

Jalur kematian sel apoptosis pada galur sel glioblastoma multiforme t98g yang diinduksi rotenon = The cellular death pathways apoptosis of glioblastoma multiforme t98g induced by rotenone

Purnamawati, author

Deskripsi Lengkap: <https://lib.ui.ac.id/detail?id=20364720&lokasi=lokal>

Abstrak

Latar belakang : Glioblastoma Multiforme (GBM) merupakan kanker otak primer yang paling umum terjadi pada orang dewasa dan merupakan glioma yang paling agresif yang diklasifikasikan oleh WHO sebagai tingkat keempat dari astrositoma. Penatalaksanaan utama GBM dengan operasi disertai dengan kemoradiasi memberikan rata-rata harapan hidup sekitar 14,6 bulan saja, ini disebabkan pertumbuhan tumor yang difus disertai tingginya resistensi. Apoptosis, dinamakan juga “kematian sel terprogram” merupakan mekanisme kematian sel yang berperan penting dalam terapi kanker dan menjadi target utama dalam berbagai tehnik terapi kanker. Dua jalur utama apoptosis adalah jalur intrinsik yang melibatkan mitokondria dan jalur ekstrinsik yang diinduksi oleh ikatan ligan dengan reseptornya. Rotenon, inhibitor rantai respirasi kompleks I mitokondria dapat menyebabkan peningkatan kadar superoksida (ROS) endogen sehingga menginduksi jalur apoptosis intrinsik melalui lepasnya sitokrom C dan agen-agen proapoptotik ke sitosol. Rotenon bersifat lipofilik dan dapat menembus sawar darah otak dengan mudah, menjadikannya kandidat yang menarik untuk digunakan pada terapi GBM. Hingga kini mekanisme apoptosis yang disebabkan oleh rotenon pada GBM masih belum jelas diketahui, karena itu penelitian ini bertujuan untuk menelusuri jalur-jalur apoptosis yang timbul akibat induksi rotenon pada galur sel Glioblastoma Multiforme T98G. Metode : Penelitian eksperimental in vitro menggunakan kultur galur sel Glioblastoma Multiforme T98G yang diinduksi stres oksidatif dengan rotenon dosis 10M, 20M, dan 40M selama enam jam, selanjutnya dilakukan identifikasi morfologi sel menggunakan inverted mikroskop. Identifikasi jalur apoptosis intrinsik dengan cara menganalisis ekspresi protein sitokrom-C dan protein kaspase-9 menggunakan metode sandwich ELISA (Enzyme Linked Immuno Assay) serta identifikasi jalur apoptosis ekstrinsik dengan menganalisis ekspresi mRNA TRAIL (Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand) menggunakan q-RTPCR (quantitative-reverse transcriptase-Polymerase Chain Reaction) selain itu dilakukan pula elektroforesis hasil amplifikasi cDNA TRAIL pada agarosa 2%. Analisis statistik dilakukan menggunakan uji Mann Whitney pada tingkat kepercayaan 95%. Hasil : Induksi rotenon 10 M pada galur sel T98G menyebabkan meningkatnya kadar sitokrom C yang tidak disertai meningkatnya kadar kaspase-9 dan ekspresi mRNA TRAIL. Kadar sitokrom C turun menjadi setara dengan kadar pada sel kontrol saat induksi rotenon 20M disertai meningkatnya kadar kaspase-9 dan ekspresi mRNA TRAIL yang bermakna. Sedangkan Induksi rotenon 40M menyebabkan turunnya kadar sitokrom C, kaspase-9 dan mRNA TRAIL. Pada pemeriksaan elektroforesis hasil RT-PCR kami mendapatkan varian TRAIL sepanjang sekitar 300 bp yang ikut teramplifikasi bersama varian sTRAIL (soluble TRAIL) sepanjang 232 bp. Varian TRAIL panjang ini nampak ditranskripsi lebih banyak saat dilakukan induksi rotenon hingga 20M sementara varian pendek transkripsinya nampak semakin berkurang.

Kesimpulan : Pada penelitian kami, induksi rotenon 20M dapat menyebabkan terinduksinya jalur apoptosis intrinsik yang melibatkan kaspase serta jalur apoptosis ekstrinsik melalui pengaturan post transkripsi mRNA TRAIL pada galur sel Glioblastoma Multiforme T98G.

.....Background : Glioblastoma Multiforme (GBM) is the most common primary brain tumor in adults and the most aggressive gliomas classified by WHO as grade IV astrocytoma. Primary treatment of GBM is surgery followed by Chemoradiation give

the median survival only for about 14,6 months, this is due to difusse tumor growth with high therapy resistance. Apoptosis, named as “programmed cell death” is a mechanism of cell death that plays an important role in the treatment of cancer and

being a primary target of many cancer treatment strategies. There are two central pathways of apoptosis, the intrinsic pathway that involves the mitochondria and the extrinsic pathway induced by ligands binding to the death receptors. Rotenone,

respiratory chain inhibitor complex I mitochondria may increase endogenous superoxide (ROS) levels that induce intrinsic apoptotic pathway by release of cytochrome-C and several proapoptotic agents to cytosol.

Rotenone is a lipophilic

compound and could easily cross the Blood Brain Barrier that makes rotenone become an interesting candidate for GBM therapy. Up to now, the apoptosis mechanism induced by rotenone in GBM is not well known yet, therefore we aim to investigate the apoptosis pathways in Glioblastoma Multiforme T98G cell line

induced by rotenone. Methods : This experimental study in vitro using GBM T98G cell line cultured in complete DMEM medium. We induced oxidative stress for six hours with 10 M, 20 M and 40 M of rotenone respectively. After harvested, the cell morphology was identified using inverted microscope. We identified the intrinsic apoptotic pathway by analyzing the expression of cytochrome C protein and Caspase-9 protein using

sandwich ELISA method, furthermore we identified the extrinsic apoptotic pathway by analyzing the expression of mRNA TRAIL using q-RT-PCR followed by gel electrophoresis to confirm the amplification of cDNA TRAIL. Statistical analysis was performed by Mann Whitney test with 95% confidence intervals.

Results : Rotenone treatment of T98G resulted in increase of cytochrome C by 10M of rotenone but no increase of caspase-9 and mRNA TRAIL. While rotenone 20 M showed relative decrease of cytochrome C and increase of caspase-9 expression together with significant increase of the mRNA TRAIL expression ($p < 0,05$) and induction with 40M showed decrease of cytochrome C, caspase-9 and mRNA TRAIL

expression. In the electrophoresis examination of the RT-PCR product we obtain an isoform of TRAIL (length about 300 bp) was coamplified along with our isoform (soluble TRAIL, length about 232 bp). This long isoform band become more dens in samples induced by rotenone 20M, while the short isoform was gradually missing.

Conclusions : In our study, 20M of rotenone was able to induced both the intrinsic apoptotic pathway by caspase dependent mechanism and the extrinsic apoptotic pathway through post transcriptional regulating of mRNA TRAIL in Glioblastoma Multiforme T98G cell line.