

VIŠNJA BOGDANOVIĆ<sup>1</sup>  
 MARIJA SLAVIĆ<sup>2</sup>  
 JASMINKA MRĐANOVIĆ<sup>1</sup>  
 SLAVICA ŠOLAJIĆ<sup>1</sup>  
 ALEKSANDAR ĐORĐEVIĆ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institut za onkologiju Vojvodine,  
 Zavod za eksperimentalnu on-  
 kologiju, Sremska Kamenica

<sup>2</sup>Univerzitet u Beogradu, Institut za  
 biološka istraživanja «Dr Siniša  
 Stanković», Beograd

<sup>3</sup>Univerzitet u Novom Sadu, De-  
 partman za hemiju, Prirodno-ma-  
 tematički fakultet, Novi Sad

NAUČNI RAD

UDK 576.5:615.277:577.11:  
 :546.26:616-006

DOI: 10.2298/HEMIND0903143B

## AKTIVNOST SUPEROKSID-DISMUTAZE U ANIMALNOJ ČELIJSKOJ KULTURI CHO-K<sub>1</sub> NAKON TRETMANA FULERENOLOM I MITOMICINOM C\*

*U ovom radu ispitivani su efekti fulerenola (C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub>) na preživljavanje, kao i tretmana fulerenolom i mitomicinom c (MMC) na aktivnost ukupne superoksid-dismutaze u CHO-K<sub>1</sub> (ovarijalnih ćelija hrčka) ćelijskoj liniji. U uzorcima ćelija tretiranim fulerenolom koncentracija 0,01-0,5 mg/mL, praćeno je preživljavanje testom odbacivanja boje (DET) u 3 i 24 h tretmanu. Aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) merena je u uzorcima tretiranim fulerenolom izabranih koncentracija i mitomicinom c (0,5 i 0,1 μg/mL) nakon 3 i 24 h. Sa porastom koncentracije (C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub>) opada procenat preživelih ćelija tokom 3 i 24 h. Aktivnost SOD raste sa porastom koncentracije fulerenola i u najvećoj koncentraciji opada u obe vremenske tačke eksperimenta. U uzorcima tretiranim fulerenolom i MMC došlo je do smanjenja aktivnosti SOD, izuzev pri koncentraciji fulerenola od 0,0625 mg/mL, kada je zapažen porast aktivnosti SOD u odnosu na kontrolne grupe.*

Eukariotska ćelija opstaje u aerobnom okruženju i u njoj vladaju uslovi pretežno redukovane sredine koji pogoduju odvijanju ćelijskog metabolizma u granicama homeostaze. Balans redoks potencijala predstavlja imperativ održavanja zdravog fenotipa i preživljavanja ćelije [1]. Oksidativni stres može ozbiljno narušiti ćelijsku redoks homeostazu i za posledicu imati ćelijsku proliferaciju i diferencijaciju, a u nekim slučajevima i aktivaciju maligne transformacije [2]. Oksidacija slobodnim radikalima podrazumeva jedno-elektronske puteve sa hemijskim vrstama kao što su superoksid i hidrosil radikal, kao i dvo-elektronske obrasce koji se odnose na neradikalne oksidante kao što je vodonik-peroksid [3–5].

Enzimi antioksidativne zaštite imaju glavnu ulogu u endogenoj zaštiti ćelije od oksidativnog oštećenja putem uticaja na inhibiciju ćelijske proliferacije, mutacije i genomske nestabilnosti [2]. Superoksid dismutaze (SODs) su esencijalni enzimi koji eliminišu superoksid radikal i tako štite ćelije od oštećenja indukovano tom reaktivnom kiseoničnom vrstom [6].

Genotoksičnost mitomicina c (MMC) je dokazana *in vitro* i *in vivo* testovima. Njegov karcinogen efekat se ispoljava putem bioreduktivne alkilacije i posledičnog stvaranja unakrsnih veza na lancima DNK čime se narušava struktura genetičkog materijala. Zbog širokog spektra genotoksičnih efekata koristi se kao pozitivna kontrola u testovima hromozomskih aberacija i mikronukleusa [7].

Adirani vodorastvorni fulereni poznati su kao citotoksični agensi za mnoge ćelijske linije u *in vitro* uslovima [9–17]. U ozračenom rasvoru fulereni daju fulerenol radikal (C<sub>60</sub>(OH)<sub>18</sub>)<sup>\*</sup> [18,19] i kiseonične radikale (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, <sup>\*</sup>OH) [20–23]. S druge strane, poznato je da fulerenoli mogu biti efikasni skupljači slobodnih radikala i snažni antioksidansi *in vivo* i *in vitro* [24–29]. Radioprotektivnost fulerenola mikromolarnih koncentracija *in vitro* potvrđena je jednim od naših prethodnih eksperimenata [30].

Ovo istraživanje predstavlja deo studije u kojoj je ispitivana genotoksičnost/antigenotoksičnost fulerenola na uzorcima ćelijske linije CHO-K<sub>1</sub> sa i bez mitomicina c putem dva testa: hromozomskih aberacija (HA) i mikronukleusa (MN) (podaci nisu prikazani). Praćen je uticaj fulerenola na preživljavanje ćelija testom odbacivanja boje (DET), kao i aktivnost superoksid-dismutaze (SOD) u uzorcima tretiranim fulerenolom i MMC.

### MATERIJAL I METODE

U eksperimentu je korišćena animalna ćelijska linija ovarijalnih ćelija hrčka – (CHO-K<sub>1</sub>) – ATCC CCL61 [31]. CHO-K<sub>1</sub> ćelije rastu zalepljene za podlogu kao jedan sloj ćelija (monolayer), u RPMI 1640 medijumu (Sigma) sa dodatkom 10% FCS (NIVNS), 2 mM glutamina, penicilina (100 IJ/ml) i streptomocina (100 μg/ml) (Galenika). Jednoćelijska suspenzija se dobija sa 0,25% tripsinom ili tripsinom u EDTA (Sigma).

Ćelijska linija se održava u sudovima za kulturu na 37 °C, u atmosferi sa 100% vlažnosti i 5% CO<sub>2</sub>. Presađuje se dva puta nedeljno u koncentraciji 50000–100000 ćelija /ml.

Polihidroksilni derivat fulerena, fulerenol, C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub>, sintetisan je i karakteriziran u laboratorijama Depart-

\*Rad saopšten na skupu „Sedmi seminar mladih istraživača“, Beograd, 22–24. decembar 2008.

Autor za prepisku: V. Bogdanović, Zavod za eksperimentalnu onkologiju, Institut za onkologiju Vojvodine, Institutski put 4, 21204 Sremska Kamenica.

E-pošta: cherrybo@sbb.rs

Rad primljen: 22. decembar 2008.

Rad prihvaćen: 16. januar 2009.

mana za hemiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu.

Uzorci ćelijske linije CHO-K<sub>1</sub> posađeni su u sterilne ploče za kultivaciju (Costar, 6 well) u koncentraciji od 200000/mL i tretirani prema protokolu za testove genotoksičnosti (test HA i test MN) koji su izvedeni u prvom delu istraživanja.

Fulerenol je rastvoren u bidestilovanoj vodi i dodavan u ćelijske kulture u finalnim koncentracijama od 0,01, 0,05, 0,1, 0,25 i 0,5 mg/mL. Test odbacivanja boje (DET) rađen je prema ranije opisanom protokolu [32] u svim uzorcima nakon 3 i 24 h inkubacije ćelija sa fulerenolom. IC<sub>50</sub> je određen za oba testa genotoksičnosti i oba vremena inkubacije.

Drugi deo eksperimenta izveden je sa fulerenolom dodavanim u sub-IC<sub>50</sub> finalnim koncentracijama: 0,01–0,5 mg/mL i MMC.

Mitomicin c je rastvoren u destilovanoj vodi i dodavan u ćelijske kulture u finalnim koncentracijama od 0,5 i 0,1 µg/mL u 3 i 24 h tretmanu. Navedene koncentracije MMC odabrane su na osnovu prethodnih eksperimenata u testovima genotoksičnosti (podaci nisu prikazani).

Citosolna frakcija dobijena je ultrasonifikacijom (Soniprep 150 MSE), uzorci su centrifugirani 10 min pri 4 °C i 10000 o/min i zamrznuti na –80 °C. Supernatant je korišćen za određivanje aktivnosti ukupne superoksid dismutaze adrenalinskom metodom [33]. Za dobijene eksperimentalne rezultate određena je srednja vrednost i standardna devijacija na osnovu  $n = 4-6$ .

## REZULTATI I DISKUSIJA

### Procenat preživljavanja animalnih ćelija (CHO-K<sub>1</sub>) praćen testom odbacivanja boje (DET)

Kao što je prikazano na slikama 1–4, DET testom je praćen procenat preživljavanja CHO-K<sub>1</sub> ćelija nakon 3 i 24 h tretmana fulerenolom koncentracija 0,01, 0,05, 0,1, 0,25 i 0,5 mg/mL.

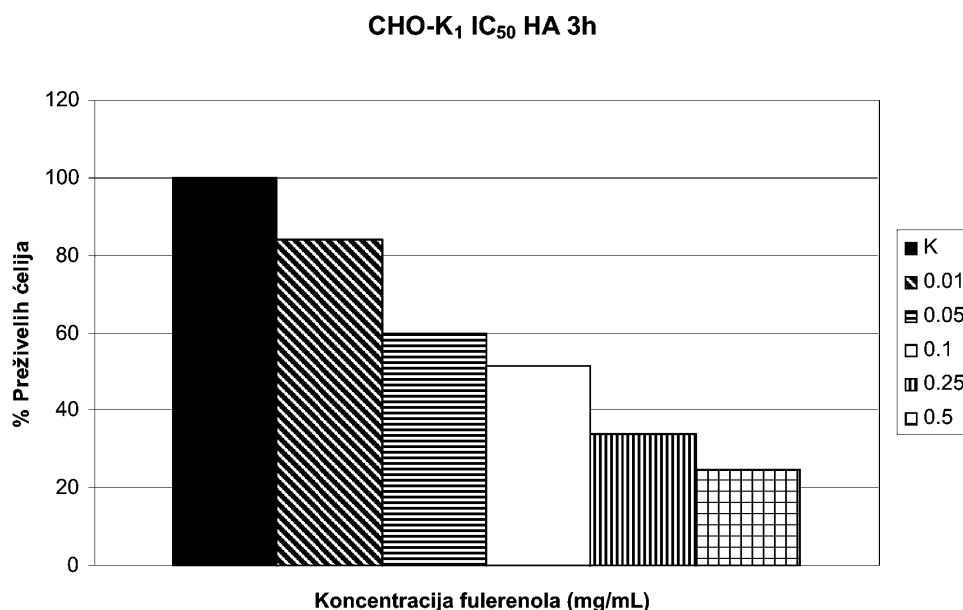
Procenat preživelih ćelija opada sa porastom koncentracije fulerenola u uslovima inkubacije za oba testa genotoksičnosti i u obe vremenske tačke eksperimenta, što odgovara literaturnom izvoru koji navodi da fulerenol u manjim koncentracijama ima ulogu anti, a u većim prooksidanta koji nepovoljno utiče na preživljavanje ćelija u kulturi [24–30].

IC<sub>50</sub> određen DET testom u odnosu na test hromozomskih aberacija iznosi 0,1 mg/mL fulerenola nakon 3 i 24 h tretmana, a 0,5, odnosno 0,25 mg/mL u odnosu na test mikronukleusa u 3 i 24 h tretmanu.

### Aktivnost superoksid-dismutaze nakon tretmana fulerenolom i mitomicinom c

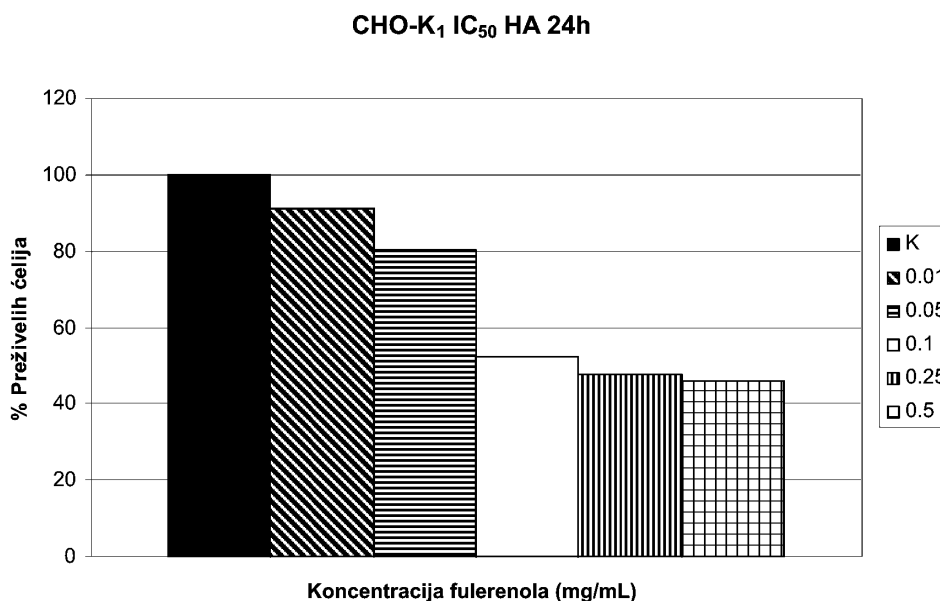
Na osnovu dobijenih eksperimentalnih rezultata, za dalje potrebe istraživanja određen je raspon sub-IC<sub>50</sub> koncentracija fulerenola u 3 i 24 h tretmanu sa MMC i u svim uzorcima određena je aktivnost superoksid-dismutaze adrenalinskom metodom.

Tretman CHO-K<sub>1</sub> ćelija mitomicinom c povećava aktivnost superoksid-dismutaze u obe vremenske tačke eksperimenta (slike 5 i 6), što govori u prilog aktivaciji antioksidativnog sistema odbrane ćelije kao odgovoru



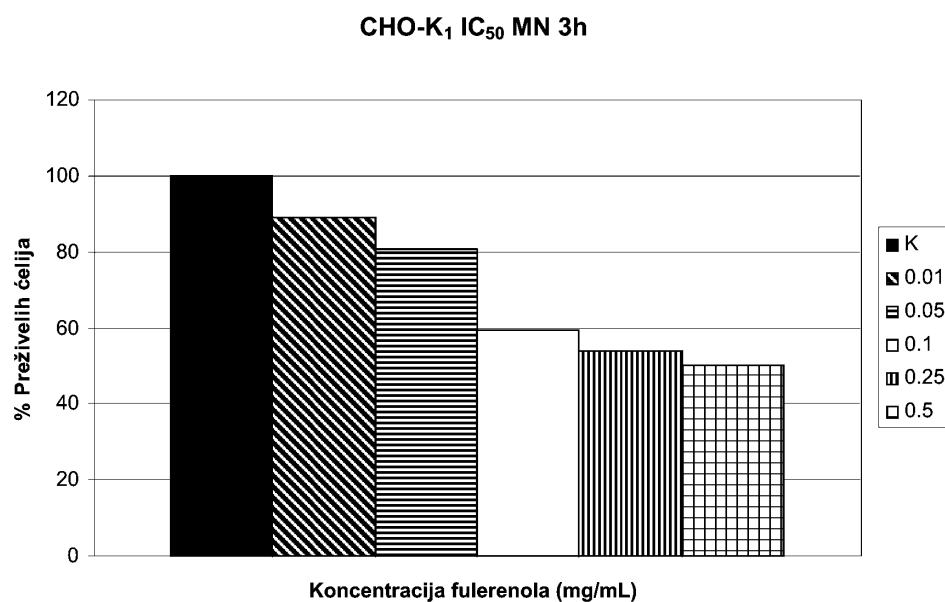
Slika 1. Efekti fulerenola na preživljavanje CHO-K<sub>1</sub> ćelija praćeni testom odbacivanja boje (DET). Ćelije su inkubirane 3 h prema protokolu za test HA.

Figure 1. Fullerene effects on surviving of CHO-K<sub>1</sub> cells monitored with dye - exclusion test (DET). Cells were incubated 3 h through protocol for HA test.



Slika 2. Efekti fulerenola na preživljavanje CHO-K<sub>1</sub> ćelija praćeni testom odbacivanja boje (DET). Ćelije su inkubirane 24 h prema protokolu za test HA.

Figure 2. Fullereneol effects on surviving of CHO-K<sub>1</sub> cells monitored with dye - exclusion test (DET). Cells were incubated 24 h through protocol for HA test.



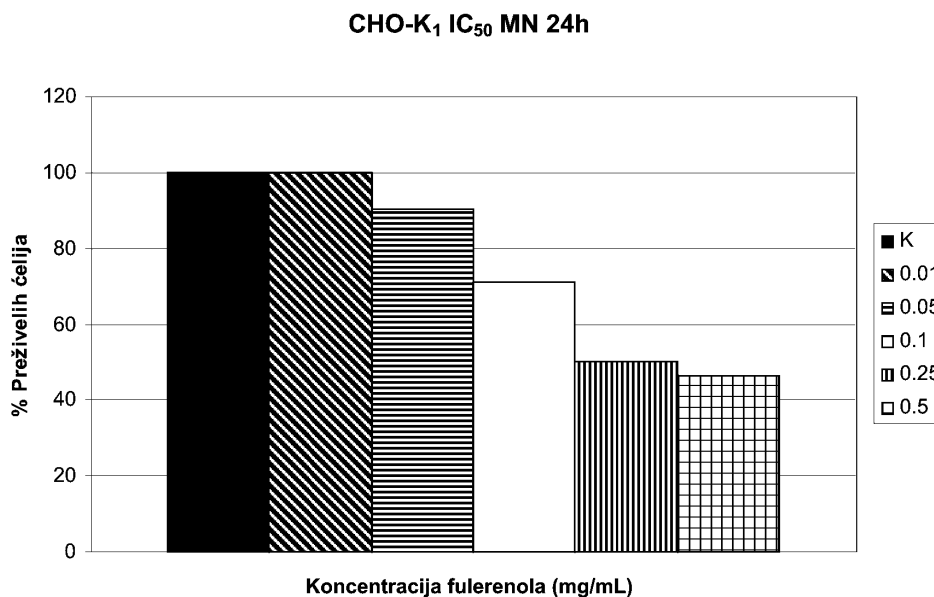
Slika 3. Efekti fulerenola na preživljavanje CHO-K<sub>1</sub> ćelija praćeni testom odbacivanja boje (DET). Ćelije su inkubirane 3 h prema protokolu za test MN.

Figure 3. Fullereneol effects on surviving of CHO-K<sub>1</sub> cells monitored with dye - exclusion test (DET). Cells were incubated 3 h through protocole for MN test.

na dejstvo citotoksičnog agensa [6,30]. Poznato je, naime, da je MMC snažan izvor hinona koji imaju potencijal da indukuju stvaranje reaktivnih kiseoničnih vrsta, u prvom redu superoksid i hidroksil radikala [8].

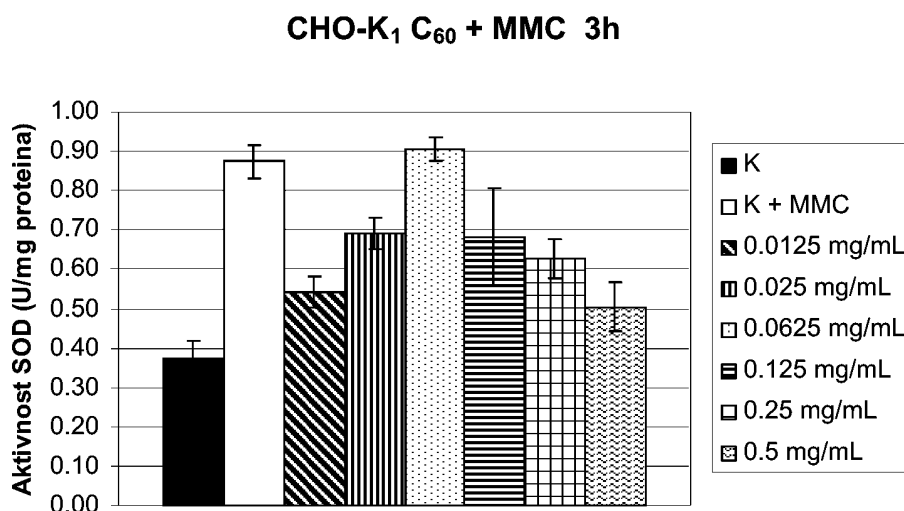
Prisustvo reaktivnih kiseoničnih vrsta utiče na aktivaciju superoksid dismutaze preko kaskade redoks reakcija kojima se pokreće složen mehanizam procesa signalne transdukcije i ekspresije gena [6,34,35].

U tročasovnom tretmanu CHO-K<sub>1</sub> ćelija tretiranih fulerenolom i MMC (slika 5) uočava se porast aktivnosti SOD sa porastom koncentracije fulerenola. Uzorci tretirani fulerenolom koncentracije 0,0625 mg/mL + MMC pokazuju aktivnost SOD u nivou sa aktivnošću u grupi uzoraka tretiranih samo mitomicinom c, što ukazuje na prooksidativna svojstva fulerenola u pojedinim koncentracijama, koja su pretpostavljena i na osnovu rezultata naših prethodnih istraživanja (nepublikovani podaci).



Slika 4. Efekti fulerenola na preživljavanje CHO-K<sub>1</sub> ćelija praćeni testom odbacivanja boje (DET). Ćelije su inkubirane 24 h prema protokolu za test MN.

Figure 4. Fullereneol effects on surviving of CHO-K<sub>1</sub> cells monitored with dye - exclusion test (DET). Cells were incubated 24 h through protocol for MN test.



Slika 5. Aktivnost superoksid-dismutaze nakon 3h tretmana fulerenolom i mitomicinom c.

Figure 5. The activity of superoxide-dismutase after 3h treatment with fullereneol and mytomycin c.

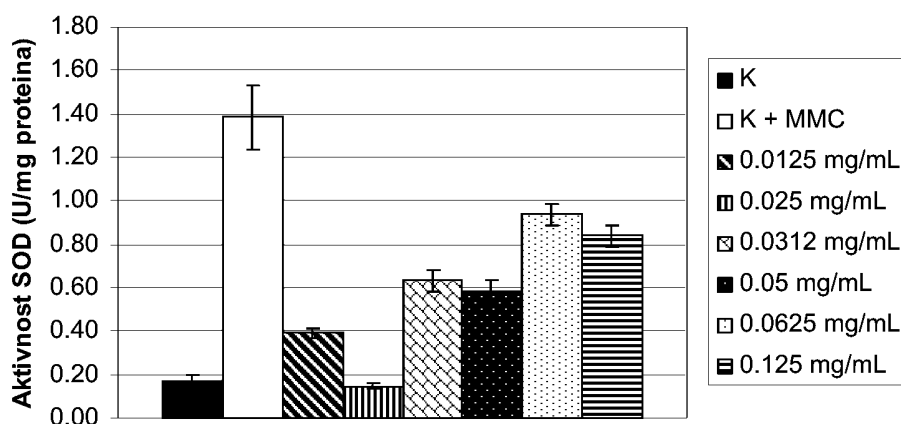
Sa daljim porastom koncentracije fulerenola opada aktivnost SOD.

U 24 h tretmanu CHO-K<sub>1</sub> ćelija fulerenolom i MMC (slika 6) uočava se značajan pad aktivnosti SOD u odnosu na vrednost kontrolnog uzorka sa MMC. Fulerenol koncentracije 0,025 mg/mL snižava aktivnost SOD ispod nivoa kontrole bez MMC.

U uzorcima tretiranim fulerenolom koncentracije 0,0625 mg/mL + MMC zabeležena je najviša aktivnost SOD u poređenju sa svim tretiranim uzorcima, ali ipak ispod nivoa aktivnosti u odnosu na vrednost uzorka sa MMC.

Snižena aktivnost superoksid-dismutaze u gotovo svim uzorcima tretiranim fulerenolom u odnosu na aktivnost uzorka sa MMC može se pripisati antioksidativnim svojstvima fulerenola [24-30], a povišenje aktivnosti enzima u jednoj koncentraciji njegovim prooksidativnim svojstvima [18-23] po obrascu koji se dešava samo u određenom rasponu koncentracija, što će svakako biti jedan od pravaca naših budućih istraživanja.

Takođe, s obzirom na istraživanja u kojima je potvrđeno da su pojedini antioksidansi (vitamin C i E) u uslovima aplikovane radijacije sposobni da u *in vitro* uslovima izvrše transfer elektrona do MMC i tako ga dodatno aktiviraju u procesu redoks kaskade koji finalno

CHO-K<sub>1</sub> C<sub>60</sub> + MMC 24h

Slika 6. Aktivnost superoksid-dismutaze nakon 24 h tretmana fulerenolom i mitomicinom c.

Figure 6. The activity of superoxide-dismutase after 24 h treatment with fullereneol and mitomycin c.

dovodi do oštećenja DNK [36], u našim daljim eksperimentima bilo bi korisno ispitati da li i fulerenol ispoljava slična svojstva i na taj način deluje sinergistički sa konvencionalnom antikancerskom terapijom koja podrazumeva kombinaciju radijacije i hemioterapeutika.

## ZAKLJUČCI

– Mitomicin c kao citotoksični agens povećava aktivnost SOD u 3 i 24 h tretmanu CHO-K<sub>1</sub> ćelija.

– U uzorcima CHO-K<sub>1</sub> ćelija tretiranih fulerenolom i MMC 3 h zapaža se povišenje aktivnosti SOD sa porastom koncentracije fulerenola sa najvišom vrednošću pri koncentraciji od 0,0625 mg/mL.

– Aktivnost SOD opada sa daljim povećanjem koncentracije fulerenola od 0,0625 mg/mL.

– U 24 h tretmanu CHO-K<sub>1</sub> ćelija sa fulerenolom i MMC zapaža se značajan pad aktivnosti SOD u odnosu na eksperimentalnu grupu sa MMC.

– Snižena aktivnost superoksid-dismutaze u gotovo svim uzorcima tretiranim fulerenolom + MMC u odnosu na grupe sa MMC može se pripisati antioksidativnim svojstvima fulerenola, a povišenje aktivnosti enzima u koncentraciji od 0,0625 mg/mL njegovim prooksidativnim svojstvima po obrascu koji se dešava samo u određenim koncentracijama, a što će svakako biti jedan od pravaca naših budućih istraživanja.

## Zahvalnica

Istraživanja su realizovana u okviru naučnog projekta broj 142076 Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije.

## LITERATURA

[1] M. Valko, J. Liebfrit, J. Moncol, M.T. Cronin, M. Maur, Free radicals and antioxidants in normal physiological

functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29** (2007) 44–84.

[2] V. Kinnula, J.D.Crapo, Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors, *Free Rad. Biol. Med.* **6** (2004) 718–744.

[3] S.P. Yarmonenko, *Radiobiology of Humans and Animals*, Moscow Mir Publishers, 1988.

[4] P. Cerruti, R. Ghos, Y. Oya, P. Amstad, The role of the cellular antioxidant defense in oxidant carcinogenesis, *Environ. Health Perspect.* **102** (1994) 100–102.

[5] J.K. Leach, K.M. Black, R.K. Schmidt-Ullrich, R.B. Mikkelsen, Activation of constitutive nitric-oxide synthase activity is an early signaling event induced by ionizing radiation, *J. Biol. Chem.* **277** (2002) 15400–15406.

[6] V. Bogdanović, *Doktorska teza*, Univerzitet u Novom Sadu, 2007.

[7] E. Lorge, V. Thybond, M.J. Aardema, J. Oliver, A. Wakata, G. Lorenzon, D. Marzin, SFTG international collaborative study on in vitro micronucleus test: I. General conditions and overall conclusions of the study, *Mutation Research* **607** (2006) 13–36.

[8] M. Sugawara, Y. Sugawara, K. Wen, C. Giulivi, Generation of oxygen free radicals in thyroid cells and inhibition of thyroid peroxidase, *Exp. Biol. Med.* **227** (2002) 141–146.

[9] H.W. Kroto, J.R. Heath, R.F. O'Brien, R.F. Curl, R.E. Smalley, C<sub>60</sub>: Buckminsterfullerene, *Nature* **318** (1985) 162–163.

[10] V. Kojić, D. Jakimov, G. Bogdanović, A. Djordjević, Effects of fullereneol C<sub>60</sub>(OH)<sub>22</sub> on cytotoxicity induced by antitumor drugs on human breast carcinoma cell lines, *Mater. Sci. Forum.* **494** (2005) 543–548.

[11] K. Irie, Y. Nakamura, H. Ohigashi, H. Tokuyama, S.Y. Yamago, E. Nakamura, Photocytotoxicity of water-soluble fullerene derivatives, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60** (1996) 1359–1361.

[12] E. Nakamura, H. Tokuyama, T. Yamago, Y. Shiraki, Y. Sugiura, Biological activity of water-soluble fullerenes. Structural dependence of DNA cleavage, cytotoxicity,

- and enzyme inhibitory activities including HIV-protease inhibition, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **69** (1996) 2143-2151.
- [13] X.L. Yang, C.H. Fan, H.S. Zhu, Photo-induced of malonic acid C<sub>60</sub> fullerene derivatives and its mechanism, *Toxicol in Vitro* **16** (2002) 41-46.
- [14] S.H. Friedman, D.L. DeCamp, R.P. Sijbesma, G. Srdanov, F. Wudl, Inhibition of the HIV-1 protease by fullerene derivatives: model building studies and experimental verification, *J. Am. Chem. Soc.* **115** (1993) 6505-6509.
- [15] T.H. Ueng, J.J. Kang, H.W. Wang, Y.W. Cheng, L.Y. Chaing, Suppression of microsomal cytochrome P450-dependent monooxygenases and mitochondrial oxidative phosphorylation by fullereneol, a polyhydroxylated fullerene C<sub>60</sub>, *Toxicol. Lett.* **93** (1997) 29-33.
- [16] T.H. Ueng, J.J. Kang, H.W. Wang, Y.W. Cheng, L.Y. Chaing, Inhibition of drug-metabolizing enzymes in mouse liver by a water soluble fullerene C<sub>60</sub>, *Fullerene Sci. Technol.* **7** (1999) 681-694.
- [17] D.J. Wolff, C.M. Barbieri, C.F. Richardson, D.I. Schuster, S.R. Wilson, Trisamine C<sub>60</sub>-fullerene adducts inhibit neuronal nitric oxide synthase by acting as highly potent calmodulin antagonists, *Arch. Biochem. Biophys.* **399** (2002) 130-141.
- [18] B. Vilen, M. Sienkiewicz, M. Lekka, J.A. Kulik, L. Forro, In vitro assay of singlet oxygen generation in the presence of water-soluble derivatives of C-60, *Carbon* **42** (2004) 1195-1198.
- [19] K.D. Pickering, M.R. Wiesner, Fullerol-sensitized production of reactive oxygen species in aqueous solution, *Environ. Sci. Technol.* **39** (2005) 1359-1365.
- [20] A. Maity, W.G. McKenna, R.J. Muschel, The molecular basis for cell cycle delays following ionizing radiation: a review, *Radiother. Oncol.* **31** (1994) 1-13.
- [21] C.M. Sayes, J.D. Fortner, W. Ghuo, D. Lyon, A.M. Boyd, K.D. Ausman, The Differential Cytotoxicity of Water-Soluble Fullerenes, *Nanoletters* **4** (2004) 1881-1887.
- [22] G. Bogdanović, M. Vojinovic-Miloradov, V. Kojić, A. Đorđević, J. Čanadi, Đ. Koruga, V.V. Baltić, D. Tabš, Biological activity of water-soluble fullerene: C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub>, *Arch. Oncol.* **5/3** (1997) 147.
- [23] Y. Yamakoshi, T. Yagami, S. Sueoshi, N. Miyata, Acridine adduct of [60] fullerene with enhanced DNA-cleaving activity, *J. Org. Chem.* **61** (1996) 7236-7237.
- [24] Y. Yamakoshi, S. Sueoshi, K. Fukuhara, N. Miyata, 'OH and O<sub>2</sub><sup>-</sup> Generation in Aqueous C<sub>60</sub> and C<sub>70</sub> Solutions by Photoirradiation: An EPR Study, *J. Am. Chem. Soc.* **120** (1996) 12363-12364.
- [25] L.L. Dugan, J.K. Gabrielsen, S.P. Yu, T.S. Lin, D.W. Cho, Buckminsterfullerene free radical scavengers reduce excitotoxic and apoptotic death of cultured cortical neurons, *Neurobiol. Dis.* **3** (1996) 129-135.
- [26] C. Yu, J.B. Bhonsle, L.Y. Wang, J.G. Lin, B.J. Chen, L.Y. Chiang, Synthetic aspects and free-radical scavenging efficiency of polyhydroxylated C<sub>60</sub>, *Full. Sci. Technol.* **5** (1997) 1407-1421.
- [27] S.C. Chuech, M.K. Lai, M.S. Lee, L.Y. Chiang, T.I. Ho, S.C. Chen, Decrease of free radical level in organ perfusate by a novel water-soluble carbon-sixty, hexa (sulfo-butyl) fullerenes, *Transpl. Proc.* **31** (1999) 1976-1977.
- [28] H.S. Lai, W.J. Chen, L.Y. Chiang, Free radical scavenging activity of fullereneol on the ischemia-reperfusion intestine in dogs, *World J. Surgery* **24** (2000) 450-454.
- [29] M.C. Tsai, Y.H. Chen, L.Y. Chiang, Polyhydroxylated C<sub>60</sub>, fullereneol, a novel free-radical trapper, prevented hydrogen peroxide- and cumene hydroperoxide-elicited changes in rat hippocampus *in-vitro*, *J. Pharm. Pharmacol.* **49** (1997) 438-445.
- [30] V. Bogdanović, K. Stankov, I. Ičević, D. Žikić, A. Nikolić, S. Šolajić, A. Djordjević, G. Bogdanović, Fullereneol C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> effects on antioxidative enzymes activity in irradiated human erythroleukemia cell line, *J. Rad. Res.* **49** (2008) 321-327.
- [31] American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, 6<sup>th</sup> ed., 1988.
- [32] K.M. Prise, G. Schettino, M. Folkard, K.D. Held, New insights on cell death from radiation exposure, *Lancet Oncol.* **6** (2005) 520-528.
- [33] H.P. Mishra, I. Fridovich, The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase, *J. Biol. Chem.* **247** (1972) 3170-3175.
- [34] H.J. Forman, Use and abuse of exogenous H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in studies of signal transduction, *Free Rad. Biol. Med.* **42** (2007) 926-932.
- [35] W. Droge, Free radicals in the control of cell function, *Physiol. Rev.* **82** (2002) 47-59.
- [36] N. Getoff, Cytostatic efficiency enhancement by vitamins C, E and β-carotene under irradiation. State of the art, *Rad. Phys. Chem.* **60** (2001) 351-358.

**SUMMARY****THE ACTIVITY OF SUPEROXIDE-DISMUTASE IN ANIMAL CELL CULTURE CHO-K<sub>1</sub> AFTER TREATMENT WITH FULLERENOL AND MYTOMICINE C**Višnja Bogdanović<sup>1</sup>, Marija Slavić<sup>2</sup>, Jasminka Mrđanović<sup>1</sup>, Slavica Šolajić<sup>1</sup>, Aleksandar Djordjević<sup>3</sup><sup>1</sup>Institute of Oncology Vojvodina, Department For Experimental Oncology, Sremska Kamenica<sup>2</sup>University of Belgrade, Institute for Biological Research "Dr Siniša Stanković", Belgrade<sup>3</sup>University of Novi Sad, Department for Chemistry, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Novi Sad

(Scientific paper)

Eukaryotic cell survives in predominantly reduced conditions. Homeostasis of cellular redox system is an imperative of cell surviving and its normal metabolism. ROS are well recognized for playing a dual role as both deleterious and beneficial species, since they can be either harmful or beneficial to living systems. These species are mutagenic compounds known to lead to DNA damage, favor cell transformation, and contribute to the development of a variety of malignant diseases. All the effects of oxidants are influenced by the cellular antioxidant defenses. This multi-layer system consists of low molecular weight components and several antioxidant enzymes. Superoxide dismutases (SODs) are the only enzymes dismuting superoxide radicals. Mitomycin C, a cross-linking agent, demonstrated genotoxicity in all *in vitro* and *in vivo* test systems in mammalian cells and animals. Water-soluble fullerenes are well known as cytotoxic agents for many cell lines *in vitro*. At the other side, fullerenols are good free radical scavengers and antioxidants both *in vitro* and *in vivo*. This paper investigates the effects of fullereneol on survival and fullereneol/mytomicine (MMC) treatment on superoxide-dismutase (SOD) activity in CHO-K<sub>1</sub> cells. Samples were treated 3 and 24 h with fullereneol (C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub>) at concentration range 0.01–0.5 mg/mL and survival was monitored with dye exclusion test (DET). The activity of total SOD was estimated in samples treated with chosen concentrations of fullereneol and MMC (0.5 and 0.1 µg/mL) after 3 and 24 h of cell incubation. Increasing of C<sub>60</sub>(OH)<sub>24</sub> concentration leads to decreasing of percent of surviving cells 3 and 24 h after incubation. The activity of total SOD enhanced with higher concentration of fullereneol, while decreased in the highest concentration at both experimental points. In samples treated with MMC, as well as in samples treated with fullereneol (0.0625 mg/mL) + MMC was noticed boost in total SOD activity in comparison with controls. Treatment with fullereneol decreased SOD activity in rest of samples treated with MMC. Decreased activity of superoxide-dismutase in almost all samples treated with fullereneol and MMC might be contributed to antioxidative properties of fullereneol. Increased enzyme level at concentration of 0.0625 mg/mL may be due to its prooxidative activity.

**Ključne reči:** Ćelijska kultura • Fullereneol • Mitomicin c • Superoksid dismutaza

**Key words:** Cell culture • Fullereneol • Mytomicin c • Superoxide dismutase