



M-63

UNIVERZITET U NIŠU
Tehnološki fakultet, Leskovac

ZBORNIK RADOVA

16

Leskovac, 2007.

TEHNOLOŠKI FAKULTET U LESKOVCU

Za izdavača: prof. dr Milorad Cakić

Urednik: prof. dr Mihajlo Stanković

Štampa: Grafoplus, Leskovac

Tiraž: 50 primeraka

ISSN 0352-6542

PREDGOVOR

Na Tehnološkom fakultetu u Leskovcu, 19. i 20. oktobra 2007. godine, održan je VII Simpozijum sa međunarodnim učešćem "Savremene tehnologije i privredni razvoj". Prijavljeno je 159 radova i 11 plenarnih i sekcijских predavanja u okviru osam sekcija: Sekcija za biohemijsko inženjerstvo, Sekcija za prehrambeno inženjerstvo, Sekcija za hemijsko inženjerstvo, Sekcija za inženjerstvo zaštite životne sredine, Sekcija za organske hemijske tehnologije i polimerno inženjerstvo, Sekcija za tekstilno inženjerstvo i Sekcija za socijalno ekonomske implikacije novih tehnologija. Sekcija za socijalno-ekonomske implikacije novih tehnologija realizovana je u saradnji sa Visokom poslovnom školom strukovnih studija iz Leskovca.

Na predlog Naučnog odbora, učesnicima Simpozijuma upućen je poziv da pripreme izložene radove za štampanje Zbornika radova. Zbornik sa dva plenarna i tri sekcijска predavanja, kao i 28 recenzirana rada, izdat je u tiražu od 50 primeraka.

Održavanje Simpozijuma finansijski su pomogli:

- Ministarstvo nauke Republike Srbije
- "Zdravlje" Actavis Company, Leskovac
- Opština Leskovac.

U ime Naučnog i Organizacionog odbora Simpozijuma, Urednik zahvaljuje svim autorima radova i recenzentima na saradnji, a donatorima na finansijskoj podršci.

Urednik

RECENZENTI:

1. F.E. Okieimen, Department of Chemistry, University of Benin, Benin City, Nigeria,
2. Danica Mislovičova, Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia
3. Dejan Skala, Texas A&M, Qatar (TAMUQ), Doha, Qatar
4. Ghasem Najafpour, University of Mazandaranm, Babol, Iran
5. Marija Ačanski, Tehnološki fakultet, Novi Sad
6. Stevan Popov, Tehnološki fakultet, Novi Sad
7. Jaroslava Budinski Simendić, Tehnološki fakultet, Novi Sad
8. Mirjana Kostić, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd
9. Bojana Obradović, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd
10. Sofija Sovilj, Hemijski fakultet, Beograd
11. Nada Balaban Zdujić
12. Radoslav Grujić, Tehnološki fakultet, Banja Luka, RS, BIH
13. Branka Rodić Grabovac, Tehnološki fakultet, Banja Luka, RS, BIH
14. Vlada Veljković, Tehnološki fakultet, Leskovac
15. Mihajlo Stanković, Tehnološki fakultet, Leskovac
16. Dragiša Savić, Tehnološki fakultet, Leskovac
17. Miodrag Lazić, Tehnološki fakultet, Leskovac
18. Nada Nikolić, Tehnološki fakultet, Leskovac
19. Ivana Banković Ilić, Tehnološki fakultet, Leskovac
20. Zoran Todorović, Tehnološki fakultet, Leskovac
21. Ljubiša Nikolić, Tehnološki fakultet, Leskovac

**EFEKAT α -TOKOFEROLA NA KOLIČINU SLOBODNIH TIOLA I SOD
AKTIVNOST KOD K562 ČELIJA**Snežana Spasić¹, Olga Martinov¹, Višnja Bogdanović², Srdjan Miletić¹, Miroslav Vrvic³¹Centar za Hemiju-IHTM, Beograd, Srbija²Odeljenje za eksperimentalnu onkologiju-Institut za onkologiju, Sremska Kamenica, Srbija³Hemijski fakultet, Beogradu, Srbija

Ispitali smo efekat dodatka α -tokoferola i uticaj azot-oksida iz natrijum-nitroprusida (NNP) na sadržaj slobodnih tiol grupa i SOD aktivnost kod K562 ćelija (humana eritroleukemija) u eksponencijalnoj fazi rasta, koje su gajene u RPMI 1640 (Sigma) sa dodatkom 2 mM glutamina, 10 % toplotom-inaktiviranog fetalnog govedjeg seruma i antibiotika, na 37 °C u vlažnoj atmosferi sa 5 % ugljen-dioksida. Koncentracija ćelija bila je $0,85 \times 10^6$ po posudi.

Naši rezultati ukazuju na moguću dvostruku ulogu α -tokoferola kod ovih ćelija: indukciju više redukovano stanja (porast slobodnih -SH grupa), ali i porast njihove otpornosti na tretmane koji indukuju oksidacioni stres (porast SOD aktivnosti). α -Tokoferolom pretretirane K562 ćelije ne daju očekivani odgovor na tretman sa NNP.

Uvod

Kultura ćelija, kao sistem sa kontrolisanim uslovima, predstavlja pogodan model za izučavanje elementarnih procesa rasta, razvoja i deobe ćelija, kao i biohemijskih i populacionih fenomena. Ćelije u kulturi zadržavaju mnoge osobine tkiva od kojeg su potekle, međutim, stiču i neke specifičnosti vezane za gajenje *in vitro*. Za razliku od tumorskog tkiva u organizmu, koje je stalno izloženo varijacijama u nivou kiseonika, ćelijske linije u *in vitro* uslovima neprekidno su eksponirane podjednakom (visokom) nivou kiseonika i nemaju komunikaciju sa drugim tipovima ćelija [1]. Kao rezultat u ćeliji se javlja oksidovano stanje koje pogoduje imortalizaciji, stimuliše proliferaciju ćelija i podržava razvoj malignog fenotipa. Većina mutacija bitna za aktivaciju onkogeno uključuje redoks-senzitivna regulatorna mesta, što dovodi do gubitka normalne redoks kontrole ćelijskog rasta i razvoja. Generalno, ćelijsko redoks stanje ima značajan uticaj na kontrolu ćelijskog preživljavanja, apoptoze i ekspresiju tumor supresornih gena.

Antioksidacioni efekti α -tokoferola su posledica njegove hemijske strukture i prevashodno potiču od redoks aktivne slobodne hidroksilne grupe na hromanolskom prstenu. U biološkim sistemima značajan je i fitilni bočni niz koji utiče na rastvorljivost u mastima i pokretljivost unutar bioloških membrana. Direktni efekti α -tokoferola potiču od njegovih interakcija sa elementima signal transdukcionih puteva (inhibicija protein kinaze C ili aktivacija protein-fosfataze PP2) i/ili elementima transkripcione regulacije. Kompleksni efekti α -tokoferola su i posledica efekata njegovih derivata, tokoferil hinon radikala i diradikala, koji direktno interaguju sa ciljnim proteinima. Pošto je biološka aktivnost posledica njegovih nezavisnih antioksidacionih i direktnih efekata, pratili smo efekte indukovane promene količine α -tokoferola na funkciju ćelija u kulturi u pokušaju da damo dalji doprinos poznavanju molekularnih osnova fizioloških efekata α -tokoferola. Efekte α -tokoferola kombinovali smo i sa efektima NO donora. Natrijum nitroprusid (NNP) je difuzan, fotoreaktivan molekul sa veoma kratkim poluživotom koji izaziva koncentraciono- zavisnu proliferaciju ili inhibiciju ćelijskog rasta *in vitro* [2]. Smatra se da ovaj

molekul oslobađa NO. i NO⁺ u odnosu 30:70 % uz istovremeno otpuštanje cijanidnih jona (približno pet ekvivalenata CN⁻ po molu NNP).

Uloga α -tokoferola, kao lipofilnog antioksidacionog sredstva, dobro je proučena. Međutim, uticaj ovog lipofilnog antioksidanta na redoks status ćelije i molekulskih senzora je manje proučavan. Pomeranje prooksidativnog balansa zabeleženo je kod pacijenata sa različitim tipovima uznapredovalog maligniteta [3]. Pošto efekat antioksidanata posebno lipofilnih, kao što je α -tokoferol, na ove procese nije dovoljno proučen, cilj ovog rada bio je da se ispita efekat α -tokoferola na količinu slobodnih proteinskih sulfhidrila i glutationa kod malignih (eritroidna leukemija) K529 ćelija u kulturi.

Eksperimentalni deo

Eksperiment je rađen na kontinuiranoj ćelijskoj liniji: ćelije humane eritroleukemije (K562) - CCL 243, poreklom iz pleuralne efuzije pacijentkinje sa hroničnom mijeloidnom leukemijom. K562 blasti su multipotencijalne, hematopoetske maligne ćelije koje spontano diferenciraju u progenitore eritrocitne, granulocitne i monocitne serije [4]. K562 ćelije rastu u suspenziji u RPMI 1640 medijumu sa dodatkom 10 % fetalnog telećeg seruma (FCS), 2 mM glutamina, penicilina (100 IJ/ml) i streptomocina (100 μ g/ml). Ćelijska linija se održava u sudovima za kulturu na 37 °C, u atmosferi sa 100 % vlažnosti i 5 % CO₂. Presejavaju se dva puta nedeljno u koncentraciji 50000 - 100000 ćelija /ml. α -tokoferol acetat (2 mM) dodavan je u sudove za ćelijsku kulturu po sledećoj shemi: 1. grupa – kontrolna; 2. grupa – dodat α -tokoferol; uzorci inkubirani 1 h; 3. grupa – dodat α -tokoferol; posle 0,5 h dodavan i 2 mM natrijum nitroprusid (NNP) i uzorci su inkubirani još 0,5 h. α -Tokoferol dodavan je kao tokoferol acetat (Merck), a natrijum- nitroprusid dihidrat (Merck) je rastvoren u 0,9 % NaCl za osnovni rastvor koncentracije 10 mM. Rastvorena supstanca je u toku eksperimenta dodavana u eksperimentalne uzorke u odgovarajućim zapreminama da bi se postigla optimalna koncentracija (2 mM). Uzorci K562 ćelija su tri puta centrifugirani u PBS-u radi ispiranja. Citosolna frakcija dobijena je tretiranjem uzoraka ultrazvukom (Soniprep 150 MSE). Uzorci su adekvatno pripremljeni za naredne analize i zamrznuti na -80°C. U toku drugog dela eksperimenta u svim uzorcima određena je koncentracija proteina, -SH grupa i aktivnost SOD. Slobodne -SH grupe su određivane Ellmanovom metodom [5].

Superoksid dismutaza je određivana metodom McCorda i Fridovich-a sistemom citohrom c/(Fe (III)/ksantin/ksantin- oksidaza [6]. Aktivnost SOD je izražavana u jedinicama aktivnosti na mg proteina i u jedinicama aktivnosti na 10⁶ ćelija.

Rezultati i diskusija

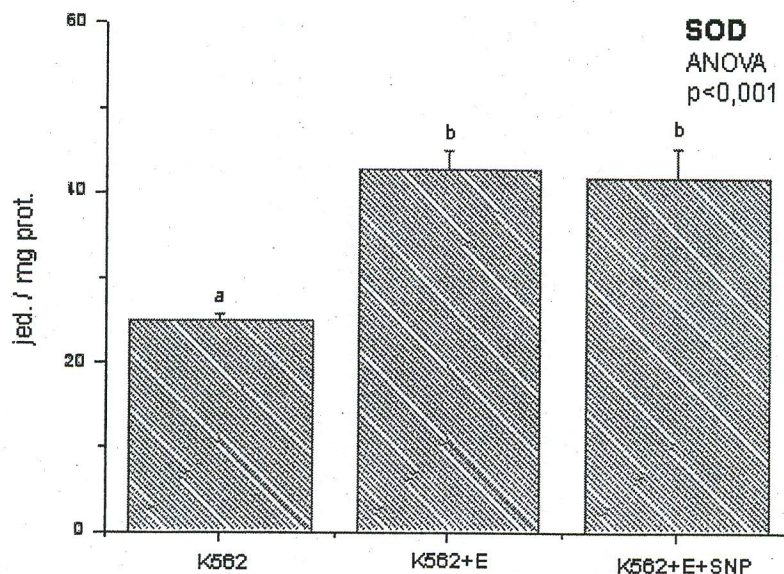
Rezultati određivanja proteina i količine slobodnih -SH grupa u ćelijama K562 prikazani su u Tabeli 1. Tretman α -tokoferolom dovodi do statistički značajnog smanjenja proteina izraženo na milion ćelija, kao i do statistički značajnog povećanja slobodnih -SH grupa, takođe izraženo na milion ćelija. Dodatni tretman sa NNP-om ne dovodi do daljih promena, ostaje statistički značajno smanjena količina proteina i povećana količina slobodnih -SH grupa u odnosu na kontrole.

grupa	Proteini (mg/10 ⁶ ćelija)	-SH (nmol/10 ⁶ ćelija)
K562	0,73+ 0,05 a	90+ 10 a

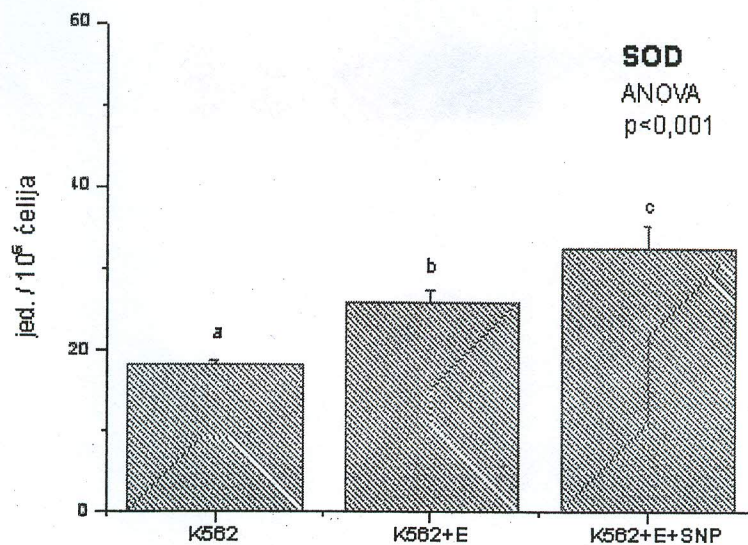
K562+ α -tokoferol	0,51+ 0,09	b	136+ 15	b
K562+ α -tokoferol +SNP	0,47+ 0,10	b	162+ 21	b

Tabela 1. Količina proteina i slobodnih -SH grupa kod kontrolnih, α -tokoferol tretiranih i tretiranih α -tokoferolom i NNP. Statistička značajnost razlika je testirana ANOVA. Ista slova označavaju ne postojanje razlike, a različita statistički značajnu razliku $p < 0,05$.

Na slikama 2. i 3. prikazni su rezultati određivanja aktivnosti SOD prikazani kao specifična aktivnost (jedinice na mg proteina, slika 2.) i jedinice na million ćelija (slika 3.). Specifična aktivnost SOD raste u grupi tretiranoj α -tokoferolom i α -tokoferolom + NNP u odnosu na kontrolu. Kako je prava specifična aktivnost SOD (jedinice na mg čistog proteina) konstantna, raste udeo SOD u proteinima koji su preostali posle α -tokoferol indukovane degradacije proteina u K562. Ovo se može objasniti i izuzetnom stabilnošću SOD koja zbog svoje kompaktne globularne strukture i malog sadržaja aromatičnih aminokiselina zadržava aktivnost i na +60 °C tokom 5 min.



Slika 2. Aktivnost SOD kod kontrolnih, α -tokoferol tretiranih i tretiranih α -tokoferol + NNP. Statistički značajna razlika između α -tokoferol i kontrola $p < 0,05$, α -tokoferol + NNP i kontrola $p < 0,05$.



Slika 3. Aktivnost SOD kod kontrolnih, α -tokoferol tretiranih i tretiranih α -tokoferola + NNP. Statistički značajna razlika između α -tokoferola i kontrola $p < 0,05$, α -tokoferol + NNP i kontrola $p < 0,01$, i α -tokoferol i α -tokoferol + NNP $p < 0,05$.

Ukupni redoks status je generalno prihvaćen kao glavni faktor u regulaciji funkcije kako normalne, tako i maligne ćelije. Većina humanih tumora iskazuje ekspresiju visokih vrednosti SOD, što je najčešće u vezi sa agresivnim karakteristikama tumora. U manjem broju studija ističe se niska aktivnost SOD u tumorskim ćelijama. Za to postoje dva moguća objašnjenja: 1. Postoje inherentne razlike među malignim ćelijama/tumorima koje dovode do toga da iste izmene redoks statusa dovode do različitih efekata; 2. Promene u nivou jedne od superoksid dismutaza ne moraju uvek prethoditi izmenama u ćelijskom redoks statusu.

Oksidacija proteinskih sulfhidrila do mešovitih disulfida je rani ćelijski odgovor na oksidativni stres [7], tako i njihova redukcija može biti posledica prisustva egzogenih antioksidanata. Fenomen tokoferolom posredovanog održanja proteinskih -SH grupa primećen je ranije [8]. Naši rezultati pokazuju da α -tokoferol kod maligne ćelijske linije dovodi do povećanja slobodnih -SH grupa, što može biti posledica direktnog antioksidativnog efekta α -tokoferola. Kako je za antioksidante pokazano da mogu poslužiti za preveniranje apoptoze, u ovom slučaju povećanje unutarćelijskog pula tiol sadržavajućih proteina pod uticajem α -tokoferola može imati sličan efekat, što ne potencira primenu α -tokoferola kao terapijskog sredstva u velikim dozama za lečenje karcinoma.

Zaključak

Na osnovu izloženih rezultata, zaključujemo da jasne razlike između efekata koje α -tokoferol ima kod maligne ćelijske linije, u odnosu na slobodne tirole i SOD aktivnost, ukazuju da α -tokoferol može imati dvojak efekat u direktnoj terapiji karcinoma. U malim dozama, pozitivan zbog predominantnog uticaja na redoks status preko ćelijskih tiola, dok je u većim dozama moguć negativan efekat zbog uticaja na aktivnost antioksidativnih enzima koji nekada favorizuju proliferaciju. Sintaza specifičnih derivata α -tokoferola koji bi bili sposobni da favorizuju pozitivne efekte je put koji najviše obećava u direktnoj primeni α -tokoferola u terapiji kod različitih vrsta karcinoma.

Reference

1. B. Halliwell, FEBS letters 540 (2003) 3
2. A. Azzi, A. Stocker, Prog. Lipid Res. 39 (2000) 231
3. M. Adžić, A. Nićiforović, V. Vucić, Z. Nešković-Konstantinović, S. Spasić, D. Jones, M. Radojčić, M. Spasić, Redox Report 11 (2006) 39
4. European Catalogue of Cell Cultures and Hybridomas (1996/97). 7th ed., 1996/97
5. A. Habeeb, Methods in Enzymology 25 (1972) 457
6. J. M. McCord, I. Fridovich, J. Biol. Chem. 243 (1968) 575
7. S. D. Spasić, Doktorska disertacija, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu (2006) 1-124
8. G. A. Pascoe, D. J. Reed, Free Rad. Biol. & Med 6 (1989) 209

Summary

EFFECT OF α -TOCOPHEROL ON FREE THIOL CONTENT AND SOD ACTIVITY IN K562 CELLS

Scientific paper

Snežana Spasić¹, Višnja Bogdanović², Olga Martinov¹, Srdjan Miletić¹, Miroslav Vrvic³

¹Department of Chemistry-IChTM, Belgrade, Serbia

²Department for Experimental Oncology-Institute of Oncology, Sremska Kamenica, Serbia

³Faculty of Chemistry, Belgrade, Serbia

We examined effect of α -tocopherol addition and influence of nitric oxide from sodium nitroprusside (SNP) on free thiol content and SOD activity in exponentially growing K562 cells (human erythroleukaemia) in RPMI 1640 (Sigma) supplemented with 2 mM glutamine, 10 % heat-inactivated fetal calf serum and antibiotics at 37 °C in a humidified 5 % carbon dioxide atmosphere. Cells concentration was of 0.85×10^6 per flask.

Our results indicate potential dual role of α -tocopherol: induction of more reduced cell state (increased free -SH) and increased resistance of cancer cells to treatment which induce oxidative stress (increased SOD). α -Tocopherol pretreated K562 cells do not expected respond on the SNP treatment.