

VIŠNJA BOGDANOVIĆ¹
KARMEN STANKOV²
ALEKSANDRA NIKOLIĆ³
IVANA IČEVIĆ⁴
SLAVICA ŠOLAJIĆ¹
GORDANA BOGDANOVIĆ¹
ALEKSANDAR ĐORĐEVIĆ⁴

¹Institut za onkologiju, Zavod za
eksperimentalnu onkologiju,
Sremska Kamenica

²Medicinski fakultet, Departman
za biohemiju, Novi Sad

³Institut za biološka istraživanja
"Dr Siniša Stanković", Beograd

⁴Prirodno-matematički fakultet,
Departman za hemiju, Novi Sad

NAUČNI RAD

*fulerenol+66.085.3+
+577.151.5:616.155.392

UTICAJ FULERENOLA NA AKTIVNOST ANTIOKSIDATIVNIH ENZIMA U OZRAČENOJ KULTURI ĆELIJA HUMANE ERITROLEUKEMIJE (K562)*

U uzorcima ćelijske kulture humane eritroleukemije (K562) ozračenim X-zracima doze 24 Gy i predtretiranim fulerenolom ($C_{60}(OH)_{24}$) koncentracije 10 nmol/mL određivana je aktivnost gama-glutamilttransferaze (γ -GT), ukupne superoksid-dismutaze (SOD) i glutation-peroksidaze (GSH-Px) 1, 24 i 48 sati nakon zračenja. Iradijacija povećava aktivnost sva tri ispitivana enzima. U 24-om i 48-om satu nakon zračenja zapaža se sniženje aktivnosti γ -GT u grupama predtretiranim fulerenolom. Fulerenol utiče na povišenje aktivnosti SOD u obe tretirane grupe, osim u grupi ozračenih uzoraka u 48-om satu gde je došlo do sniženja aktivnosti. Predtretman fulerenolom u zračenim grupama povećava, a u neozračenim eksperimentalnim grupama snižava aktivnost GSH-Px.

Potencijalno toksične reaktivne kiseonične vrste nastaju kako u normalnom ćelijskom metabolizmu, tako i u uslovima prooksidativnog stanja ćelije [1]. Oksidativni stres izazvan jonizujućim zračenjem može narušiti ćelijsku redoks homeostazu i dovesti do niza bioloških efekata uključujući mutacije [2], genetsku nestabilnost [3], ćelijsku transformaciju [4], poremećaj ćelijskog ciklusa [5], apoptozu i ćelijsku smrt [6]. Proces oksidacije slobodnim radikalima generiše u ćeliji nepovoljno oksidativno okruženje koje udruženo sa direktnim radijacionim efektima može indukovati karcinogenezu [7,8]. Mehanizmi oksidacije podrazumevaju jedno-elektronske obrasce koji uključuju hemijske vrste kao što su superoksid i hidroksil radikal, kao i dvo-elektronske puteve koji se odnose na neradikalne oksidante kao što je vodonik-peroksid [9]. Enzimi antioksidativne odbrane imaju glavnu ulogu u endogenoj zaštiti ćelije od oksidativnog oštećenja. Dediferencirane, brzoproliferišuće ćelijske linije su osetljive prema visokim dozama zračenja, a nivo radiosenzitivnosti zavisi od morfoloških i funkcionalnih karakteristika ćelija [10]. Citotoksičnost adiranih vodorastvornih fulerena dokazana je na eksperimentalnim *in vitro* modelima za mnoge ćelijske linije [11–19]. U ozračenom rastvoru fulerenoli formiraju fulerenol radikal $C_{60}(OH)_{18}$ [20,21] i kiseonične radikale (O_2^- , OH) [5,22–24]. S druge strane, poznato je da fulerenoli mogu biti efikasni skupljači slobodnih radikala i snažni antioksidansi kako *in vitro*, tako i *in*

vivo [25–30]. U našoj studiji ispitivali smo uticaj vodorastvornog fulerenola ($C_{60}(OH)_{24}$) nanomolarne koncentracije dodatog u uzorke humane maligne hematopoetske ćelijske linije K562 ozračene visokom dozom X-zračenja na nivo aktivnosti tri antioksidativna enzima: gama-glutamilttransferaze (γ -GT), ukupne superoksid-dismutaze (SOD) i glutation-peroksidaze (GSH-Px).

MATERIJAL I METODE

U istraživanju je korišćena komercijalna humana hematopoetska ćelijska linija K562 [31]. Eritroleukemijske K562 ćelije rastu u hranljivom medijumu RPMI 1640 sa dodatkom 2mM glutamina, 10% FCS (fetalni teleći serum, NIVNS – Veterinarski Institut, Novi Sad) i antibiotika: 100 IU/mL penicilina i 100 μ g/mL streptomicina (ICN). Rastu u flaskonima (Costar, 25 cm² u zapremini od 10 mL), u inkubatoru na 37 °C u atmosferi sa 100% vlažnosti i 5% CO₂.

Polihidroksilni derivat fulerena, fulerenol, $C_{60}(OH)_{24}$, sintetisan je i karakteriziran u laboratorijama Departmana za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu.

Uzorci K562 ćelija posađeni su u Petrijeve posude ($1 \cdot 10^5$ ćelija/1mL medijuma sa 10% FCS) ukupne zapremine 5 mL. Fulerenol je rastvoren u destilovanoj vodi i dodat u medijum sa ćelijama pola sata pre zračenja u finalnoj koncentraciji od 10 nmol/mL. Eksperimentalni uzorci su jednokratno ozračeni X-zracima doze 24 Gy na radioterapijskom aparatu LINAC Mevatron Siemens MD 7475 (10 MV X-zraka), brzinom doze od 3 Gy/min [9]. Nakon isteka inkubacionog perioda od 1, 24 i 48 sati, broj ćelija je određen testom odbacivanja boje (DET) kao što je prethodno opisano [5]. Citosolna frakcija dobijena je ultrasonifikacijom (Soniprep 150 MSE), uzorci su centrifugirani 10 minuta na 4 °C /10000 rpm i zam-

*Rad saopšten na skupu "Peti seminar mladih istraživača", Beograd, decembar 25–26, 2006.

Adresa autora: V. Bogdanović, Institut za onkologiju, Zavod za Eksperimentalnu onkologiju, Sremska Kamenica

E-mail: cherrybo@nspoint.net

Rad primljen: Decembar 25, 2007.

Rad prihvaćen: Februar 06, 2007.

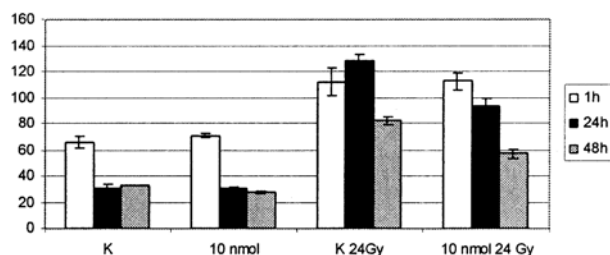
rznuti na -80°C . Supernatant je korišćen za određivanje aktivnosti gama-glutamyltransferaze (γ -GT) metodom Szasz-a [32], ukupne superoksid-dismutaze (SOD) adrenalinskom metodom [33] i glutation-peroksidaze (GSH-Px) Beutlerovom metodom [34]. Rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost četiri merenja \pm standardna devijacija. Aktivnost enzima je izražena na milion ćelija.

REZULTATI I DISKUSIJA

Zračenje značajno utiče na povišenje aktivnosti enzima gama-glutamyltransferaze u svim vremenskim tačkama eksperimenta (slika 1). S obzirom da je γ -GT ključan u regulaciji nivoa ćelijskog glutaciona, povišenje njegove aktivnosti ukazuje na dodatne potrebe ćelije za sintezom ovog tripeptida, odnosno na težnju ćelije da u uslovima oksidativnog stresa održi redoks homeostazu [35]. Predtretman ćelija fulerenolom snižava aktivnost ovog enzima, naročito u 24-om i 48-om satu nakon zračenja, što govori u prilog antioksidativne aktivnosti fulerenola u smislu održavanja ćelijskog pula glutaciona.

Nivo aktivnosti superoksid dismutaze značajno je povišen u zračenim eksperimentalnim grupama nakon prve ćelijske deobe (slika 2).

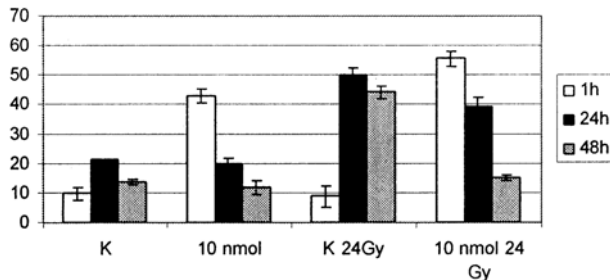
Aktivnost γ GT
mU/10⁶ ćelija



Slika 1. Aktivnost gama-glutamyltransferaze (mU/10⁶ ćelija) u uzorcima ćelijske kulture K562.

Figure 1. The activity of gamma-glutamyltransferase (mU/10⁶ cell) in cell culture K562 samples

Aktivnost SOD
U/10⁶ ćelija

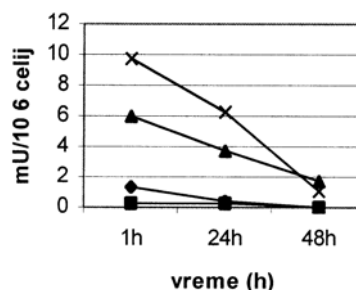


Slika 2. Aktivnost ukupne superoksid-dismutaze (U/10⁶ ćelija) u uzorcima ćelijske kulture K562.

Figure 2. The activity of total superoxide-dismutase (U/10⁶ cell) in cell culture K562 samples.

Ovi rezultati su u skladu sa našim prethodnim istraživanjima, kao i podacima o oksidativnom oštećenju ćelije nastalom radiolizom vode i posledičnoj aktivaciji antioksidativnog sistema odbrane [10]. Predtretman fulerenolom utiče na povišenje aktivnosti SOD u obe tretirane grupe, što se u neozračenju grupi teoretski može pripisati sposobnosti fulerenola da u medijumu spontano otpušta slobodne radikale pri dnevnoj svetlosti [21]. Zračenje suspenzija koje sadrže vodorastvorne fulerene potencira njihovu prooksidativnu aktivnost [36], što je i moguće objašnjenje za rezultate u predtretiranoj zračenju grupi gde je povišena aktivnost SOD logičan odgovor na nastalo oksidujuće okruženje u ćeliji. Zračenje povećava i aktivnost glutation-peroksidaze (slika 3).

Aktivnost GSH-Px
mU/10⁶ ćelija



Slika 3. Aktivnost glutathion-peroksidaze (mU/10⁶ ćelija) u uzorcima ćelijske kulture K562.

Figure 3. The activity of glutathion-peroxidase (mU/10⁶ cell) in cell culture K562 samples.

Predtretman fulerenolom povećava aktivnost GSH-Px u zračenim, a snižava u neozračenim eksperimentalnim grupama, što se delimično može objasniti najpre posledičnom aktivacijom enzima zbog povišenja aktivnosti SOD, a zatim i inhibicijom aktivnog centra GSH-Px usled velike količine supstrata u citosolu ćelije [10].

ZAKLJUČCI

Zračenje utiče na povišenje aktivnosti sva tri ispitivana enzima. U 24-om i 48-om satu nakon zračenja zapaža se sniženje aktivnosti γ -GT u grupama predtretiranim fulerenolom. Fulerenol utiče na povišenje aktivnosti SOD u obe tretirane grupe, osim u grupi ozračenih uzoraka u 48-om satu gde je došlo do sniženja aktivnosti. Predtretman fulerenolom povećava aktivnost GSH-Px u zračenim, a snižava u neozračenim eksperimentalnim grupama.

ZAHVALNICA

Istraživanja su realizovana u okviru naučnog projekta broj 142076B Ministarstva za nauku i zaštitu životne sredine Republike Srbije.

LITERATURA

- [1] W. Droge, *Physiol. Rev.* **82** (2002) 47–95.
- [2] J.F. Ward, *Radiat. Res.* (1995) 362–368.
- [3] A. Kronenberg, *Int. J. Radiat. Biol.* **66** (1994) 603–609.
- [4] R. Cox, *Int. J. Radiat. Biol.* **65** (1994) 57–64.
- [5] A. Maity, W.G. McKenna, R.J. Muschel, *Radiother. Oncol.* **31** (1994) 1–13.
- [6] K.M. Prise, M. Schettino, M. Folkard, K.M. Held, *Lancet Oncol.* **6** (2005) 520–528.
- [7] S.P. Yarmonenko, *Radiobiology of Humans and Animals*, Moscow, Mir Publishers, 1988.
- [8] P. Cerruti, R. Ghos, Y. Oya, P. Amstad, *Environ. Health Perspect.* **102** (1994) 100–102.
- [9] J.K. Leach, K.M. Black, R.K. Schmidt-Ullrich, R.B. Mikkelsen, *J. Biol. Chem.* **277** (18) (2000) 15400–15406.
- [10] V. Bogdanović, Magistarski rad, Univerzitet u Novom Sadu, 2000.
- [11] A. Đorđević, G. Bogdanović, S. Dobrić, J. BUON **11** (2006) 391–404.
- [12] V. Kojić, D. Jakimov, G. Bogdanović, A. Djordjević, *Mater. Sci. Forum* **494** (2005) 543–548.
- [13] K. Irie, Y. Nakamura, H. Ohigashi, H. Tokuyama, S.Y. Yamago, E. Nakamura, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60** (1996) 1359–1361.
- [14] E. Nakamura, H. Tokuyama, T. Yamago, Y. Shiraki, Y. Sugiura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **69** (1996) 2143–2151. (in English)
- [15] X.L. Yang, C.H. Fan, H.S. Zhu, *Toxicol. in Vitro* **16** (2002) 41–46.
- [16] S.H. Friedman, D.L. DeCamp, R.P. Sijbesma, G. Srdanov, F. Wudl, *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 6505–6509.
- [17] T.H. Ueng, J.J. Kang, H.W. Wang, Y.W. Cheng, L.Y. Chaing, *Toxicol. Lett.* **93** (1997) 29–33.
- [18] T.H. Ueng, J.J. Kang, H.W. Wang, Y.W. Cheng, L.Y. Chaing, *Fullerene Sci. Technol.* **7** (1999) 681–694.
- [19] D.J. Wol, C.M. Barbieri, C.F. Richardson, D.I. Schuster, S.R. Wilson, *Arch. Biochem. Biophys.* **399** (2002) 130–141.
- [20] B. Vilen, M. Sienkiewicz, M. Lekka, J.A. Kulik, L. Forro, *Carbon* **42** (2004) 1195–1198.
- [21] K.D. Pickering, M.R. Wiesner, *Environ Sci Technol.* **39** (2005) 1359–1365.
- [22] C.M. Sayes, J.D. Fortner, W. Guo, D. Lyon, A.M. Boyd, K.D. Ausman, *Nanoletters*, (2004).
- [23] G. Bogdanović, M. Vojinović-Miloradov, V. Kojić, A. Đorđević, J. Čanadi, Đ. Koruga, V.V. Baltić, D. Tabš, *Arch. Oncology* **5/3** (1997) 147.
- [24] Y. Yamakoshi, T. Yagami, S. Sueoshi, N. Miyata, *J. Org. Chem.* **61** (1996) 7236–7237.
- [25] Y. Yamakoshi, S. Sueoshi, K. Fukuhara, N. Miyata, *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1996) 12363–12364.
- [26] L.L. Dugan, J.K. Gabrielsen, S.P. Yu, T.S. Lin, D.W. Cho, *Neurobiology Dis.* **3** (1996) 129–135.
- [27] A. Djordjević, J. Canadanovic-Brunet, M. Vojinović-Miloradov, G. Bogdanovic, *Oxid Commun.* **27** (2005) 806–812.
- [28] S.C. Chuech, M.K. Lai, M.S. Lee, L.Y. Chiang, T.I. Ho, S.C. Chen, *Transplant. Proc.* **31** (1999) 1976–1977.
- [29] G. Bogdanovic, V. Kojic, A. Djordjevic, J. Canadanovic-Brunet, M. Vojinovic-Miloradov, V.V. Baltic, *Toxicol. In Vitro* **18** (2004) 629–637.
- [30] S. Mirkov, A. Djordjevic, N. Andric, T. Kostic, R. Kovacevic, M. Vojinovic Miloradov, *Nitric Oxide Biol Chem* **11** (2004) 201–207.
- [31] R. Hay, M. Macu, C.R. Chen, P. McClintoc, Y. Reid, *American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas*, 6th edition, 1988.
- [32] G. Szasz, *Clin. Chem.* **14** (1969) 124–?
- [33] H.P. Mishra, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.*, (1972).
- [34] E. Beutler, *A Manual of Biochemical Methods*, 3rd edition, London, 1984.
- [35] S. Uhlig, A. Wendel, *Life Sci.* **1** (1992) 1083–1094.
- [36] Y.I. Prylutsky, V.M. Yashchuk, K.M. Kushnir, et al, *Mater. Sci. Eng. C* **23** (2003) 109–111.

SUMMARY

THE INFLUENCE OF FULLERENOL ON ANTIOXIDATIVE ENZYME ACTIVITY IN IRRADIATED HUMAN ERYTHROLEUKEMIC CELL LINE (K562)

(Scientific paper)

Višnja Bogdanović¹, Karmen Stankov², Aleksandra Nikolić³, Ivana Ičević⁴, Slavica Šolajić¹, Gordana Bogdanović¹, Aleksandar Djordjević⁴¹Institute for Oncology, Sremska Kamenica, Serbia²Faculty of Medicine, Department for Biochemistry, Novi Sad, Serbia³Institute for Biological Research "Siniša Stanković", Belgrade, Serbia⁴Faculty of Sciences, Department of Chemistry, Novi Sad, Serbia

Cell culture K562 samples were treated with fullereneol (C₆₀(OH)₂₄) at a concentration of 10 nmol/mL and thereafter irradiated with X-rays (24Gy). The activity of gamma-glutamyltransferease (γ-GT), total superoxide-dismutase (SOD) and glutathion-peroxidase (GSH-Px) was determined 1, 24 and 48 hours after irradiation. Irradiation induces an increase in the activity of all the investigated enzymes. Fullereneol in the applied dose decreased the γ-GT activity 24 and 48 h after irradiation. The total SOD activity is increased in both pretreated groups except in the irradiated group at the 48th hour. Treatment with fullereneol before irradiation increased GSH-Px activity in irradiated groups and decreased it in the control groups.

Key words: X-irradiation • Cell culture • Antioxidative enzymes •

Ključne reči: X-zračenje • Ćeljska kultura • Fulerenol • Antioksidativni enzimi •