

REDOKS REGULACIJA ČELIJSKOG CIKLUSA AZOT-OKSIDOM*

U ovom radu ispitivani su efekti donora NO natrijum-nitroprusida (SNP) na dve čelijske linije u kulturi: transformisane ćelije mišijih fibroblasta (L929) i maligne ćelije humane eritroleukemije (K562). Niske koncentracije deluju stimulatивно na proliferaciju K562 ćelija u kulturi, dok je kod viših koncentracija situacija suprotna i uočava se dozno-zavisian uticaj SNP na proliferaciju K562 ćelija. Korišćenjem natrijum-nitroprusida i dve vrste superoksid dismutaza, Cu,Zn-SOD i Mn-SOD, stvoreni su uslovi generisanja više vrsta signalnih molekula i ispitan je odgovor obe čelijske linije na njih. Rezultati eksperimenata pokazuju da izabrani parametri (količina slobodnih tiolnih grupa i glutatona) mogu biti relevantni za praćenje efekata egzogenog azot oksida i njegovih redoks potomaka kod različitih, transformisanih i malignih čelijskih linija.

U aerobnoj ćeliji je pretežno redukovana sredina koja pogoduje odvijanju čelijskog metabolizma u granicama homeostaze. Balans redoks potencijala predstavlja imperativ održavanja zdravog fenotipa i preživljavanja [1]. Nitrozativni stres može ozbiljno narušiti čelijsku redoks homeostazu i, u kombinaciji sa oksidativnim stresom, uticati na čelijsku proliferaciju i diferencijaciju, a u nekim slučajevima i na aktivaciju maligne transformacije [2].

Većina mutacija bitna za aktivaciju onkogeno uključuje redoks-senzitivna regulatorna mesta, što dovodi do gubitka normalne redoks kontrole čelijskog rasta i razvoja [3–7].

Apoptoza je potencijalno protektivan mehanizam u odnosu na egzogene karcinogene i inflamatorna stanja koji je delimično regulisan čelijskim redoks statusom. Generalno, čelijsko redoks stanje ima značajan uticaj na kontrolu čelijskog preživljavanja, apoptoze i ekspresiju tumor supresornih gena [2,8–12].

Azot oksidu (NO) kao predmetu aktuelnih istraživanja u medicini i biohemiji i temi mnogobrojnih publikacija, često se pripisuje kontroverzna uloga. NO izaziva različite efekte u zavisnosti od eksperimentalnog modela, svoje relativne koncentracije kao i okruženja u kojem nastaje [13]. Hemijska priroda azot-oksida ukazuje na mogućnost reakcija sa reaktivnim vrstama nastalim iz molekuskog kiseonika. Ispitivanja mogućnosti direktne transformacije azot-oksida u redoks aktivne vrste kao što su nitrozonijum katjon (NO⁺) i nitroksil anjon (NO⁻/HNO) i direktni efekti tih redoks potomaka u ćeliji tek su u začetku. Njihov značaj raste paralelno sa porastom interesovanja za redoks regulaciju čelijskog ciklusa [5].

U ovom radu ispitivani su efekti donora NO natrijum-nitroprusida (SNP) na dve čelijske linije u kulturi: ćelije mišijih fibroblasta (L929) koje su transformisane,

sa potencijalnim kapacitetom da izazovu fibrosarkom i ćelije humane eritroleukemije (K562) koje su sa malignim karakteristikama [14,15]. Natrijum-nitroprusid je fotoreativan molekul sa veoma kratkim poluzivotom koji izaziva koncentraciono-zavisnu proliferaciju ili inhibiciju čelijskog rasta *in vitro* [12], što je u eksperimentu i pokazano testom inkorporacije ³H timidina. Praćenjem intracelularnih markera kao što je količina slobodnih tiolnih grupa i glutatona pretpostavljeno je da će se dobiti uvid i u molekulske mehanizme za objašnjenje efekata azot oksida i njegovih redoks potomaka kao i objašnjenje za eventualne razlike u odgovoru transformisanih i malignih čelijskih linija.

MATERIJAL I METODE

U eksperimentu su korišćene dve komercijalne čelijske linije: ćelije humane eritroleukemije K562 (CCL 243) [14] i ćelije mišijih fibroblasta L929 (ETAC 85011425) [15].

K562 ćelije rastu u suspenziji u RPMI 1640 medijumu (Sigma) sa dodatkom 10% fetalnog telećeg seruma (FCS, NIVNS), 2mM glutamina (Sigma), penicilina (100 IJ/ml) i streptomicina (100 µg/ml) (Galenika). L929 ćelije rastu zalepljene za podlogu kao jedan sloj ćelija («monolayer»), u DMEM-u sa dodatkom 10% FCS, 2 mM glutamina, penicilina (100 IJ/ml) i streptomicina (100 µg/ml). Jednoćelijska suspenzija se dobija 0,25% tripsinom ili tripsinom u EDTA (Sigma).

Čelijske linije se održavaju u sudovima za kulturu na 37 °C, u atmosferi sa 100% vlažnosti i 5% CO₂. Preporučuju se dva puta nedeljno u koncentraciji 50000–100000 ćelija/ml.

Natrijum-nitroprusid dihidrat (Merck) je rastvoren u 0,9% NaCl za osnovni rasvor koncentracije 10 mM. U toku eksperimenta osnovni rastvor je dodavan u eksperimentalne uzorke u odgovarajućim zapreminama da bi se postigla finalna koncentracija od 0,1; 1; 2 i 5 mM.

Preparat Cu,Zn-SOD (Peroxinorm, CN 953745, Pliva) je rastvoren u destilovanoj vodi i dodavan u eksperimentalne uzorke u finalnoj koncentraciji od 10⁻⁷ M.

Mn-SOD (*Escherichia coli*), izolovana po metodi Keele [16], rastvorena je u destilovanoj vodi i dodavana u eksperimentalne uzorke u finalnoj koncentraciji od 10⁻⁷ M.

Autor za prepisku: V. Bogdanović, Institut za onkologiju Vojvodine, Zavod za eksperimentalnu onkologiju, Sremska Kamenica.

E-pošta: cherrybo@sbb.co.yu

Rad primljen: 6. decembar 2007.

Rad prihvaćen: 5. jun 2008.

*Rad saopšten na skupu «Šesti seminar mladih istraživača», Beograd, 24–26. decembar 2007.

Uzorci ćelijske linije K562 posađeni su u mikrotitar ploče (Costar, 96 well) u koncentraciji od 0,1; 1; 2 i 5 mM i tretirane testom inkorporacije ^3H timidina [17]. Indeks proliferacije ćelija praćen je nakon 1, 24 i 48 h inkubacije sa SNP, kao i Cu,Zn-SOD (10^{-7} M) + SNP (1 mM).

U drugom delu eksperimenta uzorci obe ćelijske linije posađeni su u flaskone za kulturu ćelija od 25 cm³ (Costar) u koncentraciji od $1,0 \cdot 10^6$ /mL i podeljeni su u četiri eksperimentalne grupe:

1. kontrolna grupa (25,5 h u termostatu);
2. grupa sa dodatim SNP (vreme inkubacije 24,5 h u termostatu + 1 h sa 2 mM SNP);
3. grupa sa dodatim Cu,Zn-SOD i SNP po šemi 24 h + 0,5 h 10^{-7} M Cu,Zn-SOD + 1 h 2mM SNP;
4. grupa sa dodatim Mn-SOD i SNP po šemi 24 h + 0,5 h 10^{-7} M Mn-SOD + 1 h 2 mM SNP.

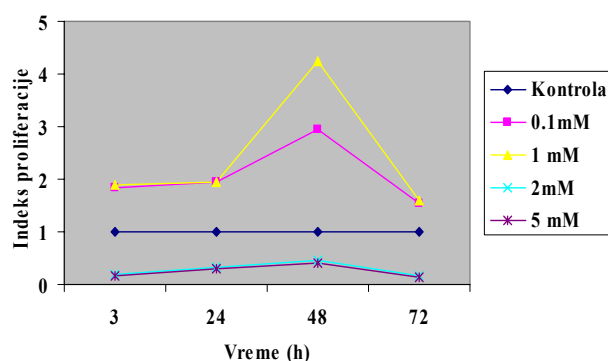
Nakon isteka inkubacije, ćelije su isprane u PBS-u i centrifugirane 10 min na 10000 obrt/min. Citosolna frakcija dobijena je ultrasonifikacijom uzoraka (Soni-prep 150 MSE).

U svim uzorcima određena je koncentracija ukupnog glutaciona metodom Griffith-a i slobodnih tiolnih grupa Ellmanovom metodom [18,19]. Dobijeni eksperimentalni rezultati statistički su obrađeni dvovarijantnim ANOVA testom.

REZULTATI I DISKUSIJA

Indeks proliferacije ćelija humane eritroleukemije (K562) praćen inkorporacijom ^3H timidina

Kao što je prikazano na slici 1, indeks proliferacije, odnosno posredno praćena *de novo* sinteza DNK u K562 ćelijama je posmatrana u četiri vremenske tačke eksperimenta pri koncentracijama od 0,1; 1; 2 i 5 mM SNP.



Slika 1. Efekti natrijum-nitroprusida na proliferaciju K562 ćelija praćeni inkorporacijom ^3H timidina.

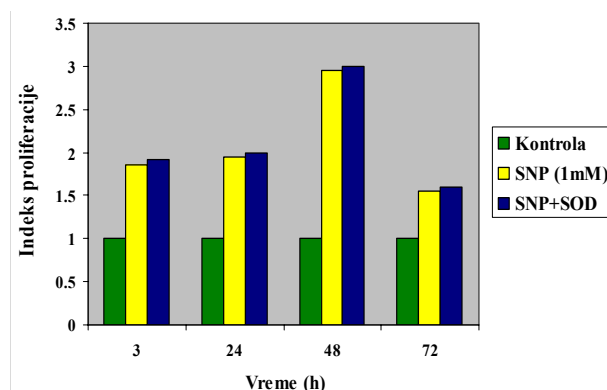
Figure 1. Effect of sodium nitroprusside on the proliferation of K562 cells monitored by ^3H thymidine incorporation.

Niske koncentracije deluju stimulatивно na proliferaciju K562 ćelija u kulturi, dok je kod viših koncen-

tracija situacija suprotna, dakle, uočava se dozno-zavisnan uticaj SNP na proliferaciju K562 ćelija.

Takođe, pošto se koncentracija od 2 mM SNP pokazala kao granična između stimulacije i inhibicije proliferacije za ispitivanu ćelijsku liniju, u daljem toku eksperimenta uzorci su inkubirani samo sa 1 mM Na-nitroprusidom, kao i sa kombinacijom 1mM SNP i 0,1 μM Cu,Zn-SOD (slika 2). Pritom smo želeli da ustanovimo da li inkubacija sa Cu,Zn-SOD doprinosi proliferativnom efektu SNP.

Koncentracija SNP od 1 mM dovodi do proliferacije K562 ćelija u svim vremenskim tačkama eksperimenta, a posebno u 48. satu. Predtretman sa Cu,Zn-SOD u kombinaciji sa SNP pokazuje evidentnu, ali ne i statistički značajnu stimulaciju ćelijske proliferacije u poređenju sa SNP-tretiranom grupom.



Slika 2. Indeks proliferacije K562 ćelija praćen inkorporacijom ^3H timidina u prisustvu SNP i Cu,Zn-SOD.

Figure 2. Index of K562 cells proliferation monitored by ^3H thymidine incorporation in a presence of SNP and Cu,Zn-SOD.

Efekti SNP na koncentraciju ukupnog glutaciona (GSH +GSSG)

U uzorcima linije L929 (slika 3), zapaža se pad vrednosti koncentracije ukupnog glutaciona u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolnu. Taj pad je najznačajniji u grupi uzoraka tretiranih sa MnSOD + SNP, što se pripisuje najintenzivnijoj S-nitrozilaciji u ovoj eksperimentalnoj grupi, kao i mogućim efektima S-glutacionilacije redukovanog glutaciona u sistemu gde je prisutan i vodonik-peroksid [20].

SNP snižava specifičnu koncentraciju ukupnog glutaciona, dok u kombinaciji sa Cu,Zn-SOD odnosno Mn-SOD dovodi do povišenja koncentracije ovog ćelijskog redoks pufera u ćelijskoj liniji K562 (slika 4). Povišenje koncentracije glutaciona u grupi predtretiranih uzoraka sa Cu,Zn-SOD može se pripisati osobini ovog enzima da dovodi do S-denitrozilacije. Niske vrednosti ukupnog glutaciona u grupi predtretiranoj Mn-SOD-om idu u prilog efektima do kojih dolazi direktnim uključenjem vodonik-peroksida u signalnu transdukciju tretiranih ćelija [20].

Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju slobodnih tiolnih grupa

Koncentracija slobodnih tiolnih grupa je povišena u odnosu na kontrolnu grupu uzoraka u svim tretiranim grupama u ćelijskoj kulturi L929 (slika 5), što je u skladu sa literaturnim podacima koji navode rezistentnost fibroblasta na nitrozativni stres. Statistički najviša vrednost povećanja koncentracije uočava se u grupi uzoraka tretiranih sa Cu,Zn-SOD + SNP.

SNP snižava specifičnu koncentraciju slobodnih tiolnih grupa grupa, dok u kombinaciji sa Cu,Zn-SOD odnosno Mn-SOD dovodi do povišenja njihove koncentracije u ćelijskoj kulturi K562, što se ponovo može pripisati najpre osobini Cu,Zn-SOD da S-denitroziluje tirole, kao i direktnom uključenju vodonik-peroksida u signalnu transdukciju tretiranih ćelija u grupi predtretiranoj sa Mn-SOD (slika 6) [20].

ZAKLJUČCI

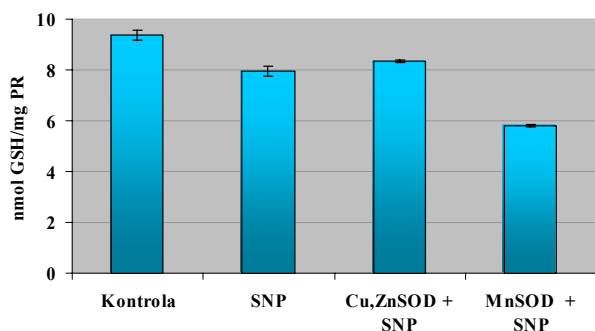
U našim eksperimentima, korišćenjem donora NO–natrijum nitroprusida (SNP) i dve vrste superoksid dis-

mutaza, Cu,Zn-SOD i Mn-SOD, stvorili smo uslove generisanja više vrsta signalnih molekula i ispitali odgovor transformisanih (L929) i malignih (K562) ćelija na njih.

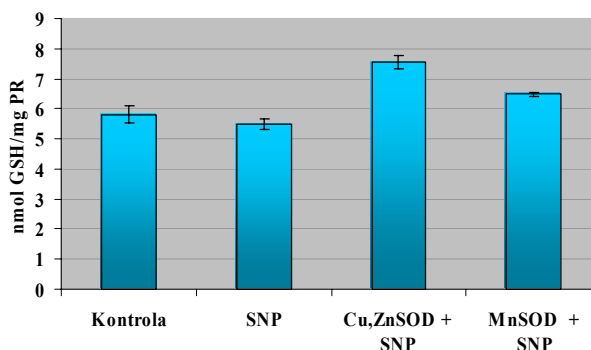
Test inkorporacije ^3H timidina pokazao je da niske koncentracije SNP deluju stimulatивно na proliferaciju K562 ćelija u kulturi, dok je kod viših koncentracija situacija suprotna, odnosno uočava se dozno-zavisan negativni uticaj SNP na proliferaciju K562 ćelija. Predtretman ćelija K562 sa CuZn-SOD u kombinaciji sa SNP pokazuje evidentnu, ali ne i statistički značajnu stimulaciju ćelijske proliferacije u poređenju sa SNP-tretiranom grupom.

U uzorcima linije L929 zapaža se sniženje vrednosti specifične količine glutaciona u svim eksperimentalnim grupama u odnosu na kontrolnu. Ta pojava je najznačajnija u grupi uzoraka tretiranih kombinacijom Mn-SOD i SNP. U kulturi K562, SNP snižava specifičnu količinu ukupnog glutaciona, dok u kombinaciji sa Cu,Zn-SOD odnosno Mn-SOD, dovodi do povišenja koncentracije ovog ćelijskog redoks pufera.

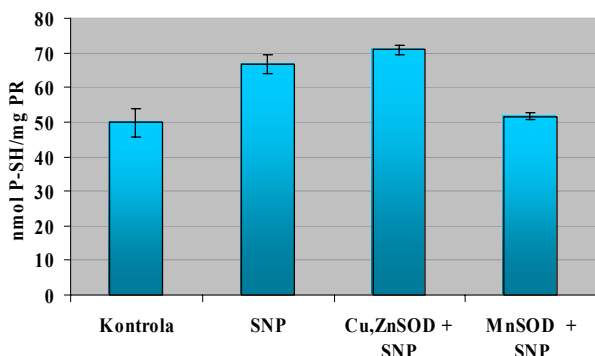
Rezultati naših eksperimenata pokazuju da izabrani parametri (količina slobodnih tiolnih grupa i glutaciona)



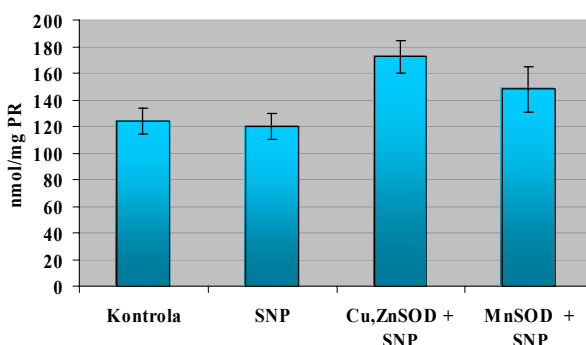
Slika 3. Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju ukupnog glutaciona (nmol/mg proteina) u uzorcima ćelijske linije L929.
Figure 3. Effect of sodium nitroprusside on the concentration of total glutathione (nmol/mg) of cell line L929.



Slika 4. Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju ukupnog glutaciona (nmol GSH/mg proteina) u uzorcima ćelijske linije K562.
Figure 4. Effect of sodium nitroprusside on the concentration of total glutathione (nmol/mg) of cell line K562.



Slika 5. Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju slobodnih tiolnih grupa (nmol/mg proteina) u uzorcima ćelijske linije L929.
Figure 5. Effect of sodium nitroprusside on the concentration of free thiol groups (nmol/mg protein) of cell line L929.



Slika 6. Efekti natrijum-nitroprusida na koncentraciju slobodnih tiolnih grupa (nmol/mg proteina) u uzorcima ćelijske linije K562.
Figure 6. Effect of sodium nitroprusside on the concentration of free thiol groups (nmol/mg protein) of cell line K562.

moгу biti relevantni za praćenje efekata egzogenog azot oksida i njegovih redoks potomaka kod razliĉitih, transformisanih i malignih ĉelijskih linija.

LITERATURA

- [1] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39** (2007) 44-84.
- [2] V. Kinnula, J.D. Crapo, *Free Radical Biol. Med.* **6** (2004) 718-744.
- [3] C.V. Smith, D.P. Jones, T.M. Guertner, L. H. Lash, B.H. Lauterburg, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **140** (1996) 1-12.
- [4] S.C. Lu, *FASEB J.* **13** (1999) 1169-1183.
- [5] T. Muller, S. Gebel, *Carcinogenesis* **19** (1998) 797-801.
- [6] R.L. Veech, L.V. Eggleston, H.A. Krebs, *Biochem. J.* **155** (1969) 609-619.
- [7] J.R. Matthews, N. Wakasugi, J.L. Virelizier, J. Yodoi, R.T. Hay, *Nucleic Acid Res.* **20** (1992) 38821-38830.
- [8] D.J. Granville, C.M. Carthy, D.W. Hunt, B.M. McManus, *Lab. Invest.* **78** (1998) 893-913.
- [9] J.K. Brunelle, N.S. Chandel, *Apoptosis* **7** (2002) 475-482.
- [10] O. Vafa, M. Wade, S. Kern, M. Beeche, T.K. Pandita, G.M. Hampton, G.M. Wahl, *Mol. Cell.* **9** (2002) 1031-1044.
- [11] K. Barnouin, M.L. Dubuisson, E.S. Child, D.M. Fernandez, J. Glassford, R.H. Medema, D.J. Man, E.W. Lam, *J. Biol. Chem.* **21** (2002) 2180-2188.
- [12] S. Macip, M. Igarashi, L. Fang, A. Chen, Z.-Q. Pan, S.W. Lee, S. A. Aaronson, *EMBO J.* **21** (2002) 2180-2188.
- [13] F. Schafer, G. Buettner, *Free Radical Biol. Med.* **30** (2001) 1191-1212.
- [14] R. Hay, M. Macy, T.R. Chen, P. McClintock, Y. Reid (Eds.), *American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas*, 6th Ed., 1988.
- [15] *European Catalogue of Cell Cultures and Hybridomas*, 7th Ed., 1996/97.
- [16] B.B. Keele Jr., J.M. McCord, I. Fridovich, *J. Biol. Chem.* **245** (1970) 6176-6181.
- [17] D. Jakimov, G. Bogdanović, M. Baltić, S. Turšijan, L. Aleksić, A. Đorđević, J. Mrđanović, M. Vojinović-Miloradov, *Cell Line*, 2002.
- [18] O.W. Griffith, *Anal. Biochem.* **106** (1980) 207-212.
- [19] G.L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* **82** (1959) 70-77.
- [20] H.J. Forman, *Free Radical Biol. Med.* **42** (2007) 926-932.

SUMMARY

REDOX REGULATION OF CELL CYCLE THROUGH NITRIC OXIDE

Višnja Bogdanović¹, Mihajlo B. Spasić²

¹Institute for Oncology, Sremska Kamenica, Serbia

²Institute for Biological Research "Siniša Stanković", Belgrade, Serbia

Scientific paper

This paper investigates the effects of sodium nitroprusside as NO donor on two cell lines in culture: transformed cells of mice fibroblasts (L929) and malignant cells of human eritroleukemia (K562). Low concentrations of NO have stimulative effect, while high concentrations have inhibitive effects on proliferation of K562 cells in a dose-dependent manner. In our experiments, by using sodium nitroprusside (SNP) as NO donor and two kinds of superoxide dismutase, Cu,Zn-SOD and Mn-SOD, we created conditions to generate several kinds of signal molecules and investigated reaction of transformed (L929) and malignant (K562) cells to dose. Results of experiments are showing that chosen parameters (amount of free thiol groups and glutathione) may be relevant in monitoring the effect of exogenous nitrate oxide and its redox descendants in different, both transformed and malignant cell lines.

Key words: Cell Culture • Sodium Nitroprusside • Nitric Oxide • Superoxide Dismutase

Ključne reči: Ćelijska kultura • Natrijum-nitroprusid • Azot-oksidi • Superoksid dismutaza