
Dragomir Milovanović, Arpad Kiralj, Marina Arnaut

Ispitivanje antimutagenog dejstva infuza od nevena, bokvice i koprive testom somatskih mutacija i rekombinacija

Testom somatskih mutacija i rekombinacija ispitivana su svojstva različitih čajeva nevena, bokvice i koprive na vinske mušice *Drosophila melanogaster*. U toku testiranja radeno je akutno, hronično tretiranje i vršen je posttretman. U ispitivanju je korišćen metil-metanosulfat (MMS) kao dokazni, jak mutagen sa izraženim alikilirajućim svojstvima. Na osnovu ukupnog broja uočenih mrlja (registrovanih mutacija) zaključuje se da su akutni test koprive i hronični test bokvice pokazali nemutagena svojstva i to u odnosu na negativnu, vodenu kontrolu, dok svi tretmani sa ovim tradicionalnim biljkama pokazuju odsustvo mutagenog efekta u odnosu na pozitivnu kontrolu sa 3 mM MMS kao mutagenom. Ovo je posebno bitno kada se posmatraju rezultati u posttretmanu, koji pokazuju da infuzi ovih biljaka u velikoj meri snižavaju stopu mutacija izazvanu MMS, delujući tako antimutageno.

Uvod

Neven (*Calendula officinalis*), kopriva (*Urtica dioica*) i bokvica (*Plantago lanceolata*) poznate su biljke koje se koriste u terapiji zbog svog antioksidantnog dejstva (Kovačević 2000). Zajednička osobina sve tri vrste je prisustvo flavonoida kao glavne aktivne supstance. Polifenolni karakter ovih jedinjenja utiče na inhibiciju enzima (hijaluronidazu, elastazu i katehol- σ -metiltransferazu), usporavanje procesa razlaganja elastina, a potvrđeno je i njihovo diuretično, antimikrobno i antioksidativno dejstvo (Andersen i Markham 2006).

Prethodna istraživanja su pokazala antimutageno dejstvo različitih vrsta biljaka koje se koriste u ishrani, poput paprike (*Capiscum annuum*) i crnog bibera (*Piper nigrum*). Od tradicionalnih lekovitih biljaka ispitivane su kamilica (*Matricaria chamomilla*), sitnolisna lipa (*Tilia cordata*), menta (*Mentha piperita* i *Mentha pulegium*), mačiji nokat (*Uncaria tomentosa*) valerijana (*Valeriana officinalis*), *Curcuma longa*. Među aktivnim

Dragomir Milovanović (1988), Zemun, Zagorska 24/17, učenik 4. razreda Pete beogradske gimnazije

Arpad Kiralj (1989), Sombor, XII vojvodanske brigade 5/4, učenik 3. razreda Medicinske škole u Somboru

Marina Arnaut (1988), Rumenka, Danila Kiša 25, učenica 4. razreda Medicinske škole u Novom Sadu

MENTOR:
Aleksandra Patenković, Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Beograd

supstancama ovih biljaka javljaju se i supstance polifenolnog karaktera poput flavonoida koji je aktivna supstanca biljaka ispitivanih u radu. (Hamss *et al.* 1999, Hams *et al.* 2003, Romero-Jimenez *et al.* 2005).

Veliki broj genotoksikoloških istraživanja radi se na vrsti vinske mušice *Drosophila melanogaster*, koja je i poslužila kao prvi model-organizam za genotoksikološka istraživanja. Pogodnost za genetičke analize leži u činjenici da vrste roda *Drosophila* poseduju relativno mali broj gena, a istovremeno, kao višćelijski eukariot poseduju hromozomsku organizaciju sličnu sisarskoj (Zimonić *et al.* 1990). Više od četvrt veka vrši se ispitivanje uticaja hemijskih supstanci na mutacije i rekombinacije u somatskim ćelijama ove vrste. Ove promene se registruju testom somatskih mutacija i rekombinacija SMART (Somatic Mutation And Recombination Test). Korišćenje ovog testa zasniva se na tretiranju larvi, a broj mutiranih mrlja koje se pojave na krilima adulta ukazuju na učestalost genetičke promene, dok veličina ukazuje na vreme dejstva mutagena tokom embriogeneze (Graf *et al.* 1984, Petrović 2004).

Cilj istraživanja je utvrđivanje antimutagenog dejstva infuza od nevena, koprive i bokvice na laboratorijskoj liniji vinske mušice (*Drosophila melanogaster*), korišćenjem SMART testa.

Materijal i metode

Ispitivanje je vršeno na laboratorijskim linijama vrste *Drosophila melanogaster*, koje su uzete sa Instituta za biološka istraživanja Siniša Stanković, Laboratorije za populacionu genetiku i ekogenotoksikologiju. Ispitivane su linije sa specifičnim markerima, odnosno, mužjaci sa *mwh* (multiple wing hair) – linija 85744 sa genskom konstrukcijom *y[1]; mwh[1] jv[1]* i ženke sa *flr* (flare) – linija 2371 *flr³ / TM3 Ser[1]*, opisani u literaturi (Lindsley i Zimm 1992).

Infuz je spreman od svake biljke pojedinačno i pri tom je korišćeno redom: 3 g droge nevena (*Calendulae flos*), 2.8 g koprive (*Urticae folium*) i 1.5 g bokvice (*Plantago folium*). Zatim se odmerena količina droge stavila u 2 dL ključale vode. Nakon 10 minuta stajanja infuz je proceden.

Eksperimentalna procedura je, uz određene modifikacije, izvršena prema Grafu (Graf *et al.* 1984). čitav eksperiment je obavljen na optimalnim uslovima za *Drosophila melanogaster*: 25±1 °C, 60% vlažnost vazduha, dnevni ritam 12 h dan, 12 h noć. Razdvajanje nevinih mužjaka i ženki vršeno je na svakih osam sati. Flakoni sa odvojenim polovima su čuvani na temperaturi od 25±1°C tokom tri dana. Nakon toga su jedinke oba pola prebacivane u tegle sa hranljivim supstratom gde su ostavljene nekoliko dana radi ukrštanja. Potom su adulti prebacivani u sterilne tegle sa supstratom, na koji su oplodene ženke polagale jaja. Petri šolje sa sup-

stratom su menjane na svakih 8 sati. Larve stare 724h su izdvajane iz hranljive podloge, koja je prethodno hladena nekoliko minuta u frižideru, da bi larve izašle u površinski sloj supstrata. Potom su skupljane lancetom i ispirane destilovanom vodom.

Izvršena su tri tipa tretiranja: akutno tretiranje infuzom, hronično tretiranje infuzom i posttretman, tretiranje mutagenom, a zatim infuzom. U svakom tretiranju korišćeno je najmanje po 50 larvi starosti 724 h.

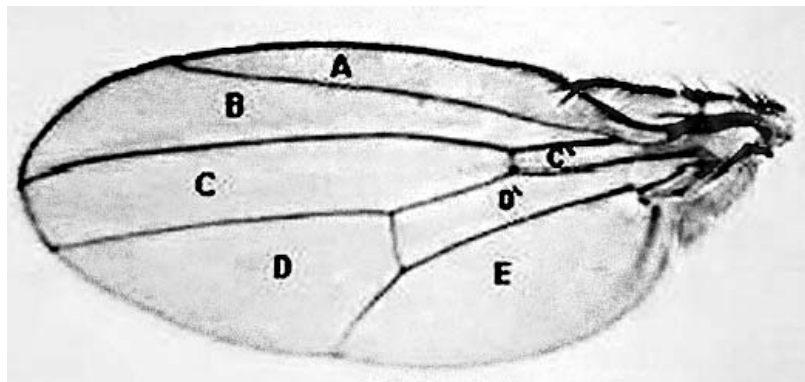
Kod akutnog tretmana larve su tretirane 4 h, u 1.5 mL infuza i 0.3 g celuloze u prahu, za svaki pojedinačni infuz. Nakon tretmana larve su ispirane destilovanom vodom i čuvane na hranljivom supstratu do pojave adulta.

U slučaju hroničnog tretmana, larve su premeštane na hranljivu podlogu spremljenu sa infuzom čaja, umesto sa destilovanom vodom.

Kod posttretmana larve su tretirane prvo sa 1.5 mL mutagenog rastvora – 3 mM MMS i 0.3 g celuloze u prahu, u trajanju od 4 h, potom isprane destilovanom vodom i prebačene na hranljivu podlogu spremljenu sa infuzom, kojom su se hranile do kraja larvenog perioda.

Nekoliko dana nakon dostizanja adultnog stadijuma jedinke su zamrznute i napravljeni su trajni mikroskopski preparatai (čupanjem i lepljenjem krila dvostrano lepljivom selotejp trakom na predmetne pločice). Preparati su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom, pri uvećanju od 400 puta.

Analizira se i dorzalna i ventralna površina oba krila. Svaka ćelija krila formira pojedinačni ćelijski izraštaj, tj. dlaku ili tzv. trihom. Klonovi se nalaze samo na distalnim delovima krila. Određuje se i veličina mrlje (fenotipski izmenjene ćelije uočene na površini krila), tj. broj zahvaćenih ćelija, kao i njihov tip, tj. da li je *mwh* ili *flr*, ili je dvostruka mrlja. (Mrlje se računaju kao dve posebne ako su odvojene sa 3 ili više normalnih ćelijskih nizova.)



Slika 1.
Sektori normalnog krila, od kojih se distalni delovi od A do E, analiziraju kao mesta gde se pojavljuju klonovi mutiranih ćelija

Figure 1.
Normal wing sections, with distal sections A-E where mutated cells occur

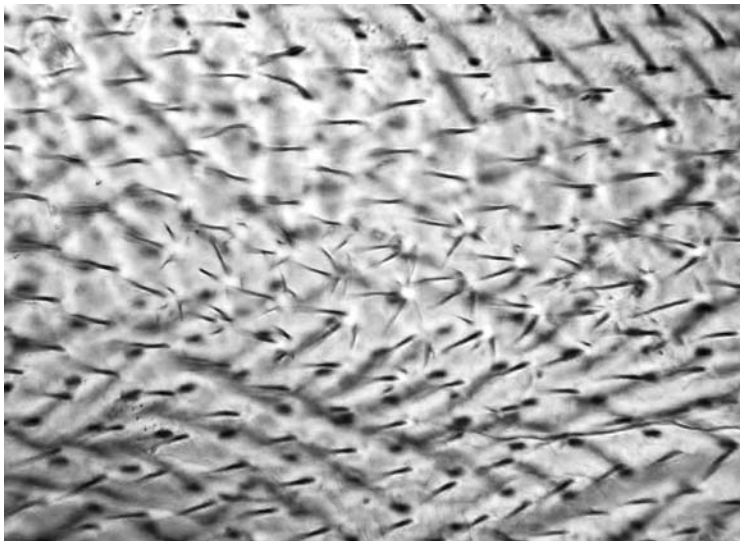
Prema Grafu i Würgleru sledeći tipovi mrlja se procenjuju odvojeno:

- 1) Male pojedinačne mrlje (*mwh* ili *flr* fenotip), sastoje se samo od jedne ili dve ćelije;
- 2) Velike pojedinačne mrlje koje sadrže više od 2 zahvaćene ćelije;
- 3) Dvostruke mrlje (i *mwh* i *flr* ćelije).

Mwh mrlje (slika 2): u ovu grupu se klasifikuju svi oni slučajevi u kojima ćelija krila sadrži tri ili više dlaka, nasuprot normalnom slučaju sa jednom dlakom po ćeliji, ako se ćelija sa dve dlake nalazi u velikoj *mwh* mrlji ili na njenoj ivici ona se uključuje u određivanje veličine klona.

Flr mrlje: pojedinačne *flr* ćelije nisu uočene. *Flr* pokazuje dosta različitu fenotipsku ekspresiju koja se kreće od oštarih, skraćenih i zadebljanih dlaka, do amorfni, ponekad balonu sličnih izduženja od melaninskog, hitinskog materijala.

Klasifikacija prema Grafu se obavlja prema sledećim veličinama klasa: 1, 2, 3-4, 5-8, 9-16, 17-32, 32-64 i preko 64 ćelije.



Slika 2.
Prikaz segmenta krila
sa mutiranim ćelijama
(*mwh*)

Figure 2.
The wing segment
with *mwh* mutations

Rezultati i diskusija

Dobijeni rezultati su statistički obrađeni kondicionalnim binomnim testom. Korišćene su istorijska pozitivna i negativna kontrola (Petrović 2004).

Rezultati su prikazani u tabeli 1. Usled različitog broja posmatranih krila po tretmanu, nije se upoređivao direktan broj mutacija, već se radilo poređenje njihove frekvence.

Tabela 1. Prikaz dobijenih rezultata testom somatskih mutacija i rekombinacija na *D. Melanogaster* (+: uočen mutageni efekat; -: uočen nemutageni efekat; i: nemogućnost potvrđivanja (ne)mutagenog efekta)

Table 1. Summary of results obtained in somatic mutation and recombination test on *D. Melanogaster* (+: positive mutagenic effect; -: negative mutagenic effect; i: inconclusive)

testirane komponente	vreme	broj krila	male pojedinačne mrlje		velike pojedinačne mrlje		dvostruke mrlje	ukupan broj mrlja			
			small single spots	large single spots	large single spots	double spots			total number of spots		
tested components	time	number of wings									
vodena kontrola	chr.	40	7	0.175	1	0.025	1	0.0225	9	0.225	
MMS	4 h	40	68	1.7	+	13	0.325	+	88	2.2	+
bokvica plantain	4 h	30	6	0.2	i	5	0.167	i	11	0.366	i
neven marigold	4 h	38	3	0.079	-	4	0.105	i	7	0.184	i
kopriva nettle	4 h	48	1	0.02	-	3	0.0625	i	4	0.083	-
bokvica plantain	posttretman posttreatment	32	7	0.219	i	6	0.0187	+	13	0.406	i
neven marigold	posttretman	40	8	0.2	i	5	0.125	i	13	0.325	i
kopriva nettle	posttretman	12	1	0.083	i	3	0.25	+	4	0.33	i
bokvica plantain	chr.	30	0	0	-	3	0.1	i	3	0.1	-
neven marigold	chr.	16	5	0.3125	i	0	0	i	5	0.3125	i

Pored izračunavanja frekvence rađena je i dijagnostika uslovnim binomnim testom. Pri tom se javljanje mutacija u infuzima poredilo sa javljanjem mutacija u vodenoj kontroli.

Posmatrajući ukupan broj mrlja uočava se da su akutni test koprive i hronični test bokvice pokazali njihova nemutagena dejstva.

Kod posttretmana gde su korišćeni infuzi od bokvice i koprive zapaža se značajan nivo mutacija (u poređenju sa vodenom kontrolom). S obzirom da se radi o velikim pojedinačnim mrljama, možemo pretpostaviti da do ovih mutacija dolazi u ranim fazama razvića.

Analizirajući pozitivnu kontrolu sa posttretmanom sva tri infuza nedvosmisleno možemo zaključiti da se javlja odsustvo mutagenih svojstava, tj. dolazi do smanjenja frekvencije mutacija.

Pri delovanju infuza (akutno i hronično), kao i pri posttretmanu, uočava se potpuno odsustvo rekombinantnih mutacija na somatskim ćelijama u odnosu na pozitivnu i negativnu kontrolu.

Zaključak

Poređenjem broja registrovanih mutacija ispitivanih infuza i mutacija u pozitivnoj i negativnoj kontroli uočava se antimutageno dejstvo infuza od nevena, bokvice i koprive. Najbolje rezultate u odnosu na negativnu kontrolu pokazuju akutni tretman koprive i hronični tretman bokvice. Kada je u pitanju pozitivna kontrola, svi posttretmani pokazuju antimutagena svojstva.

Konačno, predlaže se detaljnija analiza infuza ovih čajeva sa većim uzorkom, različitim koncentracijama i različitim mutagenima ne bi li se dobila potpuna slika o delovanju ovih biljaka i, eventualno, njihovoj primeni u farmakologiji.

Zahvalnost. Autori koriste priliku da se zahvale svim zaposlenima u Laboratoriji za populacionu genetiku i ekogenotoksikologiju, Instituta za biološka istraživanja Siniša Stanković na svesrdnoj pomoći i prijatnoj atmosferi prilikom izvođenja projekta.

Literatura

Andersen F. M., Markham K. R. 2006. *Flavonoids*. CRC Press

Graf U., Würigler F.E., A.J. Katz, H. Frei, H. Juon, C.B. Hall and P.G. Kale. 1984. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, **6**: 153.

Graf U. 1995. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Experientia*, **51**: 168.

- Hamss El R., Analla M., Campos-Sanchez J., Alonso-Moraga M., Munos-Serranos A., Idaomar M. 1999. A dose dependent anti-genotoxic effect of turmeric. *Mutation Research*, **446**: 135.
- Hamss El R., Idaomar M., Alonso-Moraga M., Munos-Serranos A. 2003. Antimutagenic properties of bell and black peppers. *Food and Chemical Toxicology*, **41**: 41.
- Idaomar M., Hamss El R., Bakkali F., Mezzoug N., Zhiri A., Baudoux D., Muñoz-Serrano A., Liemans V., Alonso-Moraga A. 2002. Genotoxicity and antigenotoxicity of some essential oils evaluated by wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, **513**: 61.
- Kovačević N. 2000. *Osnovi farmakognozije*. Beograd: MJM
- Lindsley D. L., Zimm G. G. 1992. *The genome of Drosophila melanogaster*. Academic Press
- Romero-Jimenez M., Campos-Sanchez J., Analla M., Munoz-Serrano A., Angeles Alonso-Moraga, 2005. Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Mutation Research*, **585**: 147.
- Patenković A., Stamenković-Radak M., Banjanac T., Andjelković M. Antimutagenic effect of sage tea in somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Neobjavljeni rezultati
- Petrović A. 2004. Test mozaičnosti krila kao metoda za genotoksikološka istraživanja. Neobjavljeni diplomski rad, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Beograd.
- Zimonić, B., Savković D., Anđelković M. 1990. *Genotoksični agensi – efekti, principi i metodologija detekcije*. Beograd: Naučna knjiga

Dragomir Milovanović, Arpad Kiralj, Marina Arnaut

Somatic Mutation and Recombination Test (SMART) of the Effect of Marigold, Nettle and Plantain

Marigold (*Calendula officinalis*), nettle (*Urtica dioica*) and plantain (*Plantago lanceolata*) are plants reported to have antioxydative activities and they are used in therapy, both traditional and medical (Kovačević 2000). They are characterised by the presence of flavonoids as one of the main active substances. The polyphenolic character of flavonoids affects the inhibition of several enzymes, deceleration of decomposition of elastane, and diuretical, antimicrobial and antioxidative effects are also confirmed (Andersen & Markham 2006).

The ability of chemical substances to affect the mutations and recombinations in somatic cells can be assayed using the Somatic Mutation And Recombination Test (SMART). The aim of the present study was to estimate the antimutagenic effect of *Calendula officinalis*, *Urtica dioica* and *Plantago lanceolata*, using the SMART test procedure in *D.melanogaster*, in chronic, acute and posttreatment. As a positive mutagen a 3 mM solu-

tion of methyl-methanosulphonate (MMS, CAS no. 66-27-3, Aldrich, USA) was used in this test.

The experimental procedure was done according to the protocol given by Graf (Graf *et al.* 1984) with some modifications. Virgin flies were separated into males and females and then crossed 3 days after on a nutrient medium, where females were laying eggs. The medium was changed every 8 hours, and 72h old larvae were collected from the substrate.

Three types of treatments were done:

1. acute treatment with *Calendula*, *Urtica* and *Plantago* infusions for 2 h
2. chronic treatment with *Calendula*, *Urtica* and *Plantago* infusions for 48 h
3. posttreatment – 2 h treatment with 3 mM MMS, followed with 48 h treatment with infusions

Several days' old adults were frozen and their wings were cut and mounted on slides. The wings were observed under a photonic microscope under 400x magnification. The results are statistically defined by the conditional binom test. Results are given in Table 1. The results have shown that the acute test (*Urtica*) and the chronic test (*Plantago*) have no mutagenic effects. When compared to the water control, posttreatments of *Plantago* and *Urtica* have shown the presence of mutations. Considering that the detected mutations are large single spots, the cause is probably the occurrence of these mutations in prior degrees of development.

Posttreatments of all three infusions, compared with the positive control, show the decrease of frequency of mutations. Within the effects of infusions, both in acute, chronic and posttreatment, when compared with the positive and negative control, an absence of recombinations in somatic cells is detected.

Results have shown that infusions of *Calendula officinalis*, *Urtica dioica* and *Plantago lanceolata* have antimutagenic effects, compared with both the positive and the negative control. The highest effectivity, compared with the negative control, was shown in the acute treatment with *Urtica*, and the chronic treatment with *Plantago*.

