

Modulacija aktivnosti superoksid-dismutaze u humanim limfocitima nakon ozračivanja *in vitro*

*Praćena je aktivnost intracelularne superoksid-dismutaze (SOD) u limfocitima periferne krvi nakon ozračivanja terapijskom dozom zračenja (^{60}Co). Aktivnost SOD merena je u mononuklearnim ćelijama periferne krvi izdvojenih na gradijentu Limfoprepa na dva vremena fiksacije, u primarnim kulturama limfocita stimulisanim fitohemaglutinom *in vitro* i odgovarajućim kontrolama. Rezultati aktivnosti SOD korelirani su sa stepenom radijacionog oštećenja genoma (učestalošću mikronukleusa). Dobijeni rezultati su pokazali da do povećanja aktivnosti SOD dolazi nakon 48 časova, na osnovu čega se može zaključiti da do njega do vodi de novo sinteza enzima, a ne promena konformacionog stanja (aktivacija dimera spajanjem u tetramere). Korelacija aktivnosti SOD u kulturi ozračenih limfocita sa brojem mikronukleusa ukazuje na to da se sa povećanjem enzimске aktivnosti stepen radijacionog oštećenja genoma smanjuje, jer SOD uklanja reaktivne slobodne radikale, smanjuje indirektno dejstvo zračenja i omogućava reper mehanizmima ćelije da lakše i tačnije izvrše rekonstrukciju genoma.*

Uvod

Izlaganje ćelija jonizujućem zračenju dovodi do ozlede gotovo svih biomolekula u ćeliji. Najosetljiviji biološki molekul je DNK, te se efekti jonizujućeg zračenja lako mogu prepoznati analizom hromozomskih aberacija metafaznih hromozoma. Hromozomske aberacije nastaju direktnim i indirektnim delovanjem zračenja: deponovanjem energije zračenje direktno prekida fosfodiastarske veze kojima su nukleotidi međusobno povezani u lanac, ali istovremeno, usled velikog broja slobodnih radikala i toksičnih jedinjenja stvorenih radiolizom vode (H^+ , O_2^- , OH^- , HO_2^- , H_2O_2), dovodi i do indirektnih oštećenja bioloških molekula. Deobom telesnih ćelija čiji kariotip sadrži hromozomske aberacije, u citoplazmi se formiraju mikronukleusi. Acentrični fragmenti, hromozomske i hromatidne delecije, pa čak i celi hromozomi koji nisu uspešno podeljeni u anafazi ćelijske deobe ostace odvojeni od glavnog jedra i u citoplazmi nastalih ćelija formirace mala jedra – mikronukleuse. Jon vodonika (H^+) je snažan redukujući agens, a

*Ivana Joksić (1980),
Beograd, Poručnika
Spasića i Mašere 6,
učenica 4. razreda
XIII beogradske
gimnazije*

*MENTOR:
Mr Miroslava
Stanković, Institut za
nuklearne nauke
"Vinča", Beograd*

radikali O_2^{\cdot} , OH^- , HO_2^- , kao i H_2O_2 snažni su oksidansi. Od antioksidativnog potencijala ćelije i sposobnosti enzima antioksidativne zaštite da uklone reaktivne slobodne radikale zavisi stepen radijacionog oštećenja genoma. Najvažniju ulogu u sprečavanju nastajanja tih oštećenja imaju enzimi antioksidativne zaštite – superoksid-dismutaze (Mn-SOD i Cu,Zn-SOD) i glutation-peroksidaza (GPx). Superoksid-dismutaza (SOD) je aktivna u obliku tetramera, ali se u ćeliji nalaze i neaktivni dimeri koji se aktiviraju nakon polimerizacije. Njena zaštitna uloga se zasniva na katalizovanju transformacije superoksid radikala u H_2O_2 , koji se dalje metaboliše u O_2 i H_2O .

U ovom radu praćena je aktivnost SOD u limfocitima periferne krvi nakon ozraćivanja na nekoliko vremena fiksacije. Aktivnost SOD je poređena sa stepenom radijacionog oštećenja genoma, tj. brojem mikronukleusa. Vreme za koje se poveća aktivnost SOD može ukazati na mehanizam kojim do tog povećanja dolazi (polimerizacija ili *de novo* sinteza enzima). Cilj eksperimenta bio je ispitati modulaciju aktivnosti enzima nakon ozraćivanja i ukazati na mehanizam aktivacije enzima antioksidativne zaštite.

Materijal i metode

Za potrebe eksperimenta korišćena je venska krv tri zdrave muške osobe. Uzorak krvi svakog davaoca podeljen je na dva jednaka dela. Po jedan deo krvi zraćen je γ -zraćenjem doze 2 Gy (najčešće korišćena terapijska doza). Drugi, neozraćeni, deo služio je kao kontrola. Iz jednog dela ozraćene krvi izolovani su limfociti koji su zatim podeljeni na dva alikvota. Prvi deo izolovanih limfocita inkubiran je 1 h, a drugi 2 h na 37°C. Nakon naznaćenog vremena izolovan je citosol metodom McCord i Fridovich (1969) i zamrznut na -70°C. Od preostalog dela ozraćene krvi postavljene su limfocitne kulture koje su stimulisane fitohemaglutininom i inkubirane 48 h nakon čega su preparirane po metodu Fenech i Morley (1985). Suspenzija prepariranih limfocita naneta je na mikroskopske pločice, analizirana je učestalost mikronukleusa kako bi se procenio stepen radijacionog oštećenja genoma. Kontrole izolovanih limfocita i kulture limfocita su tretirane na isti način. Merenje aktivnosti SOD iz citosola ozraćenih i neozraćenih uzoraka urađeno je spektrofotometrijski, komercijalnim testom Ransod firme Randox. Rezultati aktivnosti su izraženi u U/mg proteina. Koncentracija proteina je određena standardnom CBB metodom.

Rezultati

Rezultati merenja aktivnosti SOD dati su u tabeli 1. Najviša aktivnost izmerena je u uzorku br. 2 u kulturi ozraćenih limfocita, a najniža u uzorku br 3 (limfociti ozraćeni i inkubirani 1 h).

Tabela 1. Aktivnost SOD [U/mg proteina]

Tretman	Uzorak		
	1	2	3
limfociti ozračeni i inkubirani 1 h	46*	51	37
limfociti inkubirani 1 h – kontrola	48*	55	38
limfociti ozračeni i inkubirani 2 h	44.5*	48	47
limfociti inkubirani 2 h – kontrola	45*	51	39
kultura limfocita – kontrola (48 h)	123.5	169	82
kultura ozračenih limfocita (48 h)	143	227	96

Napomena: * – aktivnost SOD je izračunata iako je procenat inhibicije izlazio iz opsega linearnosti metode.

Rezultati pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika između ozračenih limfocita inkubiranih 1 h i ozračenih limfocita inkubiranih 2 h ($p > 0.05$), kao i između neozračenih i ozračenih limfocita. Kulture ozračenih limfocita pokazale su statistički značajno više aktivnosti SOD u odnosu na ozračene limfocite inkubirane 1 h i 2 h ($p < 0.01$).

Stepen radijacionog oštećenja genoma (učestalost mikronukleusa na 1000 ćelija) prikazan je u tabeli 2. Sa MN-K/1000 označena je učestalost mikronukleusa u kontroli na 1000 ćelija, a sa MN-O/1000 – učestalost mikronukleusa u ozračenim uzorcima na 1000 ćelija. Rezultati ukazuju na višestruko povećanje broja mikronukleusa u kulturama ozračenih limfocita u odnosu na neozračene kulture.

Tabela 2. Učestalost mikronukleusa

Tretman	Uzorak		
	1	2	3
MN-K/1000	13	9	25
MN-O/1000	176	166	198

Diskusija i zaključak

Dobijeni rezultati ukazuju na to da se povećanje aktivnosti SOD dešava nakon 48 h inkubacije. Na osnovu toga se može zaključiti da je za povećanje aktivnosti neophodna *de novo* sinteza enzima, a ne mobilisanje neaktivnih dimera iz citoplazme i njihovo spajanje u tetramere (za ovaj proces potrebno je nekoliko sati). Povećanje enzimske aktivnosti i u grupi neozračenih limfocita nakon 48 h posledica je i blastne transformacije lim-

focita (inicirane specifičnim mitogenom – fitohemaglutininom). Blastna transformacija obuhvata čitav niz složenih procesa koji metabolički neaktivnu ćeliju prevode u metabolički aktivnu (Fenech 1993). Zapaljenski procesi koje u ćeliji izaziva jonizujuće zračenje takođe se karakterišu generisanjem slobodnih radikala, te i oni mogu za posledicu imati povećanje aktivnosti SOD u kulturama ozračenih limfocita (Joseohy *et al.* 1997). Negativna korelacija između broja mikronukleusa i aktivnosti SOD u kulturi ozračenih limfocita pokazuju da što je veća enzimaska aktivnost to je oštećenje genoma manje (uzorak br. 2 u odnosu na ostala dva uzorka ima najveću enzimsku aktivnost, a njanju učestalost mikronukleusa), jer SOD uspešnije uklanjaju reaktivne slobodne radikale, te je manja mogućnost za indirekta oštećenja genoma. Podaci iz literature pokazuju da enzimi antioksidativne zaštite imaju ulogu u regulaciji mnogih ćelijskih procesa. Snažan antioksidativni potencijal ćelije omogućava zadržavanje ćelijskog ciklusa u G₁ fazi, kada je i reparativnim enzimima omogućeno da efikasnije obave ulogu reparacije DNK.

Literatura

- Countryman P.I. and Heddle J.A. 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research*, **41**: 321-32
- Fenech M. and Morley A.A. 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, **147**: 29-36
- Fenech M. 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutation Research*, **285**: 35-44
- Geller B.L. and Winge D.R. 1983. A method for distinguishing Cu, Zn- and Mn- containing superoxide dismutases. *Annals of Biochemistry*, **128**: 86-92
- Joseph D.P., Mannervik B. and de Montellano P.O. 1997. *Molecular toxicology*. New York: Oxford university press.
- McCor J.M. and Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, **244**: 6049-55
- Misra H.P. and Fridovich I. 1972. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, **247**: 3170-5

Modulation of Superoxid dismutase Activity in Human Lymphocytes After *In vitro* Irradiation

The paper describes the results of the activity of intracellular superoxid dismutase (SOD) in peripheral blood lymphocytes following *in vitro* irradiation with 2 Gy gamma dose (^{60}Co). The SOD activity was measured in mononucleated peripheral blood cells separated with Lymphoprep gradient on two fixation times as well as in primarily phytohemagglutinin (PHA) stimulated lymphocyte cultures *in vitro* and in appropriate controls. The SOD activity was correlated with incidence of radiation-induced damages of the genome (incidence of micronuclei per cell). The modulation of enzyme activity as a function of time would indicate what is possible mechanism for increased enzyme activity. The results, obtained in this study demonstrated that increase activity of SOD happened after 48 h of incubation that indicate that *de novo* synthesis of mRNA is necessary and conformation changes in enzyme structure (polymerisation of dimmers into tetramers) do not lead to increased activity. Inverse correlation between enzymes activity in harvested PHA stimulated lymphocytes and incidence of radiation-induced micronuclei was found: increased enzyme activity lead to lower incidence of micronuclei, mostly because the amount of reactive free radicals is depressed, indirect harmful effects on genome is reduced and at the same time repair of DNA lesions can be successfully done.

