

IVANA IČEVIĆ¹
VIŠNJA BOGDANOVIĆ²
DRAGAN ŽIKIĆ³
SLAVICA ŠOLAJIĆ²
GORDANA BOGDANOVIĆ²
ALEKSANDAR ĐORĐEVIĆ¹

¹Prirodno–matematički fakultet,
Departman za hemiju,
Novi Sad

²Institut za onkologiju,
Zavod za eksperimentalnu
onkologiju, Sremska Kamenica

³Poljoprivredni fakultet,
Departman za stočarstvo,
Novi Sad

NAUČNI RAD

*fulerenol +66.085.3:576.3:616.155.392

UTICAJ FULERENOLA NA BROJ, POVRŠINU ĆELIJA I SPOSOBNOST FORMIRANJA ĆELIJSKIH KOLONIJA U OZRAČENOJ KULTURI HUMANE ERITROLEUKEMIJE (K562)*

U uzorcima ćelijske kulture humane eritroleukemije (K562) jednokratno ozračenim X–zracima doze 24 Gy i predtretiranim fulerenolom (C₆₀(OH)₂₄) koncentracije 10 nmol/mL određivan je broj ćelija DET (dye exclusion testom) dok je površina ćelija određena kompjuterskom analizom slika. Analizirani su ćelijski preparati dobijeni citocentrifugiranjem i bojenjem po May–Grünvald Giemsi (MGG). Praćena je i sposobnost formiranja ćelijskih kolonija kvantitativnim CFU (colony forming unit) testom. Zraćenje snižava broj K562 ćelija u kulturi, dok predtretman sa fulerenolom značajno povećava broj ćelija u 24–om i 48–om satu eksperimenta. Površina ćelija je veća, a broj formiranih kolonija nakon zraćenja značajno je manji u odnosu na predtretirane grupe u svim vremenskim tačkama eksperimenta. Predtretman fulerenolom održava površinu ćelija manjom, a broj kolonija većim u odnosu na ćelije u zračenim grupama.

Jonizujuće zraćenje direktnim i indirektnim dejstvom na eukariotsku ćeliju dovodi do niza bioloških efekata uključujući mutacije [1], genetsku nestabilnost [2], ćelijsku transformaciju [3], poremećaj ciklusa [4], apoptozu i ćelijsku smrt [5]. Mehanizmi putem kojih ćelije prepoznaju i amplifikuju jonizacione događaje nakon zraćenja predstavljaju pro i anti–proliferativne signale čiji balans određuje dalju sudbinu ćelije [6]. Dediferencirane, brzoproliferišuće ćelijske linije su osetljive prema visokim dozama zraćenja, a nivo radiosenzitivnosti zavisi od morfoloških i funkcionalnih karakteristika vezanih za vrstu ćelija [7].

Antiproliferativna i citotoksična aktivnost polihidroksilovanih fulerena C₆₀, fulerenola C₆₀(OH)_n je ispitan na različitim biološkim modelima [8–11]. U ozračenom rastvoru fulerenol daje fulerenol radikal C₆₀(OH)₁₈[•] [12,13] i kiseonične radikale (O₂^{•-}, OH[•]) [5,14]. Ove visoko reaktivne hemijske vrste prodiru u ćeliju i dovode do ćelijskog oštećenja, prekida u DNK lancima i ćelijske smrti [15–18]. S druge strane, poznato je da fulerenoli mogu biti efikasni hvatači slobodnih radikala i snažni antioksidansi kako in vitro, tako i in vivo uslovima [19–24]. Istraživanja u vezi radioprotektivnosti fulerenola još su u začetku. Poznato je da fulerenol C₆₀(OH)₂₄ u koncentraciji od 10 mg/kg pokazuje radioprotektivni efekat kod pacova

koji se može porediti sa komercijalnim radioprotektorom amifostinom [25]. U našoj studiji smo putem praćenja broja ćelija, njihove površine, kao i sposobnosti formiranja kolonija ispitivali moguće radioprotektivno dejstvo vodorastavnog fulerenola (C₆₀(OH)₂₄) dodatog u nanomolarnim koncentracijama u uzorke humane maligne hematopoetske ćelijske linije K562 ozraćene visokom dozom X–zraćenja.

MATERIJAL I METODE

U istraživanju je korišćena komercijalna humana hematopoetska ćelijska linija K562 [26]. Eritroleukemijske K562 ćelije rastu u hranljivom medijumu RPMI 1640 sa dodatkom 2 mM glutamina, 10% FCS (fetalni teleći serum, NIVNS – Veterinarski Institut, Novi Sad) i antibiotika: 100 IU/mL penicilina i 100 µg/mL streptomocina (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.

Polihidroksilovani derivat fulerena, fulerenol, C₆₀(OH)₂₄, sintetisan je i karakterisan u laboratorijama Departmana za hemiju Prirodno–matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu.

Uzorci K562 ćelija posadeni su u Petrijeve posude (1 · 10⁵ ćelija/1 mL medijuma sa 10% FCS) ukupne zapremine 5 mL. Fulerenol je rastvoren u destilovanoj vodi i dodat u medijum sa ćelijama 30 minuta pre zraćenja u finalnoj koncentraciji od 10 nmol/mL. Eksperimentalni uzorci su jednokratno ozraćeni X–zracima doze 24 Gy na radioterapijskom aparatu LINAC Mevatron Siemens MD 7475 (10 MV X–zraka), brzinom doze od 3 Gy/min [7]. Nakon isteka inkubacionog perioda od 1, 24 i 48 sati, broj ćelija je određen testom odbacivanja boje (DET) kao što je

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

Adresa autora: A. Đorđević, Prirodno–matematički fakultet, Departman za hemiju, Novi Sad

E–mail: dvadj@ih.ns.ac.yu

Rad primljen: Decembar 25, 2006.

Rad prihvaćen: Februar 06, 2007.

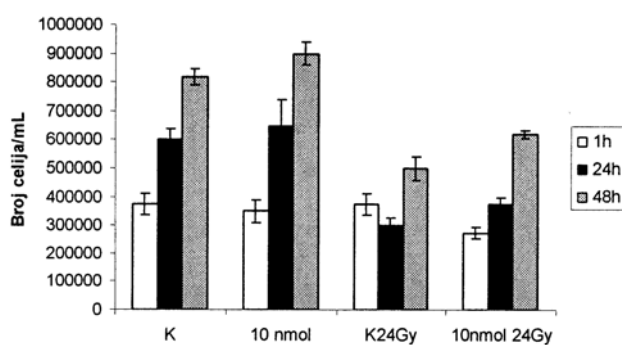
prethodno opisano [5]. Rezultati su predstavljani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija iz kvadrplikata brojanja.

Morfološke promjene u preživjelim K562 ćelijama praćene su i fotografisane pod svetlosnim mikroskopom sa uvećanjem od $100\times$ (Olympus BX51) na citospin preparatima bojenim May-Grünvald Giemsa (MGG) metodom. Preparati su dobijeni centrifugiranjem na citospin centrifugi (Shandon Cytospin 3) pri 800 rpm/min, sa 10.000 ćelija/100 μL u svakoj komori centrifuge. Površina ćelija u μm^2 je merena sa tačnošću od 6,57 piksela. U svakoj eksperimentalnoj grupi analizirano je 100 ćelija.

Sposobnost zračenih i fulerenolom predtretiranih ćelija da formiraju kolonije praćena je pomoću kvantitativnog CFU (Colony Forming Unit) testa [27]. Ćelije su nakon tretmana 10 nmol/mL fulerenolom i X-zracima inkubirane po gore navedenom protokolu, a zatim u koncentraciji od $3,5 \cdot 10^3$ posađene u hranjivi agar. Nakon 10 dana rasta prebrojane su formirane kolonije. Istraživanja su izvedena literatura, u duplikatu.

REZULTATI I DISKUSIJA

Broj ćelija praćen DET testom pokazao je da doza od 24 Gy dovodi do smrti polovine zračenih ćelija nakon 24 h inkubacije (slika 1). Ovakav rezultat je u korelaciji sa našim prethodnim istraživanjima [7] kao i sa literaturnim izvorima u kojima se govori o oštećenju dvostrukog lanca DNK i posledičnoj masivnoj apoptozi u prva 24 sata nakon zračenja [7,28]. Period oporavka u broju ćelija nastupio je 48 h nakon zračenja. Ovo je u skladu sa literaturnim podacima [28] koji ukazuju da neoštećene ćelije nastavljaju sa deobom u postradijacionom periodu od tri dana. Fu-



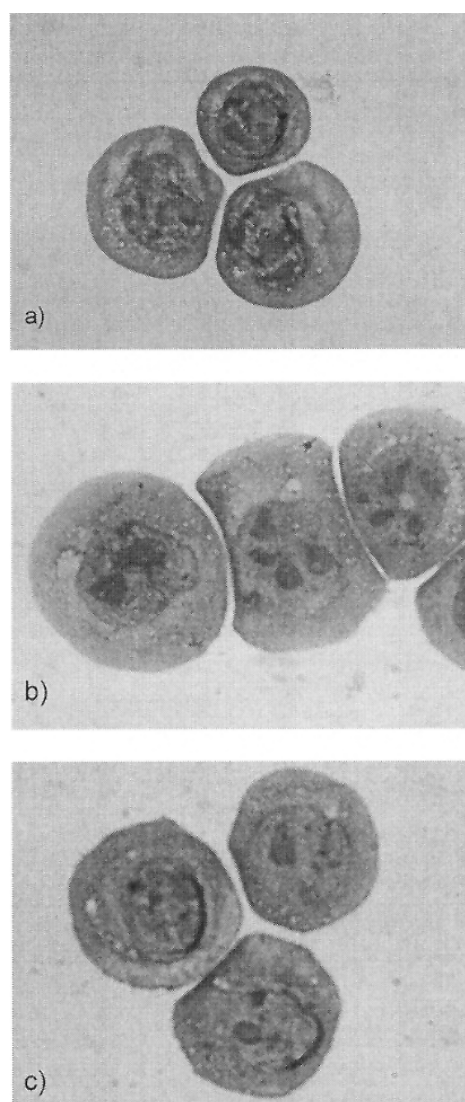
Slika 1. Broj ćelija po mililitru u uzorcima ćelijske kulture K562. K – kontrolna nezraćena grupa; K24Gy – kontrolna zraćena grupa; 10 nmol – nezraćena grupa predtretirana fulerenolom; 10 nmol 24Gy – zraćena grupa predtretirana fulerenolom.

Figure 1. The number of cells per mL in the K562 eritroleucemic cell line. K – control unirradiated group; K24Gy – control irradiated group; 10 nmol – unirradiated group pretreated with fullerene; 10nmol 24Gy – irradiated group pretreated with fullerene.

lerenol primenjen u koncentraciji od 10 nmol/mL ispljio je radioprotektivni efekat u 24-om satu eksperimenta (slika 1).

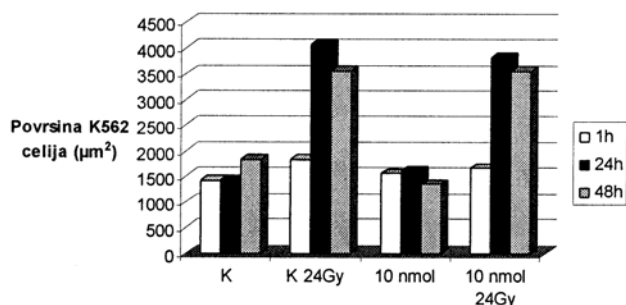
Morfološki, ozraćene K562 ćelije pokazuju promene na membrani slične bubrenju u ranoj apoptozi. Ćelije su "džinovske", sa velikim jedrima i mnogo vakuola, kao značajnim pokazateljima oštećenja. Ozraćene ćelije predtretirane fulerenolom po svom ćelijskom integritetu podsećaju na kontrolne ćelije (slika 2).

Kompjuterskom analizom slika određena je ćelijska površina i rezultati su pokazali da ozraćene će-



Slika 2. Morfološki izgled K562 ćelija: a) Kontrolna grupa; b) Grupa ozraćena dozom od 24Gy; c) Grupa ozraćena dozom od 24Gy i predtretirana fulerenolom koncentracije 10 nmol/mL.

Figure 2. Morphology of the K562 cells: (a) control group; (b) group irradiated with a dose of 24 Gy; (c) group irradiated with a dose of 24 Gy pretreated with fullerene of the concentration of 10 nmol/mL.

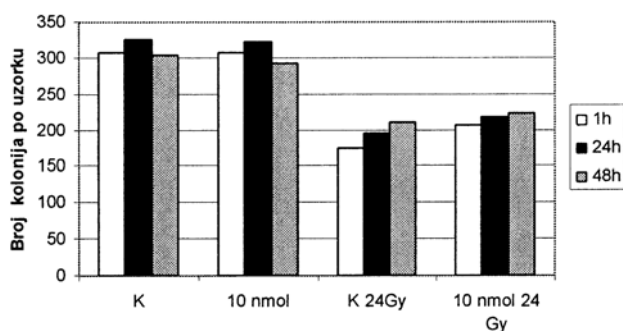


Slika 3. Površina ćelija (μm^2) u uzorcima ćelijske kulture K562. K – kontrolna nezračena grupa; K24Gy – kontrolna zračena grupa; 10 nmol – nezračena grupa predtretirana fulerenolom; 10 nmol 24Gy – zračena grupa predtretirana fulerenolom.

Figure 3. Cell area (μm^2) in the K562 eritroleucemic cell line. K – control unirradiated group; K24Gy – control irradiated group; 10 nmol – unirradiated group pretreated with fullerene; 10 nmol 24Gy – irradiated group pretreated with fullerene.

lije imaju značajno veću ćelijsku površinu nego kontrolne ćelije u svim tačkama eksperimenta. Ćelije predtretirane fulerenolom koncentracije 10 nmol/mL su imale za 6,03% manju ćelijsku površinu u odnosu na zračene ćelije nakon 24 časa (slika 3).

Praćenjem broja formiranih kolonija kvantitativnim CFU testom utvrđeno je da nema statistički značajne razlike između kontrolne i predtretirane nezračene grupe u svim vremenskim tačkama eksperimenta. Nakon tretmana zračenjem sposobnost ćelija da formiraju kolonije smanjena je za oko 50% u svim posmatranim intervalima vremena. Predtretman fulerenolom ima protektivni efekat na sposobnost ćelija da formiraju kolonije (slika 4).



Slika 4. Broj ćelijskih kolonija po uzorku ćelijske linije K562. K – kontrolna nezračena grupa; K24Gy – kontrolna zračena grupa; 10 nmol – nezračena grupa predtretirana fulerenolom; 10 nmol 24Gy – zračena grupa predtretirana fulerenolom.

Figure 4. The number of cell colony in the K562 eritroleucemic cell line. K – control unirradiated group; K24Gy – control irradiated group; 10 nmol – no irradiated group pretreated with fullerene; 10 nmol 24Gy – irradiated group pretreated with fullerene.

ZAKLJUČCI

Zračenje snižava broj K562 ćelija u kulturi, dok predtretman sa fulerenolom značajno povećava broj ozračenih ćelija u 24–om i 48–om satu eksperimenta. Površina ćelija je veća, a broj formiranih kolonija nakon zračenja značajno je manji u odnosu na predtretirane grupe u svim vremenskim tačkama eksperimenta. Predtretman fulerenolom u koncentraciji od 10 nmol/mL omogućava zadržavanje normalnih morfoloških karakteristika zračenih ćelija kao i smanjenje ćelijske površine u odnosu na kontrolnu zračenu grupu.

ZAHVALNICA

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

LITERATURA

- [1] J.F. Ward, *Radiat. Res.*, **142** (1995) 362–368.
- [2] A. Kronenberg, *Int. J. Radiat. Biol.* **66** (1994) 603–609.
- [3] Cox, R., *Int. J. Radiat. Biol.* **65** (1994) 57–64.
- [4] A. Maity, W.G. McKenna, R.J. Muschel, *Radiother. Oncol.* **31** (1994) 1–13.
- [5] K.M. Prise, G. Schettino, M. Folkard, K.D. Held, *Lancet Oncol.* **6** (2005) 520–528.
- [6] J.K. Leach, S.M. Black, R.K. Schmidt-Ullrich, R.B. Mikkelsen, *J. Biol. Chem.* **277**, **18** (2000) 15400–15406.
- [7] V. Bogdanović, Msc. Thesis, 2000.
- [8] C.M. Sayes, J.D. Fortner, W. Guo et al. *Nano Lett.* **4** (2004) 1881–1887.
- [9] V. Kojic, D. Jakimov, G. Bogdanovic, A. Djordjevic, *Mater. Sci. Forum* **494** (2005) 543–548.
- [10] H. Yamawaki, N. Iwai. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **290** (2006) 1495–1502.
- [11] A. Djordjevic, G. Bogdanovic S. Dobric, *J. BUON* **11** (2006) 391–404.
- [12] K.D. Pickering, M.R. Wiesner, *Environ. Sci. Technol.* **39** (2005) 1359–1365.
- [13] C.M. Sayes, J.D. Fortner, W. Guo, D. Lyon, A.M. Boyd, K.D. Ausman, *Nanolett.* 2004.
- [14] B. Vilen, M. Sienkiewicz, M. Lekka, J.A. Kulik, L. Forro, *Carbon* **42** (2004) 1195–1198.
- [15] E. Nakamura, H. Tokuyama, S. Yamago, T. Shiraki, Y. Sugiura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **69** (1996) 2143–2151. (in English).
- [16] G. Bogdanović, M. Vojinovic–Miloradov, V. Kojić, A. Dorđević, J. Čanadi, Đ. Koruga, V.V. Baltić, D. Tabš, *Arch. Oncology* **5/3** (1997) 147.
- [17] Y. Yamakoshi, T. Yagami, S. Sueoshi, N. Miyata, *J. Org. Chem.* **61** (1996) 7236–7237.
- [18] Y. Yamakoshi, S. Sueoshi, K. Fukuhara, N. Miyata, *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1996) 12363–12364.
- [19] G. Bogdanovic, V. Kojic, A. Djordjevic, J. Canadanovic–Brunet, M. Vojinovic–Miloradov, V.V. Baltic, *Toxicol. In Vitro* **18** (2004) 629–637.

- [20] S. Mirkov, A. Djordjevic, N. Andric, T. Kostic, R. Kovacevic, M. Vojinovic Miloradov, Nitric Oxide Biol Chem **11** (2004) 201–207.
- [21] S. Trajković, S. Dobrić, V. Jačević, V. Dragojević-Simić, Z. Milovanović, A. Đorđević, Colloids Surf, B: Biointerfaces, **58** (2007) 39–43.
- [22] H.S. Lai, W.J. Chen, L.Y. Chiang, World J. Surgery **24** (2000) 450–454.
- [23] A. Djordjevic, J. Canadanovic-Brunet, M. Vojinovic-Miloradov, G. Bogdanovic, Oxid Commun. **27** (2005) 806–812.
- [24] V. Djordjevic Milic, A. Djordjevic, S. Dobric et al. Mater. Sci. Forum **518** (2006) 525–529.
- [25] S. Trajkovic, S. Dobric, A. Đorđević, V. Dragojević-Simić, Z. Milovanovic, Mater. Sci. Forum **494** (2005) 549–554.
- [26] R. Hay, M. Macu, C.R. Chen, P. McClinton, Y. Reid, American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, 6th edition, 1988.
- [27] M.C. Cañizo, A. Mota, A. Orfao, J. Galende, M.D. Caballero, G.A. Garcia Marcos, J.F. San Miguel, J. Clin. Pathol. **49** (1996) 450–452.
- [28] R. Mustonen, G. Bouvier, G. Wolber, M. Stohr, P. Peschke, H. Bartsch, Mut. Res. **429** (1999) 169–179.

SUMMARY

THE INFLUENCE OF FULLERENOL ON THE CELL NUMBER, CELL AREA AND COLONY FORMING UNIT ABILITY IN IRRADIATED HUMAN ERYTHROLEUKEMIC CELL LINE

(Scientific paper)

Ivana Ičević¹, Višnja Bogdanović², Dragan Žikić³, Slavica Šolajić², Gordana Bogdanović², Aleksandar Djordjević¹

¹Faculty of Sciences, Department of Chemistry, Novi Sad, Serbia

²Institute for Oncology, Sremska Kamenica, Serbia

³Faculty of Agriculture, Novi Sad, Serbia

DET (dye exclusion test) cell count and cell area by computer analysis of the images were determined in cell lines of human erythroleukemia (K562), which were irradiated with X-rays in one dose of 24 Gy and pretreated with 10 nmol/mL fullereneol (C₆₀(OH)₂₄). Cell samples obtained using a citocentrifuge and May-Grünwald Giemsa (MGG) during, were analysed. The cell colony formation ability was monitored using quantitative CFU (colony forming unit) test. Irradiation decreases the number of K562 cells, but fullereneol significantly increases cell number on 24th and 48th hour of the experiment. Cell area is larger, and the number of formed cell colonies after irradiation is significantly smaller compared to pretreated groups during the whole experiment. Pretreatment with fullereneol maintains a smaller cell area, and the number of colony formed units was larger compared to the irradiated cells.

Key words: Fullereneol • X-Ray
• Cell lines •

Ključne riječi: Fulerenol • X-zračenje
• Čelijska kultura •