

Biologicky aktívne fosfolipidy izolované z vaječného žltka zvyšujú cytotoxický účinok temozolomidu na bunky ľudského glioblastómu

Jozef Hatok, Eva Blahovcová, Henrieta Škovierová, Radovan Murín

Univerzita Komenského v Bratislave, Jesseniova lekárska fakulta v Martine, Ústav lekárskej biochémie, Martin

Preparáty na báze fosfolipidov sa v klinickej praxi využívajú v rámci prevencie, ale aj ako podporná liečba pri terapii už niekoľko desaťročí. Viaceré štúdie poukazujú na skutočnosť, že biologicky aktívne fosfolipidy (BAF) môžu inhibovať rast niektorých druhov nádorov a ich schopnosť metastázovať. Multifonný glioblastóm (GBM) je u dospelých najčastejším a najagresívnejším druhom mozgového nádoru s prognózou prežívania u novodiagnostikovaných prípadov len niekoľko mesiacov. Štandardná liečba GBM zahŕňa resekciu nádoru, radiačnú terapiu a chemoterapiu temozolomidom (TMZ). V našej práci sme sa zamerali na štúdium vplyvu BAF, obohateného o 1-O-oktadecyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-fosfo-(N-palmitoyl)etanolamín (PNAE), na prežívanie ľudských glioblastómových buniek a jeho schopnosť ovplyvňovať cytotoxický účinok TMZ. Ako experimentálny model pre *in vitro* štúdium buniek GBM sme použili ľudskú glioblastómovú líniu T98G. Bunky boli inkubované v médiách BAF, bez PNAE (nBAF) a s prítomnosťou PNAE (aBAF) v objemových koncentráciách 0,05–0,3 %. S cieľom overiť vplyv BAF na cytotoxický efekt TMZ, boli bunky predinkubované s aBAF (0,05 %) po dobu 24 hodín a následne inkubované v prítomnosti TMZ. Na kvantifikáciu prežívajúcich buniek sme použili dva typy metód: i) metyl-tiazol tetrazoliový test (MTT) a ii) cytologické farbenie. Naše výsledky ukazujú, že BAF s obsahom PNAE pôsobí cytotoxicky na glioblastómové bunky už pri objemovej koncentrácii 0,05 %. Predinkubácia buniek s aBAF signifikantne potenciuje cytotoxický účinok TMZ na nádorové bunky. Na základe našich výsledkov môžeme tvrdiť, že biologicky aktívne fosfolipidy obohatené o PNAE by mohli byť používané ako podporná zložka pri chemoterapeutickej liečbe GBM s TMZ, zároveň by tak prispeli k zlepšeniu prognózy a kvality života pacientov.

Kľúčové slová: multifonný glioblastóm, chemorezistencia, biologicky aktívne fosfolipidy, temozolomid.

The biologically active phospholipids isolated from egg yolk increasing cytotoxic effect of temozolomide on human glioblastoma cells

Extracts of biologically active phospholipids (BAP) may exert a positive effect on inhibition of tumor growth and may be used as additive compounds to supplement palliative tumor treatment. The exact mechanisms by which BAP affect the cancer cells are still unknown. Among brain tumors, glioblastoma multiforme (GBM) is considered the most aggressive and the most common primary brain tumor in adults. The treatment of GBM includes surgery, radiotherapy and chemotherapy with an alkylating agent temozolomide (TMZ). With the aim to study the survival of human glioblastoma cells, in media supplemented with BAP alone or in combination with TMZ, we used the cell line T98G as a study model. The effect of BAP on glioblastoma cell survival was assessed by an methyl-thiazol tetrazolium (MTT) assay and also microscopically. Cells were incubated in medium enriched with BAP of different final 1-O-octadecyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-(N-palmitoyl)ethanolamine (PNAE) concentrations in range 0,05 – 0,3 % (aBAP). Our results show that aBAP negatively affected the cell survival, depending on their concentration in culture medium. Pre-culturing of the cells with aBAP for 24 hours before the incubation with TMZ had potentiated the cytotoxic effect of TMZ on GBM cells. The results indicate that BAP with PNAE are capable to either inhibit growth or induce the death of human glioblastoma cells *in vitro*. In conclusion, the capability of aBAP to potentiate the cytotoxic effect of temozolomide indicates that further testing of aBAP as an adjunct agent to treat GBM, may be of great clinical significance.

Key words: glioblastoma multiforme, chemoresistance, biologically active phospholipids, temozolomide.

Klin Farmakol Farm 2015; 29(3): 108–112

Úvod

Výsledky niekoľkých vedeckých štúdií poukazujú na schopnosť fosfolipidových preparátov, ktoré sa používajú ako výživové doplnky, inhibovať rast niekoľkých typov tumorov a ich schopnosť metastázovať, ako i zmierniť vedľajšie nežiaduce účinky radiačnej terapie a chemoterapie (1). Jedným z nich je zmes biologicky aktívnych fosfolipidov (BAF) izolovaných z vaječných žĺtkov a obohatených 1-O-oktadecyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-fosfo-

(N-palmitoyl)etanolamínom, tiež nazývaným plasmanyl-(N-acyl)etanolamín (PNAE), ktorý môže mať pre onkologických pacientov pozitívny efekt spojený s predĺžením ich života a zlepšením jeho kvality (2, 3). Predpokladá sa, že PNAE má schopnosť (i) kumulovať sa v membráne nádorových buniek, dôsledkom čoho je zvýšenie ich permeability s následným rozpadom nádorového tkaniva (2); ako aj (ii) inhibovať aktivitu proteínkinázy C (4), ktorá zohráva dôležitú úlohu v etiológii nádorov.

Z pomedzi primárnych nádorov mozgového tkaniva je multifonný glioblastóm (GBM) najčastejšie sa vyskytujúci a zároveň je považovaný za najagresívnejší a najzhubnejší. Prognóza pre pacientov je horšia pri porovnaní s inými typmi mozgových nádorov (5). Klinickým štandardom v terapii GBM je radikálna chirurgická resekcia nádoru a na ňu nadväzujúca rádioterapia spolu s chemoterapiou pomocou temozolomidu (TMZ) (6, 7). Temozolomid je imidazotetrazínový derivát

dakarbazínu, ktorý sa v prostredí s fyziologickými hodnotami pH spontánne hydrolyzuje na dve aktívne alkylačné zlúčeniny, a to buď kyselinu temozolomidovú, alebo 5-(3-metyltriazén-1-yl)imidazol-4-karboxamid. Antineoplastický účinok aktívnych foriem TMZ spočíva v ich schopnosti metylovať guanínové zvyšky DNA, následkom čoho je tvorba zlomov DNA, ktorá iniciuje proces vedúci k bunkovej smrti (8). Častá rezistencia glioblastómových buniek, či už primárna alebo získaná, voči chemotoxickému efektu TMZ predstavuje jeden z problémov pre efektívnu terapiu a lepšiu prognózu pre pacientov s GBM (9).

V prezentovanej štúdii sme sa preto zamerali na schopnosť BAF ovplyvniť prežívanie ľudských glioblastómových buniek, a navyše na overenie či biologicky aktívne fosfolipidy majú schopnosť potenciovať účinok TMZ.

Materiál a metódy

Bunková línia

Na realizáciu experimentov sme využili ľudskú bunkovú líniu multiformného glioblastómu T98G (92090213, ECACC, Sigma-Aldrich, USA). Pri práci s bunkami sme dodržali štandardné kultivačné podmienky, t.j. 5 % CO₂, teplotu 37 °C a 95% vlhkosť. Ako inkubačné médium sme použili Dulbecco's modified Eagle's medium (PAA, Rakúsko), obohatené o fetálne telacie sérum s výslednou objemovou koncentráciou 10 % (Gibco, USA), penicilínom (10 IU/ml) a streptomycínom (10 µg/ml) (PAA, Rakúsko).

Po dosiahnutí približne 70percentnej konfluencie sme bunky pasážovali pomocou roztoku pozostávajúceho z Hank's Balanced Salt Solution w/o Ca²⁺ and Mg²⁺ (Sigma-Aldrich, USA) obohateného o trypsin (0,25 mg/ml) a EDTA s jej výslednou koncentráciou 0,53 mM.

Biologicky aktívne fosfolipidy

Fosfolipidy, ktoré tvoria základ prípravku BAF (biologicky aktívne fosfolipidy), boli firmou AREKO (ČR) extrahované z kuracieho vajecného žltka. Štandardný pracovný postup, ktorý využíva etanol a purifikáciu pomocou acetónu, je popísaný Gladkowskim a kol. (2012). K dispozícii sme mali dve formy BAF, ktoré v článku uvádzame ako: (i) neaktívnu formu (nBAF; kontrolná zmes fosfolipidov); a (ii) aktívnu [aBAF; zmes fosfolipidov obohatená o 1-O-oktadecyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-fosfo-(N-palmitoyl)etanolamín s finálnou 15% objemovou koncentráciou] (10, 11).

Inkubácia buniek v prítomnosti BAF a cytostatík

Aktívna forma BAF bola pridaná do inkubačného média na výslednú objemovú koncentráciu PNAE prítomného v aBAF v rozmedzí hodnôt 0,025 až 0,3 %. Nešpecifický efekt samotných extrahovaných fosfolipidov sme paralelne testovali tak, že objem nBAF pridaného do inkubačného média zodpovedal objemu aBAF s požadovanou objemovou koncentráciou PNAE v médiu.

S cieľom zistiť IC₅₀ vybraných chemoterapeutík (tabuľka 1), sme bunky ľudskej bunkovej línie multiformného glioblastómu (T98G) inkubovali 48 h v kultivačnom médiu obohatenom o sledované chemoterapeutikum na požadovanú koncentráciu.

Na overenie možnosti, že BAF ovplyvňuje účinok chemoterapeutík, sme bunky najprv

predinkubovali počas 24 h v médiu obohatenom o BAF na výslednú objemovú koncentráciu PNAE 0,05 %. Následne sme médium vymenili za inkubačné, obohatené o chemoterapeutiká, ktoré sme nechali pôsobiť na bunky 48 h.

Kvantifikácie buniek

Na kvantifikáciu buniek sme použili biochemický test založený na schopnosti živých buniek redukovať žltu sfarbený bromid 3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-2,5-difenylnitrazólium (MTT; Sigma, Nemecko) na fialovo sfarbený formazán (12), ktorý je možné kvantifikovať na základe merania hodnôt jeho absorpcie pri 540 nm.

Mikroskopovanie buniek

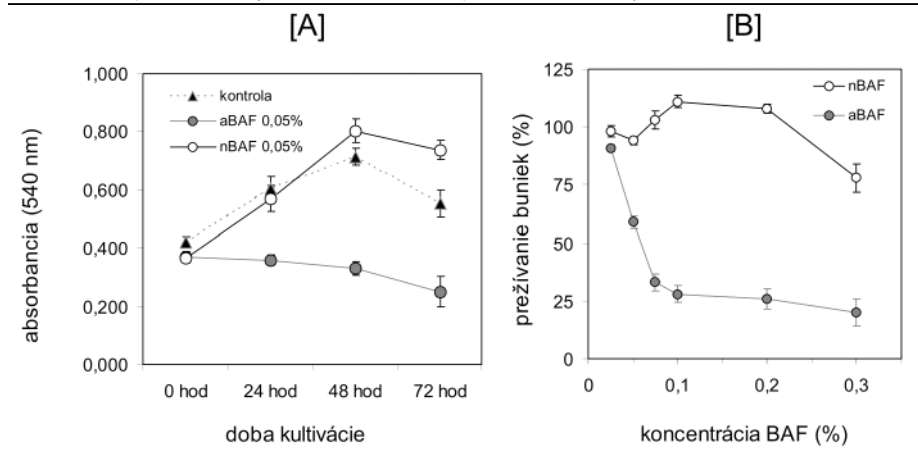
Základné cytologické farbenie buniek pomocou metódy May-Grünwald/Giemsa-Romanowski (Sigma, Nemecko) sme použili pre

Tabuľka 1. Zoznam *in vitro* používaných chemoterapeutík a ich výsledok testovania

Názov (skratka)	Koncentračné rozpätie [µg/ml]	IC ₅₀ [µg/ml]	Prežívanie buniek pri c-max [%]	Výsledok
5-fluorouracil (5-FU)	1,6–50	15,8	27	vnímavosť
6-tioguanín (6-TG)	1,6–50	28,10	43	vnímavosť
Cisplatina (cis-Pt)	0,1–100	51,4	2	citlivosť
Dakarbazín (DAK)	0,5–500	429,9	48	vnímavosť
Doxorubicín (DOX)	0,008–8	4,49	20	citlivosť
Etopozid (VP-16)	0,05–50	nd	53	rezistencia
Karboplatina (karbo-Pt)	0,1–100	nd	99	rezistencia
Temozolomid (TMZ)	31,3–1000	185,4	14	citlivosť
Vinkristín (VNC)	0,05–50	27,5	41	vnímavosť

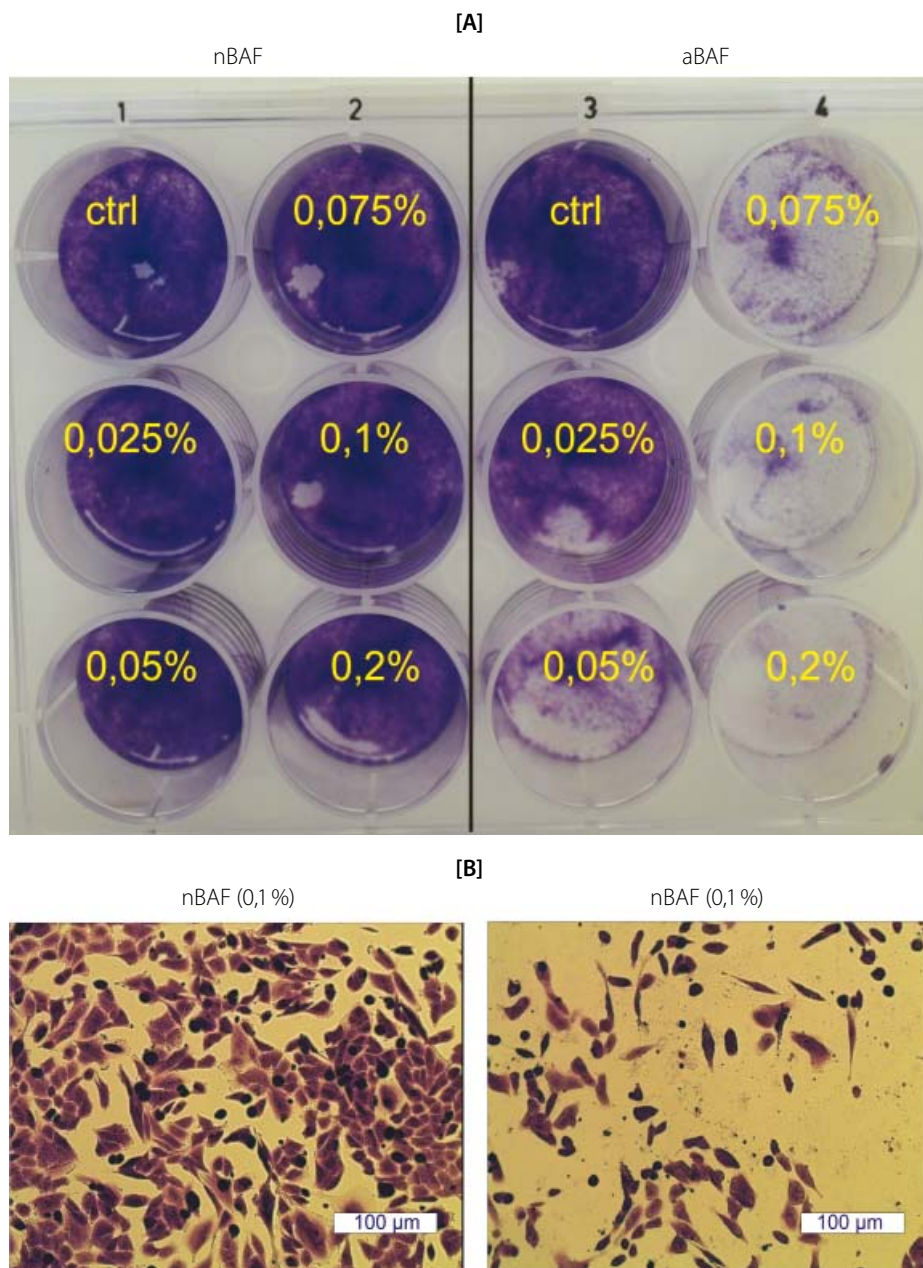
Tabuľka znázorňuje koncentrácie chemoterapeutík, podľa prepočítaných farmakokinetických a farmakodynamických dávok, testované na bunkách T98G v 96 jamkových platniach. Bunky boli na testovacie platne nasadené v koncentrácii 30.000/ml, t.j. 3.000/jamku. Po 24h inkubácii sme kultivačné médium vymenili za nové s obsahom jednotlivých chemoterapeutík s príslušným koncentračným rozpätím a nechali pôsobiť 48 h. Po lýze buniek sme odrátali inhibičnú koncentráciu (IC₅₀), pri ktorej preživa 50 % bunkovej populácie oproti kontrole. Pri určení finálneho výsledku sme do úvahy brali aj percentuálne prežívanie buniek pri maximálnej koncentrácii chemoterapeutika (c-max). Vysvetlivka: nd – nedetekovateľné.

Obrázok 1. Časový a koncentračný profil testovania BAF na bunkách T98G. [A] Zmena absorpcie použitím MTT testu počas rôznej doby kultivácie. [B] Percentá prežívania buniek ovplyvnených 0,05% BAF merané oproti kontrolným bunkám (bez BAF) počas 24-hodinovej inkubácie



Obrázok 2. Porovnanie vplyvu aBAF a nBAF na prežívanie T98G buniek.

V časti [A] je znázornená fotografia 12-jamkovej kultivačnej platne buniek T98G počas 72-hodinovej inkubácie. Stĺpce 1 a 2 predstavujú narastajúci obsah nBAF bez PNAE, ako kontrola k paralelne nasadenom aBAF. Stĺpce 3 a 4 predstavujú narastajúci obsah aBAF s príslušným objemovým percentom PNAE. Jednotlivé kultivačné média aj s obsahom BAF boli menené každých 24 hodín. Ako kontroly boli použité rovnaké bunky, inkubované iba v kultivačnom médiu bez aditív (ctrl). Na vizualizáciu buniek sme použili May-Grünwald/Giemsa-Romanowski farbenie. V časti [B] je zobrazená reprezentatívna mikrofotografia buniek pri 200-násobnom zväčšení



mikroskopické stanovenie proliferácie buniek. Bunky sme nasadili na 12-jamkovú platničku v koncentrácii 30.000/ml/jamku, t.j. 7.800/cm². Po 24 hodinovej inkubácii buniek v kultivačnom médiu sme následne vymenili médium a doplnili o nové s rôznym objemovým obsahom (0,025 až 0,2%) obidvoch foriem BAF počas ďalších 72 h. Bunky sme po vyfarbení metódou May-Grünwald/Giemsa-Romanowski pozorovali pomocou inverzného mikroskopu Olympus IX71, USA.

Štatistická analýza

Výsledky uvádzané ako aritmetický priemer $\pm$ SD (štandardná odchýlka). Na zistenie štatisticky významných rozdielov medzi jednotlivými experimentálnymi skupinami bol použitý t-test programu Excel.

Výsledky

Vplyv PNAE na prežívanie buniek ľudskej glioblastómovej línie T98G sme vyhodnocovali pomocou MTT testu a mikroskopicky. Bunky po

predinkubácii v 96-jamkových platniach boli inkubované v médiu obohatenom o PNAE prítomnom v aBAF počas 24, 48 alebo 72 hodín. Na overenie možného vplyvu samotnej aktívnej zložky v aBAF na prežívanie glioblastómových buniek sme paralelne časť buniek inkubovali spolu s nBAF, ktorého objemová koncentrácia v médiu zodpovedala objemovej koncentrácii aBAF. Množstvo živých buniek sme kvantifikovali pomocou MTT testu a vyhodnotili ako percentuálny pomer k množstvu buniek prítomných v kontrolnej skupine kultivovanej počas rovnakého časového intervalu. Zaznamenali sme výrazný pokles v prežívaní buniek už po 24h inkubácii pri objemovej koncentrácii PNAE 0,05% v zmesi aktívneho BAF. Počas 48h a 72h inkubácii sme namerali nárast absorbie, teda počtu živých buniek ošetrovaných nBAF oproti kontrolným o 12,6%, resp. 33,3% (obrázok 1A). Pri testovaní rôznych koncentrácií aBAF počas 24 h sme oproti nBAF pozorovali klesajúci trend prežívajúcich buniek. Pri korelácii počtu usmrtených buniek medzi nBAF a aBAF pokusmi sme dosiahli v priemere o $2,96 \pm 1,32$ násobne vyšší percentuálny pomer (obrázok 1B). Aplikácia 0,05% objemovej koncentrácie PNAE u aBAF vykazovala oproti kontrole pri 24h inkubácii 59 percent prežívajúcich buniek (obrázok 1B), preto sme danú koncentráciu použili pri predinkubácii s chemoterapeutikami.

Na základe cytologického farbenia sme potvrdili pokles populácie buniek s nárastom aplikovanej koncentrácie aBAF, a to ako oproti nBAF, tak aj oproti internej kontrole. Po 72h kultivácii sme zaznamenali výrazný úbytok glioblastómových buniek pri koncentráciách aBAF vyšších ako 0,05% (obrázok 2A). Použitím 200-násobného zväčšenia vidíme na obrázku 2B detailné morfológické zmeny buniek ako zrejmý pokles bunkovej hustoty.

Za ďalší cieľ sme si stanovili určenie cytotoxicity vybraných chemoterapeutík (ChMT) na ľudské glioblastómové bunky pomocou MTT testu. Glioblastómové bunky vykazovali rôznu citlivosť k testovaným chemoterapeutikám a na základe ich IC₅₀ hodnoty a percentuálneho prežívania buniek pri maximálnej koncentrácii používaného chemoterapeutika boli rozdelené do troch skupín (tabuľka 1): i) rezistentné, ii) vnímavé, iii) citlivé (13). Výsledné krivky testovania ChMT pre jednotlivé skupiny sú znázornené na obrázku 3. Ako najúčinnšie chemoterapeutikum v *in vitro* podmienkach na bunkách T98G bola cisplatina a temozolomid.

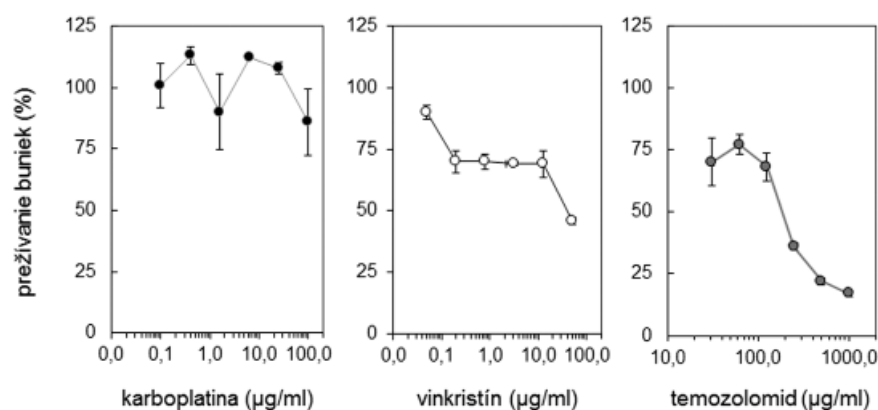
V nasledujúcom kroku sme sa zamerali na overenie možného vplyvu BAF na cytotoxic-

ký účinok ChMT, a to karboplatiny (karbo-Pt) a TMZ. Po 24-hodinovej predkultivácii glioblastómových buniek s PNAE (aBAF) v objemovej koncentrácii 0,05 %, boli bunky inkubované nasledujúcich 48 hodín s TMZ, resp. karbo-Pt. Predinkubácia buniek s PNAE potenciovala cytotoxický efekt TMZ (obrázok 4A), dôsledkom čoho bol pokles hodnoty IC_{50} . Predinkubácia buniek s nBAF (slúžiacej ako negatívna kontrola) nemala vplyv na cytotoxický efekt TMZ (obrázok 4A). Naopak, porovnanie cytotoxického účinku karbo-Pt bez alebo po predinkubácii s aBAF, ako aj nBAF, poukazuje na neschopnosť BAF ho ovplyvňovať (obrázok 4B). V porovnaní s obrázkom 1 môžeme dokonca tvrdiť, že karboplatina inhibuje cytotoxický účinok oboch foriem BAF na glioblastómové bunky.

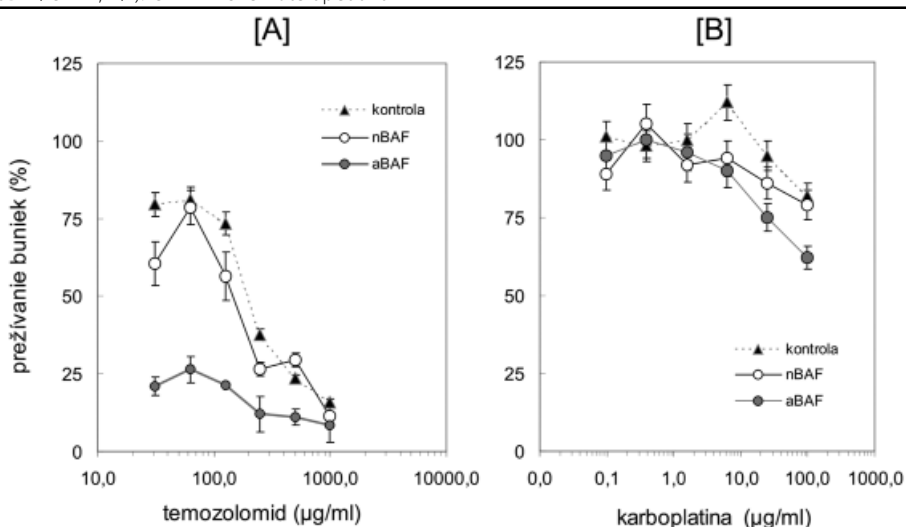
Diskusia a záver

V súvislosti so zlepšovaním liečebných postupov nádorových chorôb sú v odborných prácach popisované viaceré pozitívne vplyvy fosfolipidov. Aktívne môžu pôsobiť v prevencii vzniku nádoru (14, 15), inhibícii nádorového rastu (16, 17, 18, 19) a ovplyvnení schopnosti nádoru metastázovať (20). Na základe výsledkov našej štúdie vplyvu BAF na bunkovú líniu T98G *in vitro* môžeme zhodnotiť, že PNAE prítomný v aBAF má cytotoxický efekt na ľudské glioblastómové bunky. Cytotoxický efekt PNAE sa prejavil znížením počtu živých buniek, ktorý je pozorovateľný už po 24h inkubácii buniek s aBAF. Naviac, výsledky nášho experimentu s nBAF poukazujú na fakt, že zmes fosfolipidov bez PNAE má skôr pozitívny vplyv na rast nádorových buniek. Charakteristická vlastnosť a funkcia bunkovej membrány je daná od usporiadania a zloženia fosfolipidov v nej obsiahnutých. Práve poškodenie membrán nádorových buniek, vyvolané pôsobením PNAE, umožní ich degradáciu a teda zánik. Mechanizmus účinku PNAE bol definovaný na rôznych úrovniach, ktoré popísal dr. Kára: i) inhibuje proteínkinázu C; ii) selektívne ničí nádorové bunky, zatiaľ čo zdravé regeneruje a chráni; iii) spolu s Ca^{2+} iónmi pôsobí protinádorovo a bráni vzniku metastáz (4, 21). Naše výsledky jednoznačne poukazujú na inhibičný účinok PNAE obsiahnutého v BAF (aBAF) na glioblastómové bunky. Predpokladáme, že PNAE navodí degradovanie bunky procesom apoptózy, čím jej vlastne spôsobí usmrtenie. Glioblastómové bunky vykazovali rôznu citlivosť na testované cytostatiká. Bunková línia T98G bola rezistentná na chemoterapeutiká karboplatinu i etopozid, vnímavá na 5-fluorouracil, 6-tioguanín,

Obrázok 3. Reprezentatívny výsledok testovania chemoterapeutík na prežívanie glioblastómových buniek T98G v podmienkach *in vitro*. Jednotlivé body predstavujú percentá prežívajúcich buniek počas 48-hodinovej inkubácie z troch nezávislých meraní. Pre každé cytostatikum bola použitá samostatná kontrolná skupina buniek, inkubovaných iba v čistom kultivačnom médiu za rovnakých podmienok



Obrázok 4. Vplyv 24-hodinovej predinkubácie glioblastómových buniek T98G s aBAF a nBAF (0,05 %) na cytotoxický účinok temozolomidu a karboplatiny. Pred pridaním cytostatika (A-temozolomid, B-karboplatina) boli bunky počas 24 hodín ošetrené aktívnou (aBAF) a neaktívnou (nBAF) zmesou fosfolipidov. Samostatné pokusy (kontrola, nBAF, aBAF) boli porovnávané oproti vnútorným kontrolným meraniam (ozn. ako K) s nasledovným obsahom zložiek: K_ctrl (BAF/ChMT, -/-); K_nBAF (nBAF/ChMT, +/-) a K_aBAF (aBAF/ChMT, +/-). ChMT – chemoterapeutikum



dakarbazín i vinkristín a citlivá na cisplatinu, doxorubicín i temozolomid v závislosti od podávaného koncentračného rozpätia. Verheij a kol. potvrdili vo svojej práci výrazné zvýšenie cytotoxického efektu rádioterapie pri kombinovanej terapii s fosfolipidmi (22). V našej štúdii sme sa zamerali na kombinovaný účinok fosfolipidov a vybraných chemoterapeutických látok, ktoré sú v klinickej praxi využívané v liečbe multiformného glioblastómu (23). V *in vitro* podmienkach 24 h predovplyvnenie s 0,05 % aBAF významne znižovalo prežívanie glioblastómových buniek, a to už pri najnižšej testovanej koncentrácii (31,3 µg/ml) TMZ. Pri kontrole bez predovplyvnenia s BAF a pri predovplyvnení s nBAF sme pokles prežívania buniek T98G po 48-hodinovej inkubácii s TMZ zaznamenali až pri koncentráciách TMZ vyšších

ako 125 µg/ml. V *in vitro* podmienkach má teda aBAF inhibičný charakter na prežívanie glioblastómových buniek a tým zvyšuje citlivosť buniek T98G voči alkylačnej látke TMZ.

Na rozdiel od TMZ, sme u karboplatiny zvýšený efekt aBAF na cytotoxicitu nepozorovali. Naopak, karbo-Pt potlačala cytotoxický účinok ako pre aBAF, tak aj nBAF.

Na základe našich výsledkov môžeme predpokladať, že schopnosť PNAE prítomných v aktívnom preparáte BAF ovplyvňuje stupeň usmrtených nádorových buniek, a preto by ho bolo možné využiť pri prevencii. Naviac predpokladáme, že prípadné overenie pozorovaného účinku aBAF potenciovať účinok TMZ v *in vitro* podmienkach aj u pacientov trpiacich GBM by mohlo priniesť nesmierny klinický význam. Objasnenie mechanizmu pôsobenia aktívnych

biologických fosfolipidov môže znamenať významný prínos v liečbe nádorových chorôb.

Podporujúce agentúry a sponzori:

Táto práca bola podporená projektom APVV-0224-12 a projektom „Zvýšenie možností kariérneho rastu vo výskume a vývoji v oblasti lekárskeho vied“, ITMS kód projektu: 26110230067 spolufinancovaným zo zdrojov EÚ a Európskeho sociálneho fondu.

Zmes fosfolipidov vyrobila firma AREKO, spol. s r.o., Praha, Česká republika.

Literatúra

- Küllenberg D, Taylor LA, Schneider M, Massing U. Health effects of dietary phospholipids. *Lipids Health Dis* 2012; 11: 3–18.
- Bednarčík P. Ovosan v podporné liečbe nádorových onemocnění – praktické zkušenosti. Sborník k semináři společnosti Areko® – Výzkum BAF® 2011–2012: 2–7.
- Brachwitz H, Vollgraf C. Analogs of alkyllysophospholipids: chemistry, effects on the molecular level and their consequences for normal and malignant cells. *Pharmacol Ther* 1995; 66: 39–82.
- Mikhaevich IS, Gerasimova GK, Kára J. Inhibition of protein kinase C by semisynthetic phospholipid plasmalogen-(N-acyl)-ethanolamine, a nontoxic antitumor preparation. *Biochem Int* 1991; 23: 215–220.
- Diba ChS, Pleško I, Hlava P. Incidencia zhubných nádorov v Slovenskej republike 2007. Bratislava: NHIC 2012.
- Stupp R, Dietrich PY, Ostermann Kraljevic S, et al. Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *J Clin Oncol* 2002; 20: 1375–1382.
- Hart MG, Garside R, Rogers G, Stein K, Grant R. Temozolomide for high grade glioma. *Cochrane Database Syst Rev* 2013; 4: CD007415.
- Zhang J, Stevens MF, Bradshaw TD. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol* 2012; 5: 102–114.
- Johannessen TCA, Bjerkvig R. Molecular mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Expert Rev Anticancer Ther* 2012; 12: 635–642.
- Vojkovský T, Liebl V. N-acylované fosfolipidy typu 1-O-alkyl-sn-glycero-3-fosfoethanolaminů, způsob jejich semisynthetické přípravy a použití. CZ Patent 280686, 1996.
- Kára J, Liebl V, Nováček A, Bejšovcová L. Způsob výroby přípravku s dieteticko-preventivním a léčebným účinkem na bázi vaječných 1-O-alkyl-2-acyl-fosfatidylethanolaminů. CZ Patent 282 139, 1997.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55–63.
- Hatok J, Matáková T, Jurečková J, et al. Naše päťročné výsledky in vitro testovania chemorezistencie u onkologických pacientov. *Klin Onkol* 2011; 24: 443–446.
- Shuman Moss LA, Jensen-Taubman S, Rubinstein D, Viole G, Stetler-Stevenson WG. Dietary intake of a plant phospholipid/lipid conjugate reduces lung cancer growth and tumor angiogenesis. *Carcinogenesis* 2014; 35: 1556–1563.
- Sakakima Y, Hayakawa A, Nagasaka T, Nakao A. Prevention of hepatocarcinogenesis with phosphatidylcholine and menaquinone-4: in vitro and in vivo experiments. *J Hepatol* 2007; 47: 83–92.
- Marco C, Ríos-Marco P, Jiménez-López JM, Seqovia JL, Carrasco MP. Antitumoral alkylphospholipids alter cell lipid metabolism. *Anticancer Agents Med Chem* 2014; 14: 545–558.
- Semini G, Hildmann A, von Haefen C, Danker K. Glycosidated phospholipids - a promising group of anti-tumour lipids. *Anticancer Agents Med Chem* 2014; 14: 607–617.
- Arthur G, Bittman R. Glycosylated antitumor ether lipids: activity and mechanism of action. *Anticancer Agents Med Chem* 2014; 14: 592–606.
- Engelbraaten O, Bjerkvig R, Berens ME. Effect of alkyl-lysophospholipid on glioblastoma cell invasion into fetal rat brain tissue in vitro. *Cancer Res* 1991; 51: 1713–1719.
- Li YC, Park MJ, Ye SK, Kim CW, Kim YN. Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. *Am J Pathol* 2006; 168: 1107–1118.
- Kára J, Konovalova AL, Krasnova MA, Liebl V, Bejšovcová L. New tumoricidal semisynthetic ether phospholipid, plasmalogen-(N-acyl)ethanolamine (PNAE(s)) and enhancement of its tumoricidal activity by calcium ions. *Neoplasma* 1993; 40: 213–217.
- Verheij JM, Moolenaar WH, van Blitterswijk WJ. Combining anti-tumor alkyl-phospholipid analogs and radiotherapy: rationale and clinical outlook. *Anticancer Agents Med Chem* 2014; 14: 618–628.
- Mrugala MM. Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective. *Discov Med* 2013; 15: 221–230.

Článek přijat redakcí: 9. 6. 2015

Článek přijat k publikaci: 13. 10. 2015

Mgr. Radovan Murín, PhD.

Univerzita Komenského v Bratislave,
Jesseniova lekárska fakulta v Martine,
Ústav lekárskej biochémie
Malá Hora 11 161/4D, 03601 Martin, Slovenská republika
radovan.murin@fmed.uniba.sk