

UNIVERZITET U KRAGUJEVCU
AGRONOMSKI FAKULTET U ČAČKU



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF AGRONOMY ČAČAK

XXIV SAVETOVANJE O BIOTEHNOLOGIJI

sa međunarodnim učešćem

- ZBORNİK RADOVA 2 -



Čačak, 15 - 16. Mart 2019. godine

XXIV SAVETOVANJE O BIOTEHNOLOGIJI

sa međunarodnim učešćem

- Zbornik radova 2 -

ORGANIZATOR I IZDAVAČ

Univerzitet u Kragujevcu,
Agronomski fakultet u Čačku

Organizacioni odbor

Prof. dr Goran Dugalić, prof. dr Biljana Veljković, prof. dr Ljiljana Bošković-Rakočević, prof. dr Drago Milošević, dr Nikola Bokan, dr Milun Petrović, dr Milan Nikolić, dr Ranko Koprivica, dipl. inž. Miloš Petrović

Programski odbor

Prof. dr Snežana Bogosavljević-Bošković, prof. dr Radojica Đoković, prof. dr Milena Đurić, prof. dr Milomirka Madić, prof. dr Leka Mandić, prof. dr Drago Milošević, prof. dr Tomo Milošević, prof. dr Aleksandar Paunović, prof. dr Lenka Ribić-Zelenović, prof. dr Vladeta Stevović, prof. dr Gordana Šekularac, dr Vladimir Kurćubić, vanredni profesor, dr Goran Marković, vanredni profesor, dr Pavle Mašković, vanredni profesor, dr Gorica Paunović, vanredni profesor, dr Snežana Tanasković, vanredni profesor, dr Tomislav Trišović, vanredni profesor, dr Milan Lukić, naučni saradnik, prof. dr Mlađan Garić

Tehnički urednici

Dr Milun Petrović, dipl.inž. Miloš Petrović, dipl.inž. Dušan Marković

Tiraž: 180 primeraka

Štampa

Grafička radnja štamparija Bajić, V. Ignjatovića 12, Trbušani, Čačak
Godina izdavanja, 2019

IN VIVO ANTIGENOTOKSIČNA AKTIVNOST ELAGINSKE I GALNE KISELINE

Sanja Matić, Snežana Stanić, Milica Kanjevac

Izvod: Polazeći od činjenice da sekundarni metaboliti imaju funkcionalnu vrednost za ljudski organizam u radu je ispitivana antigenotoksična aktivnost elaginske i galne kiseline u odnosu na etil metanosulfonat indukovano DNK oštećenje u germinativnim i somatskim ćelijama kod *Drosophila melanogaster*, primenom SLRL i komet testa. Galna i elaginska kiselina redukuju frekvencu X-vezanih mutacija u germinativnim ćelijskim linijama i ispoljavaju antigenotoksični efekat sa procentom redukcije DNK oštećenja većim od 50%. Rezultati potvrđuju opravdanost primene ispitivanih fenolnih kiselina u sprečavanju pojave ili smanjenju stope genetičkih oštećenja koja mogu biti uzrok brojnih oboljenja.

Ključne reči: antigenotoksična aktivnost, *Drosophila melanogaster*, galna kiselina, elaginska kiselina

Uvod

Biljke, sekundarnim metabolizmom, proizvode različite materije: terpenoide, iridoide, alkaloidne, fenolna jedinjenja, flavanoide, vitamine i dr. koje imaju funkcionalnu vrednost za ljudski organizam, delujući u smislu zaštite od bolesti. Iako se flavonoidi smatraju glavnim bioaktivnim polifenolima, sve više se proučava biomedicinski potencijal fenolnih kiselina i njihovo blagotvorno delovanje na zdravlje ljudi (Saxena i sar., 2012.; Rosa i sar., 2016.). Unos dovoljne količine fenolnih kiselina, preko namirnica biljnog porekla, ima značajnu ulogu u zaštiti organizama od štetnog oksidativnog stresa (Leopoldini i sar., 2011.).

Fenolne kiseline široko su rasprostranjene u voću, povrću, žitaricama i u brojnim lekovitim biljnim vrstama (Janicsak i sar., 1999.). Izvori galne kiseline jesu jabuke, breskve, citrusni plodovi i povrće. Elaginska kiselina je prisutna u jagodi (162 mg/100 g suve materije), malini (415 mg/100 g suve materije), grožđu i orašastim plodovima (Toth i sar., 2003.).

Obzirom na to da su mnoge bolesti čoveka u vezi sa promenom strukture naslednog materijala, veliki broj naučnih istraživanja bazira se na otkrivanju jedinjenja, kako prirodnog tako i veštačkog porekla, koja utiču na funkciju DNK, ali i na funkciju reparacionih mehanizama. U ove svrhe se sve više koriste *in vivo* i *in vitro* testovi, kako na prokariotskim tako i na eukariotskim organizmima. *In vivo* eksperimenti na eukariotskim model organizmima imaju prednost jer prikazuju stvarni metabolički efekat i obezbeđuju značajne rezultate za razumevanje biološke aktivnosti ispitivanih jedinjenja (Zimonjić i sar., 1990.).

Cilj ovog rada je ispitivanje potencijalne antigenotoksičnosti odabranih fenolnih kiselina (galne i elaginske) u odnosu na etil metanosulfonatom (EMS) indukovano DNK oštećenje u germinativnim i somatskim ćelijama kod *Drosophila melanogaster*, primenom SLRL (ehr. *Sex Linked Recessive Lethal*) i komet testa.

Materijal i metode rada

Jedinke *D. melanogaster* (Bloomington Stock Centre, Indiana, USA) se čuvaju u teglicama sa hranjivim supstratom na konstantnoj temperaturi od 25°C i pri relativnoj vlažnosti od 60%.

Test za detekciju germinativnih mutacija: Primenom testa za detekciju polno vezanih recesivno letalnih mutacija, dobijene frekvence X vezanih mutacija, indukovanih kod mužjaka laboratorijske linije "Canton S", prikazane su za četiri grupe: prva grupa je tretirana rastvorom saharoze (1%), druga grupa je tretirana dokazanim mutagenom EMS-om (0,75 ppm), treća grupa (post-tretman) je tretirana EMS-om (0,75 ppm) 24 h pre tretmana sa galnom kiselinom (100 ppm, kataloški broj 149-91-7, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) i četvrta grupa (post-tretman) je tretirana EMS-om 24 h pre tretmana sa elaginskom kiselinom (100 ppm, kataloški broj 133039-73-3, TCI, Tokyo Chemical Industry CO., LTD). SLRL test je izveden prema standardnoj proceduri (Würgler i Graf, 1985.).

Test za detekciju somatskih mutacija: Za izvođenje komet testa koristi se prednji deo zadnjeg creva larvi na trećem stupnju razvika laboratorijske linije "Canton S". Jedna grupa larvi (10 larvi po grupi) starosti 72 ± 2 sata ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) prebacuje se na hranjivu podlogu (negativna kontrola), druga grupa na supstrat sa etil metanosulfonatom (5 mM, pozitivna kontrola), treća grupa na supstrat sa 5 mM EMS-om i 1 mM galnom kiselinom i četvrta grupa na supstrat sa 5 mM EMS-om i 1 mM elaginskom kiselinom. Komet test je izveden prema standardnoj proceduri (Singh i sar., 1988.) modifikovanoj od strane Mukhopadhyay i sar. (2004.). Pločice se boje etidijum bromidom (75 μl) i pokriju pokrovnim staklom. Primenom fluorescentnog mikroskopa Nikon (Ti-Eclipse) analiziraju se i slikaju ćelije, za svaki uzorak 3 merenja po 100 ćelija. Step en zaštite DNK utvrđuje se pomoću % DNK u repu i procenta redukcije DNK oštećenja (%R).

Statistička obrada podataka: Statistički značajna razlika utvrđena je na nivou greške od 5% ($p < 0,05$) testiranjem razlike između proporcija - razlika između velikih nezavisnih uzoraka (Petz, 1985.) i primenom analize varijanse (ANOVA test). Za statističku obradu podataka korišćen je kompjuterski softverski program SPSS verzija 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

Rezultati istraživanja i diskusija

U radu su prikazani rezultati antigenotoksičnog potencijala galne i elaginske kiseline, dobijeni primenom dva testa na *D. melanogaster*, SLRL test za detekciju X vezanih mutacija u premejotičkim i postmejotičkim germinativnim ćelijama, i komet test primenjen za detektovanje somatskih mutacija.

Učestalost polno vezanih recesivnih letalnih mutacija u prvoj grupi (koja predstavlja negativnu kontrolu) je u sva tri legla najniža što je i očekivano jer tretman

saharozom pokazuje spontanu stopu mutacije (Tabela 1, kolona 2). Iz kolone 3 uočava se da EMS (primenjen u koncentraciji od 0,75 ppm) indukuje visoku stopu mutacija u premejičkim i postmejičkim germinativnim ćelijama.

Tabela 1. Antigenotoksična aktivnost galne i elaginske kiseline
Table 1. Antigenotoxic activity of gallic and ellagic acids

	Tretman Treatments								
	S ^a	EMS ^b	EMS+GK ^c EMS+GA ^e	EMS+EK ^d EMS+EA ^d	t _{S/EMS}	t _{S/EMS+GK} t _{S/EMS+GA}	t _{S/EMS+EK} t _{S/EMS+EA}	t _{EMS/EMS+GK} t _{EMS/EMS+GA}	t _{EMS/EMS+EK} t _{EMS/EMS+EA}
I leglo Σ I brood Σ	92	104	88	72	8,3	0,6	0,75	7,1	5,7
Broj letala No. of lethal	12	64	18	16	p < 0,001***	p > 0,05	p > 0,05	p < 0,001***	p < 0,001***
% letala % of lethal	13,04	61,5	20,5	22,2					
II leglo Σ II brood Σ	96	90	56	80	6,7	1,8	2,5	3,5	3,4
Broj letala No. of lethal	10	44	12	20	p < 0,001***	p > 0,05	p < 0,05*	p < 0,001***	p < 0,001***
% letala % of lethal	10,4	48,9	21,4	25					
III leglo Σ III brood Σ	64	108	32	62	5,3	0,9	0,5	3,6	4,7
Broj letala No. of lethal	6	44	5	8	p < 0,001***	p > 0,05	p > 0,05	p < 0,001***	p < 0,001***
% letala % of lethal	9,4	40,7	15,6	12,9					
I+II+III Σ	252	302	176	214	13,3	2,1	2,9	7,8	7,3
Broj letala No. of lethal	28	152	35	44	p < 0,001***	p < 0,05*	p < 0,01**	p < 0,001***	p < 0,001***
% letala % of lethal	11,1	50,3	19,9	20,6					

^aS; Saharozna; negativna kontrola, 1%

^bS; Sucrose; negative control, 1%

^cEMS; etil metanosulfonat, pozitivna kontrola, 0,75 ppm

^dEMS; ethyl methanesulfonate, positive control, 0.75 ppm

^eEMS+GK; etil metanosulfonat 0,75 ppm + galna kiselina 100 ppm

^fEMS+GA; ethyl methanesulfonate 0.75 ppm + gallic acid 100 ppm

^gEMS+GK; etil metanosulfonat 0,75 ppm + elaginska kiselina 100 ppm

^hEMS+GA; ethyl methanesulfonate 0.75 ppm + ellagic acid 100 ppm

Statistički značajne razlike: p < 0,01**, p < 0,001***

Statistically significant difference: p < 0.01**, p < 0.001***

U Tabeli 1 prikazane su potencijalne antigenotoksične aktivnosti galne i elaginske kiseline, odnosno sposobnosti da smanje frekvencu germinativnih mutacija izazvanih u post-tretmanu etil metanosulfonom.

Poređenjem frekvencija X vezanih mutacija indukovanih kod mužjaka tretiranih EMS-om i mužjaka sa post-tretmanom (EMS + galna kiselina) uočava se značajno smanjenje stope mutacija u sva tri legla (Tabela 1). U poređenju sa negativnom kontrolom ova fenolna kiselina je pokazala sposobnost zaštite DNK od oštećenja izazvanog

tretmanom sa alkilirajućim agensom. Dobijeni rezultati ukazuju na to da galna kiselina ispoljava antigenotoksično svojstvo, odnosno da smanjuje stopu mutacija prethodno indukovanih EMS-om kako u premejotičkim, tako i u postmejotičkim stupnjevima ćelija.

Iako je tretman sa EMS-om doveo do značajnog povećanja u učestalosti mutacija u sva tri legla, post-tretman sa elaginskom kiselinom (Tabela 1) drastično je redukovao frekvencu recesivno letalnih X-vezanih mutacija, kako u premejotičkim, tako i u postmejotičkim germinativnim ćelijskim linijama.

U Tabeli 2 prikazana je antigenotoksična aktivnost galne i elaginske kiseline na osnovu kvantitativnog parametra: % DNK u repu, u ćelijama koje su dobijene izolovanjem prednjeg dela zadnjeg creva larvi vrste *D. melanogaster*.

Tabela 2. Antigenotoksična aktivnost galne i elaginske kiseline primenom komet testa
Table 2. Antigenotoxic activity of gallic and ellagic acids using comet assay

Tretman ^a Treatments ^a	% ДНК у репу % of DNA in tail	%R ^c
Negativna kontrola Negative control	5,4±0,61 [†]	/
EMS ^b	61,5±1,2 [*]	/
EMS + GK ^c EMS + GA ^c	23,8±0,31 ^{*†}	67,2
EMS + EK ^d EMS + EA ^d	30,3±0,7 ^{*†}	55,6

^aRezultati predstavljaju s.v. ± s.d. tri nezavisna eksperimenta

^aValues represented mean ± S.D. of three independent experiments

^bEMS; etil metanosulfonat, 5 mM

^cEMS + GK; etil metanosulfonat 5 mM + galna kiselina 1 mM

^cEMS + GA; ethyl methanesulfonate 5 mM + gallic acid 1 mM

^dEMS + EK; etil metanosulfonat 5 mM + elaginska kiselina 1 mM

^dEMS + EA; ethyl methanesulfonate 5 mM + ellagic acid 1 mM

^e%R; procenat redukcije

^e%R; percentage of reduction

^{*}p < 0,05 u odnosu na negativnu kontrolu; [†]p < 0,05 u odnosu na pozitivnu kontrolu.

^{*}p < 0.05 when compared with the negative control; [†]p < 0.05 when compared with the positive control.

Nakon *in vivo* kombinovanog tretmana EMS-om i galnom kiselinom procenat redukcije DNK oštećenja iznosio je 67,2%, dok je pomenuti procenat kod kombinovanog tretmana sa EMS-om i elaginskom kiselinom 55,6%. Na osnovu dobijenih rezultata zaključujemo da pomenute fenolne kiseline, imaju značajni antigenotoksični efekat sa procentom redukcije DNK oštećenja većim od 50%.

Zaključak

Na osnovu primene SLRL i komet testa na široko korišćenom model organizmu *D. melanogaster*, može se zaključiti da odabrane fenolne kiseline pokazuju visok stepen smanjenja DNK oštećenja indukovano EMS-om, što dokazuje da ispitivane fenolne kiseline imaju antigenotoksični efekat. Rezultati potvrđuju opravdanost primene ispitivanih fenolnih kiselina kao agenasa sa antigenotoksičnom aktivnošću u sprečavanju pojave ili smanjenju stope genetičkih oštećenja koja mogu biti uzrok brojnih oboljenja.

Napomena

Istraživanja u ovom radu deo su projekta III 43004 i 41010 koje finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Literatura

- Janicsak G., Mathe I., Miklossy-Vari V., Blunden V. (1999). Comparative studies of the rosmarinic and caffeic acid contents of Lamiaceae species. *Biochemical Systematics and Ecology* 27, 733-738.
- Leopoldini M., Russo N., Toscano M. (2011). The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chemistry* 125 (2), 288-306.
- Mukhopadhyay I., Kar C.D., Bajpayee M., Dhawan A. (2004). Evaluation of *in vivo* genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 19, 85-90.
- Rosa L.S., Silva N.J.A., Soares N.C.P., Monteiro M.C., Teodoro A.J. (2016). Anticancer properties of phenolic acids in colon cancer-a review. *Journal of Nutrition and Food Sciences* 6, 468.
- Saxena M., Saxena J., Pradhan A. (2012). Flavonoids and phenolic acids as antioxidants in plants and human health. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 16 (2), 130-134.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184-191.
- Toth I., Heraul F., Beutin L., Oswald E. (2003). Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new *cdt* variant (type IV). *Journal of Clinical Microbiology* 41, 4285-4291.
- Zimonjić D., Savković N., Anđelković M. (1990). Genotoksični agensi: efekti, principi i metodologija detekcije. Beograd, Srbija: Naučna knjiga.
- Würgler F.E., Graf U. (1985). Mutagenicity testing with *Drosophila melanogaster*. In: Basic and applied mutagenesis. Muhammed A., Von Borster R.C. (eds), 343-372. New York: Plenum Press.

IN VIVO ANTIGENOTOXIC ACTIVITY OF ELLAGIC AND GALLIC ACIDS

Sanja Matić, Snežana Stanić, Milica Kanjevac

Abstract

Starting from the fact that secondary metabolites have a functional value for the human, in this work the antigenotoxic activity of ellagic and gallic acids in relation to ethylmethanesulfonate induced DNA damage in germinative and somatic cells in *Drosophila melanogaster*, was investigated using SLRL and comet assays. Gallic and ellagic acids reduce the frequency of X-linked mutations in germ cell lines and exhibit antigenotoxic effect with a percentage reduction in DNA damage greater than 50%. The results confirm the justification of the application of investigated phenolic acids in preventing the occurrence or reducing the rate of genetic damage which can be the cause of many diseases.

Key words: antigenotoxic activity, *Drosophila melanogaster*, gallic acid, ellagic acid

**CIP- Каталогизација у публикацији
Народна библиотека Србије**

63(082)
606:63(082)

САВЕТОВАЊЕ о биотехнологији са међународним учешћем (24 ; 2019 ;
Чачак)

Zbornik radova. 2 / XXIV savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim
učešćem, Čačak, 15-16. mart 2019. godine ; [organizator] Univerzitet u
Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku = [organized by] University of
Kragujevac, Faculty of Agronomy, Čačak. - Čačak : Univerzitet u Kragujevcu,
Agronomski fakultet, 2019 (Čačak : Bajić). - Str. 483-845 : ilustr. ; 25 cm

Radovi na srp. i engl. jeziku. - Tiraž 180. - Bibliografija uz svaki rad. -
Abstracts.

ISBN 978-86-87611-68-9
ISBN 978-86-87611-69-6 (niz)

1. Агрономски факултет (Чачак)

- a) Пољопривреда - Зборници
- b) Биотехнологија - Зборници

COBISS.SR-ID 274576652