
Luka Mihajlović

Antimutagena svojstva soka crne ribizle (*Rubus nigrum*)

Ispitivana su antimutagena svojstva soka ribizle i količina antocijana u njemu. Koncentracija antocijana je određivana pH-diferencijalnom metodom, a antimutageni efekat brojanjem mikronukleusa u kulturi limfocita čoveka. Utvrđeno je da plod biljke poseduje antimutagena svojstva, ali da je sadržaj antocijana vrlo nizak i ne objašnjava ovakva svojstva biljke.

Uvod

Slobodni radikali su jedinjenja koja nastaju u nizu reakcija normalnog metabolizma, kao i u toku neutralizacije ksenobiotika ili pri uticaju nekih spoljnih faktora (npr jonizujuće zračenje). Visoka reaktivnost slobodnih radikala i mala selektivnost čine ih opasnim za integritet i funkcionalnost ćelije. Između ostalog, iniciraju proces lipidne peroksidacije ćelijske membrane. Tokom evolucije organizama razvili su se odgovarajući odbrambeni mehanizmi od slobodnih radikala. Međutim, niz patoloških situacija uzrokuje povećano stvaranje slobodnih radikala, pri čemu se prevazilazi kapacitet odbrambenih mehanizama. Pretpostavlja se da slobodni radikali učestvuju u patogenezi velikog broja oboljenja (Zimonjić 1990). Slobodni radikali mogu da reaguju sa molekulima DNK dovodeći do mutacija različitog obima. U antioksidanse spadaju različita jedinjenja kao što su flavonoidi, antocijani, organske kiseline, vitamini i različita redukciona sredstva. Prisustvo antocijana kao antioksidanasa bi trebalo da spreči mutageno dejstvo slobodnih radikala.

Ribizla (*Rubus nigrum*) je biljka iz familije Saxifragaceae. Plod ribizle se koristi u ljudskoj ishrani i to svež ili prerađen (sok, žele). Plod, pored šećera,

vitamina i organskih kiselina, sadrži i antocijane (Stanković 1982). Antocijane nalazimo u biljkama gde imaju ulogu biljnih pigmenata crvene ili plave boje. Novijim ispitivanjima je utvrđeno da poseduju antioksidansna i antimutagena svojstva koja nisu dovoljno ispitana (Yukiaki, Yukihiko 1999; Ghiselli *et al.* 1998).

Cilj ovog rada je da se odredi sadržaj antocijana u ribizli i ispita da li sok dobijen iz ploda ove biljke poseduje antimutagena svojstva.

Materijal i metode

U radu su korišćeni plodovi crne ribizle (*Rubus nigrum europicum*) iz kojih je ceđen sok. Radi skladištenja i transporta sok je zamrzavan na -20°C i pre upotrebe odmrzavan na sobnoj temperaturi.

Količina antocijana u soku je određivana pH-diferencijalnom metodom. Reagensi su pufer 0.025 M kalijum hlorid (pH = 1.0) i 0.4 M natrijum acetatni pufer (pH = 4.5). Prvo je određivan faktor razblaženja, tako što je uzorak razblaživan u puferu kalijum hlorida pH = 1. Potrebno je da apsorbancu uzorka ulazi u linearni opseg spektrofotometra tj. da apsorbancu bude manja od 1.2. Nakon određivanja faktora razblaženja, pripremano je po deset istih razblaženja uzoraka u oba pufera. Ova razblaženja su ostavljena da odstoje 15 minuta, nakon čega je merena apsorbancu svakog uzorka na λ_{max} i $\lambda = 700$ nanometara. Kao slepa proba za sve uzorke korišćena je destilovana voda.

Konačna apsorbancu se računa po formuli:

$$A = |(\lambda_{\text{max}} - \lambda_{700})_{\text{pH}1.0} - (\lambda_{\text{max}} - \lambda_{700})_{\text{pH}4.5}|$$

Količina ukupnih antocijana u soku se računa po formuli:

$$\text{ukupni antocijani (g/L)} = (A \text{ Mr FR } 1000)/\epsilon$$

gde su Mr molekulska masa (449.2), FR factor razblaženja (ovde je iznosio 40), ϵ je molarni apsorpcioni koeficijent koji ovde iznosi 26900.

Luka Mihajlović (1984), Beograd, Save Kovačevića 66/1, učenik 3. razreda Treće beogradske gimnazije

Antimutagena svojstva su određivana brojanjem mikronukleusa u kulturi humanih limfocita. Princip metode se zasniva na tome da kod ćelija koje su u deobi može doći do hromozomskih aberacija, koje se manifestuju stvaranjem ring hromozoma i mikronukleusa. Mikronukleusi su delovi hromozoma bez centromere. Ovim ćelijama se nakon deobe jedra dodaje citoholazin B koji prekida deobu ćelije i nastaju binuklearne ćelije. Kod ovih ćelija koje su podlegle mutaciji mikronukleusi se mogu videti pod mikroskopom. Zavisno od stepena izloženosti kulture ćelija mutagenom agensu menja se i broj mikronukleusa. Kao model sistem se najčešće koristi kultura humanih limfocita koja se izlaže jonizujućem zračenju. Zračenje, kojem su ćelije podvrgnute, dovodi, osim direktnog mutagenog dejstva na DNK i do stvaranja slobodnih radikala u citoplazmi.

Kultura ćelija je pripremana na sledeći način: 8 mL sterilno uzete heparinizirane venske krvi podeljeno je na dva alikvota i jedan od alikvota je akutno ozračen izvorom kobalta ^{60}Co (gama zračenje), dozom od dva greja (Gy). Postavljeno je osam kultura limfocita iz ozračene krvi. Kulture su rađene u duplikatu. Prva grupa je bila pozitivna kontrola, a drugu, treću i četvrtu grupu su činile kulture u koje je redom dodato 0.05, 0.1 i 0.2 mL soka. Neozračene kulture su postavljane na isti način, pri čemu je jedina razlika to što je korišćena neozračena puna krv. Posle 48 h inkubacije na 37°C u svaku od postavljenih kultura dodato je 0.1 mL citoholazina B i inkubacija je nastavljena 24 h. Nakon ovoga pripremani su razmazi na mikroskopskim pločicama koji su bojeni Giemsa-om i koji su posmatrani na uvećanju 1000× (objektiv uljane imerzije). Posmatrane su ćelije koje su prošle prvu deobu (binuklearne), i to 1000 ćelija po kulturi. U tim ćelijama su brojani mikronukleusi.

Rezultati i diskusija

Nakon određivanja sadržaja ukupnih antocijana izračunata je srednja vrednost koncentracije antocijana u soku i ona iznosi 12 ± 3 . Potrebne količine antocijana za ostvarivanje antimutagene aktivnosti iznose 300-400 mg (Muller 1996), tako da dobijene količine antocijana ne objašnjavaju antimutagena svojstva biljke. Moguće je da se ovakva svojstva biljke zasnivaju na prisustvu nekog drugog antioksidansa.

Ispitivanjem antimutagenih svojstava ribizle utvrđeno je da postoji velika razlika u broju mikro-

nukleusa u limfocitima između kultura u koje je dodavan sok ribizle i kultura u koje on nije dodavan. Najveći broj mikronukleusa je nađen u ozračenoj grupi u koju nije dodavan sok ribizle 181.48 / 1000 binuklearnih limfocita, a najmanji u neozračenoj grupi u koju je dodavano 0.1 mL soka 18.5 / 1000 binuklearnih limfocita (tabela 1). Rezultati pokazuju da povećanje količine soka u kulturi dovodi do smanjenja broja mikronukleusa.

Tabela 1. Broj mikronukleusa u kulturi ćelija (mikronukleusa/1000 ćelija)

Grupa	Neozračeni uzorak	Ozračeni uzorak
I – kontrola	42.5	181.48
II – dodato 0.05 mL soka	36.4	149.4
III – dodato 0.1 mL soka	18.5	120.4
IV – dodato 0.2 mL soka	23.1	120.4

Zaključak

Utvrđeno je da sok ribizle poseduje izvesna antimutagena svojstva, koja se ogledaju u smanjenju broja mikronukleusa u ozračenim i neozračenim kulturama limfocita. Nakon izvršenih ispitivanja utvrđeno je da je koncentracija antocijana suviše niska da bi se njome objasnio antimutageni efekat. Da bi se u potpunosti objasnila antimutagena svojstva soka crne ribizle potrebno je sprovesti dalja ispitivanja.

Literatura

- Muller S., Patterson B. 1996. Radioprotective effects of antioxidative plant flavonoids in mice. *Mutat Res*, **350**: 153-61.
- Savić M. 1995. Kontrola proizvoda od voća i povrća. Beograd: MP Potez
- Ghiselli A., Nardini M., Baldi A., Scaccini C. 1998. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from Italian red wine. *J. Agric Food Chem*, **11**: 35-40.
- Yukiaki K., Yukihiko H. 1999. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. *Mutat Res*, **436**: 69-97.
- Simić T., Marković I. *Priručnik za vežbe iz biohemije* Beograd: Institut za biohemiju, Medicinski fakultet

Stanković D. 1982. *Ribizla, ogrozd, borovnica, kupina*. Beograd: Nolit

Zimonjić D. 1990. *Genotoksični agensi*. Beograd: Naučna knjiga

Luka Mihajlović

Antimutagenic Properties of Black Currant Berry (*Rubus nigrum*)

Black currant (*Rubus nigrum europicum*) is a common plant whose berries are widely used in human consumption. It was assumed that berry filtrate would show antimutagenic properties, due to the presence of anthocyanins, which are recently found to possess antioxidative and antimutagenic properties. The research included determination of anthocyanin concentration and antimutagenic properties of black currant berry. Anthocyanin concentration was measured spectrophotometrically, using the Fuleki-Francis pH differential method. This method is based on

a specific ability of anthocyanins to undergo reversible structural transformation with a change in pH, which is manifested in strikingly different absorbance spectra. Antimutagenic properties were determined using the human lymphocyte micronucleus count method. Berries were homogenized and the filtrate was added to human lymphocytes culture, which was then exposed to ionising radiation (source ^{60}Co , 2 Gy), and after the incubation and culture preparation the micronuclei were counted. The cultures were divided in 2 major groups, control and irradiated group, and different amounts of berry filtrate were added (0.05 mL, 0.1 mL and 0.2 mL filtrate).

It was found that berry filtrate possesses antimutagenic properties which depend on its concentration in cultures. A dose of 0.1 filtrate/5 mL culture showed the greatest decrease in the number of micronuclei. Anthocyanin concentration was found to be 12×3 mg/L. This concentration, however, is not sufficient to explain the antimutagenic effect. Further investigations, with a goal to fully explain the investigated characteristics of black currant, should be performed.