kultivácii nemala nízka koncentrácia BAF® vplyv na proliferáciu buniek;
- následná aplikácia vyšších koncentrácií preukazovala cytolitický efekt aktívnej zmesi A-BAF® na danú populáciu buniek v porovnaní s kontrolnou a taktiež aj neaktívnou formou BAF®;
- výrazný vplyv A-BAF® na zvýšenie citlivosti voči používaným cytostatikám sme nezaznamenali.

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.