

## Ispitivanje toksičnosti, citotoksičnosti i genotoksičnosti taurina i kofeina Allium testom

---

Energetska pića su uvedena u upotrebu još pre 25 godina, ali se mali broj istraživanja bavio njihovim efektima. Tokom ovog istraživanja ispitivana je toksičnost, citotoksičnost i genotoksičnost simuliranog energetskog pića pomoću taurina i kofeina Allium testom. Analizirano je na koji način taurin i kofein utiču na ispitivane ćelije u zavisnosti od koncentracija u kojima se nalaze. Korišćene su iste koncentracije kofeina sa različitim dozama taurina 12.5:1 (0.125% taurina i 0.01% kofeina), 25:1 (0.25% taurina i 0.01% kofeina), i 75:1 (0.75% taurina i 0.01% kofeina). Analizirani makroskopski parametri pokazali su da dejstvo taurina i kofeina u svim ispitivanim odnosima koncentracija ima toksičan efekat. Mikroskopski parametri su pokazali da dejstvo kofeina i taurina uglavnom izaziva aberacije na nivou deobnog vretena, dok su aberacije na nivou hromozoma detektovane u malom broju. Aberacije na nivou deobnog vretena potvrđuju citotoksično dejstvo taurina i kofeina, dok zbog male učestalosti aberacija na nivou hromozoma možemo smatrati da dejstvo taurina i kofeina u ispitivanim koncentracijama nema genotoksičan efekat.

---

### Uvod

Energetska pića su dizajnirana tako da pojačavaju budnost, koncentraciju, psihičku aktivnost, kao i da obezbede kratkoročno povećanje energije (Miller 2008; Schneider i Benjamin 2011). Većina energetskih pića sadrži prirodne sastojke kao što su taurin, guarana i ginseg, u koncentracijama koje su daleko ispod potrebnih za ostvarivanje neželjenog ili terapeuskog dejstva. Međutim, kofein i šećer su prisutni

u količinama za koje je poznato da izazivaju niz negativnih zdravstvenih efekata (Clouston *et al.* 2008).

Kofein je prirodni alkaloid koji se javlja u zrnu kafe, kakaa, kao i u guarani i čaju. Količina kofeina u energetskim pićima je oko 80 mg na 250 mL (MAFF UK 1998), a to je nivo za koji je prijavljeno da ima psiho-stimulativni efekat (Smit i Rogers 2000). Mutageno dejstvo kofeina je pokazano kod bakterije *Escherichia coli* (Demerec *et al.* 1951; Gezelius i Fries 1952) kao i kod gljive *Ophiostoma multiannulatum* (Fries i Kihlman 1958; Fries 1950; Zetterberg 1960). Utvrđeno je da kofein utiče na replikaciju DNK, povećava broj hromozomskih aberacija (Itoyama i Bicudo 1992) i krosingovera (Yefremova i Filippova 1974) kod vinske mušice, *Drosophila melanogaster*. Efekat kofeina na formiranje hromozomskih prekida je demonstriran u biljnim ćelijama (Kihlman i Levan 1949; Kihlman i Sturelid 1970; Kihlman *et al.* 1971), ćelijama kineskih hrčaka (Kihlman i Sturelid 1970), kao i u ljudskim ćelijama *in vitro* (Ostertag *et al.* 1965). Kihlman i Levan (1949) su koristili kofein u Allium testu i pokazali da pri višim koncentracijama (1% i 2%) izaziva hromozomske prekide u mitotičkim ćelijama vrhova korena, inhibicija formiranja ćelijskog zida javlja se pri koncentracijama od 0.02% do 0.04%, dok 0.4% suzbija mitozu. Istraživanje Timsona (1970) pokazalo je da je kofein citotoksičan u limfocitima svih donora pri koncentraciji od  $10^{-2}$  M (što je ekvivalent dozi od 97.1 g kofeina za osobu od 70 kg), dok pri koncentraciji od  $10^{-4}$  zavisi od pola donora. Postoje indicije o mutagenom dejstvu kofeina, međutim pri *in vivo* istraživanju kod sisara nije dokazana njegova mutagenost. Zbog razlike u metaboličkim i fiziološkim procesima, organizaciji hromozoma, ćelijskih ciklusa, lokusa mutacija, veličine gena i uslova rasta

---

Ljubica Mihaljević (1993), Beograd, Slanački put 80d, učenica 4. razreda Pete beogradske gimnazije

Đorđe Božić (1994), Beograd, Ilije Garašanina 17, učenik 3. razreda Pete beogradske gimnazije

MENTOR: dr Tanja Adnadević, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” Beograd

u do sad korišćenim sistemima, jako je teško precizno odrediti tačan uticaj kofeina na ljude (D'Ambrosio 1994).

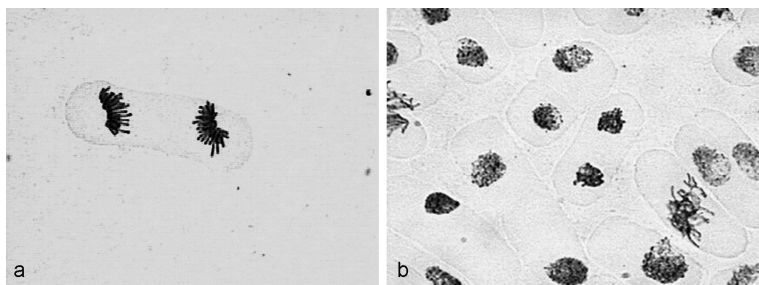
Taurin (2-aminoetanosulfonska kiselina) je amino-kiselina koja se sintetise u pankreasu iz cisteina. Ima sličan fiziološki efekat kofeinu na intracelularnu koncentraciju kalcijuma u glatkim mišićima iako im je jonotropski efekat različit (Schneider i Benjamin 2011). Takođe je poznat kao antioksidans, puferuje procese oksidacije i stabilizuje oksidativnu okolinu u mitohondrijama (Hansen *et al.* 2006). Pokazano je antimutageno dejstvo taurina koje je najverovatnije posledica njegove molekulske strukture i možda se može pripisati njegovim antioksidanskim sposobnostima (Laidlaw *et al.* 1989). Istraživanje Alam *et al.* (2011) ukazuje na zaštitno svojstvo taurina protiv anti-neoplastičnih lekova koje indukuju genotoksičnost u somatskim i germinativnim tkivima i mogućnost postojanja terapijskog potencijala u sprečavanju rizika od sekundarnih tumora u hemoterapiji. Taurin štiti srce od povreda tako što sprečava preopterećenje kalcijumom i ima sposobnost da maskira simptome intoksikacije kofeinom (Lin *et al.* 2010). Utvrđeno je da taurin ima sposobnost citološke zaštite (Ricci *et al.* 2009). Do sada nije prijavljeno nijedno istraživanje koje bi ukazalo na mutageno dejstvo taurina.

Mogućnost predoziranja kofeinom porasla je sa prisustvom taurina u ovim pićima. U slučaju dugoročne upotrebe energetskih pića, kroz taurinski transporter dolazi do akumulacije taurina u tkivu koji biva oslobođen tokom stresa. Visoke doze taurina mogu da interaguju sa GABA receptorima u sinapsama i mogu prouzrokovati njihovu desenzitizaciju ili narušavanje GABA homeostaze što dovodi do neuroloških poremećaja (Lin *et al.* 2010). Prema propisima administracije za hranu i lekove SAD (FDA) maksimalna dozvoljena količina kofeina je 71 mg / 360 mL (0.02%), ali i pored toga mnoga energetska pića imaju jasno predenu granicu po porciji. Iznos kofeina po porciji energetskog pića kreće se između 76 i 80 mg ili 0.03% (na primer, originalni Red Bull® ili Monster®), ekvivalentna jednoj šoljici kafe, do 280 mg ili 0.11% (na primer Cocaine®). Monster XXL® sadrži 240 mg / 695 mL. Red Bull® i Monster® imaju 1000 mg ili 0.4% taurina u 250 mL dok se ta količina utrostručuje u Monster XXL®. Iako proizvođači tvrde da su kofein i taurin korisni i bezbedni za upotrebu, interakcija između kofeina i taurina još uvek nije u potpunosti ispitana (Lin *et al.* 2010).

Allium test je relevantan kratkotrajni test koji koristi luk (*Allium cepa*) kao test organizam za ispitivanje genotoksičnosti. Prednosti korišćenja biljnih sistema uključuju činjenicu da je organizacija hromozoma biljaka slična onoj kod čoveka, i na taj način se mogu ispitati mutageni efekti u širokom rasponu. Sem toga, biljke se lako gaje i održavaju, pa je cena izvođenja testa relativno niska. Allium test je u upotrebu uveo Levan i njime pokazao da kolhicin onemogućava organizaciju deobnog vretena i samim tim prouzrokuje poliploidiju u meristemskim ćelijama korena *Allium cepa*. Kasnije je pokazao i da rastvori različitih neorganskih soli uzrokuju nastanak čitavog niza hromozomskih aberacija u meristemskim ćelijama korena *Allium cepa*. Nakon toga test je ušao u široku upotrebu i korišćen je u mnogim istraživanjima. Od tada su razvijeni mnogobrojni testovi koji se zasnivaju na biološkim sistemima, kao što su mikroorganizmi ili sisarske linije ćelija, ali biljni testovi su i dalje u upotrebi kao rutinski testovi za analiziranje genotoksičnosti u mnogim laboratorijama širom sveta. Test se zasniva na proceni toksičnog i genotoksičnog potencijala nekog hemijskog jedinjenja i to merenjem rasta glavnog korena (makroskopski parametar) i određivanjem mitotičke aktivnosti, mitotičke abnormalnosti i hromozomskih aberacija tokom anafaze i telofaze meristemskih ćelija korena (mikroskopski parametar). Dokazano je da postoji značajna korelacija između makroskopskih i mikroskopskih parametara i da su makroskopski parametri osetljiviji (Fiskesjö 1985).

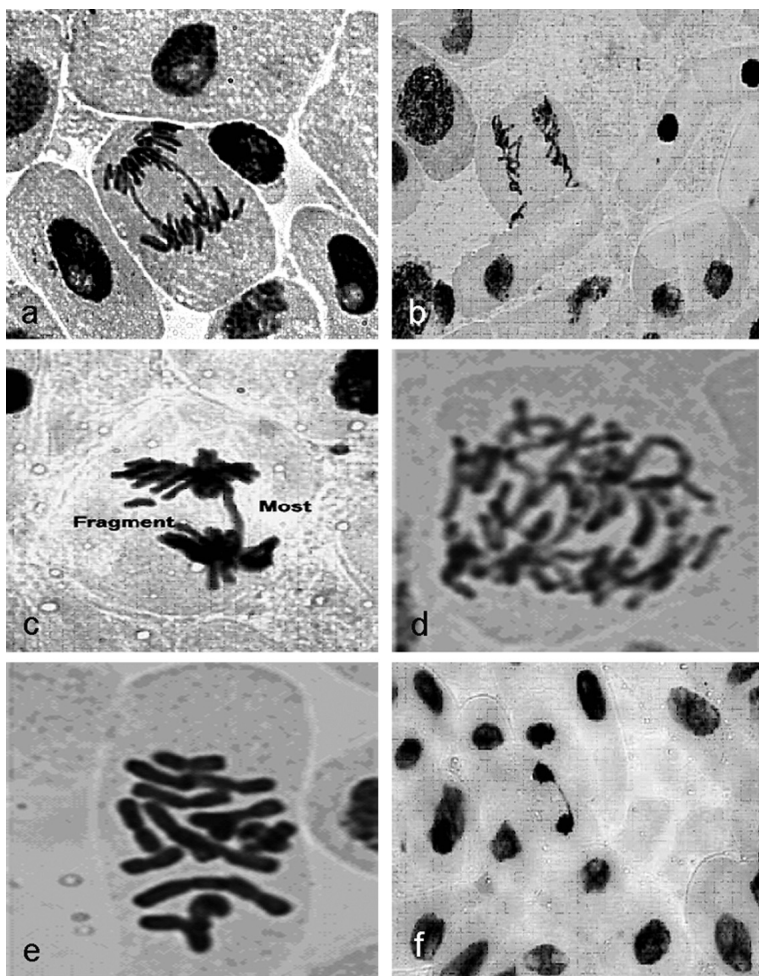
Meristemske ćelije korena luka zadržavaju sposobnost deobe tokom čitavog života i podložne su uticajima različitih agenasa, koji mogu dovesti do promena u njihovoj deobi (slika 1). Mutacije su slučajne promene u naslednom materijalu i mogu biti genske, koje obuhvataju promene u okviru jednog ili nekoliko nukleotida određenog gena, i hromozomske koje menjaju broj hromozoma, odnosno broj ili raspored gena u hromozomu. Mutacije koje dovode do promene broja hromozoma nastaju usled promena na nivou organizacije deobnog vretena. Numeričke mutacije kao što su aneuploidija i poliploidija su stekle određeni stepen ustaljenosti u prirodi, dok su endomitoza, c-mitoza i multipolarnost ređe.

C-mitoza nastaje zbog odsustva deobnog vretena pri čemu hromatide metafaznih hromozoma leže jedna pored druge i ne mogu se transportovati na polove. Multipolarnost, tj. poremećaj polariteta dovodi do longitudinalne rasepljenosti vretena pri



Slika 1.  
Normalna anafaza (a) i  
telofaza (b) (Adnađević 2005)

Figure 1.  
Normal anaphase (a) and  
telophase (b) (Adnađević  
2005)



Slika 2.  
Tipovi aberacija  
(Adnađević 2005)  
A – anafazni most  
Z – zaostali hromozom  
V – višestruka aberacija  
M – multipolarnost  
C – c-mitoza  
T – telofazni most

Figure 2.  
Types of aberrations  
(Adnađević 2005)  
A – anaphase bridge  
Z – lagging chromosome  
V – multiple aberration  
M – multipolarity  
C – c-mitosis  
T – telophase bridge

čemu se hromozomi za vreme anafaze transportuju na polove u grupama. Sa promenom brojnog stanja hromozoma dolazi i do promene morfologije ćelije. Agensi koji dovode do promena na nivou deobnog vretena mogu se smatrati citotoksičnim.

Strukturne hromozomske mutacije dovode do promena na nivou DNK (slika 2). Postoje četiri glavne grupe aberacije i to su: delecije, duplikacije, translokacije i inverzije. Acentrični fragmenti su rezultat terminalnih delecija. Most je najčešće rezultat reci-

pročnih translokacija, ali do njegovog formiranja mogu da dovedu i drugi mehanizmi. Kada dolazi do promena broja hromozoma odnosno aberacija na nivou deobnog vretena govorimo o citotoksičnom efektu izvesnog mutagena. Mutageni koji mogu u malim količinama i koncentracijama nepovratno izmeniti genetičku informaciju organizma, nazivaju se genotoksičnim.

Cilj ovog istraživanja je da se ispita toksičnost, citotoksičnost i genotoksičnost simuliranog energetskog pića pomoću taurina i kofeina. Analizirano je na koji način taurin i kofein, u zavisnosti od koncentracija u kojima se nalaze, utiču na navedene oblike toksičnosti.

## Materijal i metode

Lukovice *Allium cepa* su podeljene u pet grupa: negativnu kontrolu je predstavljala česmenska voda, pozitivnu MMS (metil metanosulfonat), preostale tri grupe su predstavljale različite koncentracije taurina i kofeina. Nakon 48 h izvršeno je brojanje i merenje dužine korenova lukova na osnovu kojih je utvđivana toksičnost (makroskopski parametar). Zatim su pravljene mikroskopski preparati pomoću kojih je određivana citotoksičnost i genotoksičnost uzoraka.

Lukovice *Allium cepa* su postavljene u flakone sa 15 mL vode na period od 24 h, nakon čega je ukupan uzorak od 54 lukovice podeljen u pet grupa. Kao negativna kontrola korišćena je česmenska voda (dalje u tekstu označena kao K-), a kao pozitivna kontrola MMS (metil metanosulfonat) koncentracije 10 mg/L (dalje u tekstu označena kao K+). Preostale tri grupe su činile različite koncentracije kofeina i taurina u odnosu 1:12.5 (80 mg : 1000 mg; dalje u tekstu označena kao T 12.5), 1:25 (80 mg : 2000 mg; dalje označena kao T 25) i 1:75 (80 mg : 6000 mg; dalje u tekstu označena kao T 75). Sve grupe su postavljene u duplikatu, izuzev pozitivne kontrole. Korišćeno je 6 lukova po koncentraciji. U čaše zapremine 1000 mL sipano je 100 mL medijuma, i aluminijumska folija sa 6 rupa je postavljena tako da omogućiti da u uzorku budu samo korenovi lukova. Nakon 48 h isključen je po jedan luk sa najslabijim rastom korena u svakom uzorku. Izvršeno je brojanje i merenje dužine korenova preostalih 5 lukova po uzorku. Zatim je odsečeno po pet vrhova korenova dužine 10 mm od svakog pojedinačnog luka i prebačeno u epruvetu sa rastvorom 45% sirćetne kiseline i 1 M HCL u odnosu 9:1. Epruvete su postavljene u

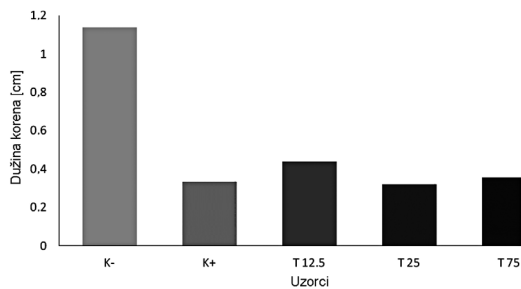
vođeno kupatilo na 50°C u trajanju od 5 min. Za pravljenje mikroskopskih preparata korišćeno je 1-2 mm svakog vrha korena, koji su macerirani uz dodatak 1-2 kapi orseina (Fiskesjö 1985).

Dužina korenova je korišćena kao makroskopski parametar toksičnosti. Svaki koren dužine ispod 5 mm nije korišćen u daljoj analizi. Primenom jedno-parametarske analize varijanse poređene su vrednosti dužine rasta korena u analiziranim grupama. Razlike između pojedinih grupa ispitane su Tuckeyevim naknadnim testom.

Kao mikroskopski parametar genotoksičnosti uzoraka praćene su promene u anafazi i telofazi ćelijske deobe (slika 2). Na svakom mikroskopskom preparatu je analizirano oko 100 anafaza i telofaza. Mikroskopski preparati su pregledani na Nikon SE mikroskopu sa uveličanjem od 1000 puta. Iz svake serije pregledano je oko 500 ćelija, kako u anafazi tako i u telofazi, i detektovane su i prebrojane promene u genetičkom materijalu. Detektovane promene u genetičkom materijalu u anafazi su: mostovi, multipolarne ćelije, zaostali hromozomi, fragmenti i c-mitotze, kao i kombinacije ovih promena, dok je u telofazi praćena samo promena koja obuhvata formiranje mosta između novoformiranih jedara. Dobijene vrednosti mikroskopskih parametara genotoksičnosti su međusobno poređene Fišerovim testom egzaktno verovatnoće (2x2). Rezultati su obrađeni programskim softverom Statistica V 5.0.

## Rezultati i diskusija

Kao makroskopski parametar toksičnosti korišćena je dužina korena luka. Statističkom obradom podataka utvrđeno je da se u odnosu na negativnu kontrolu značajno razlikuju svi testirani uzorci, kao i pozitivna kontrola (slika 3 i tabela 1). Na osnovu ovih rezultata možemo smatrati da navedene koncentracije taurina i kofeina imaju toksičan efekat na rast korena. Međusobno poređenje uzoraka sa različitim koncentracijom taurina nije pokazalo statistički značajne razlike, što može značiti da toksičnost ne zavisi od količine taurina u uzorku, već od kofeina koji je u svim uzorcima prisutan u jednakim količinama.



Slika 3. Srednje vrednosti dužina korenova luka analiziranih uzoraka:

K- – negativna kontrola, K+ – pozitivna kontrola, T 12.5 – odnos koncentracija kofeina i taurina 1:12.5, T 25 – odnos koncentracija kofeina i taurina 1:25, T 75 – odnos koncentracija kofeina i taurina 1:75.

Figure 3. Mean values of root length in analyzed samples:

K- – negative control, K+ – positive control, T 12.5 – taurine-caffeine ratio 1:12.5, T 25 – taurine-caffeine ratio 1:25, T 75 – taurine-caffeine ratio 1:75.

Tabela 1. Značajnost razlike u dužini korenova

	K-	K+	T 12.5	T 25
K+	0.0007	–		
T 12.5	0.0003	0.9337	–	
T 25	0.0001	0.9999	0.7248	–
T 75	0.0001	0.9998	0.9001	0.9964

Kihlman i Levan (1949) su pokazali da pri koncentracijama između 0.1% i 0.04% kofeina u uzorku dolazi do smanjenja broja deoba, što se ogleda u smanjenoj dužini korenčića. Lin i saradnici (2010) su pokazali da taurin u malim dozama dovodi do povećanja aktivnosti kofeina. Kako je u ovom istraživanju korišćeno 0.01% kofeina, koncentracija za koju nije dokazan efekat na ćelije, moguće je da taurin, čak i u minimalnim dozama pri interakciji sa kofeinom ima toksični efekat. Sem toga moguće je i da kofein i u vrlo malim koncentracijama, kao ova korišćena u analizi, deluje na deobu ćelija, bez uticaja taurina u bilo kojoj koncentraciji.

Najveći procenat aberacija detektovan je u uzorku T 75 gde je koncentracija taurina iznosila 6000 mg/L, a najmanji u uzorku T 12.5 sa taurinskom koncentracijom od 1000 mg/L (tabela 2).

Najmanji procenat aberacija je detektovan u negativnoj kontroli (2.1%), a najveći u pozitivnoj, 7.5%. Svaki uzorak koji sadrži nivo aberacija približan nivou kod pozitivne kontrole mogao bi se smatrati mutagenim. Nasuprot tome uzorak u kome se detektuje procenat aberacija koji je približan procentu aberacija u negativnoj kontroli se ne bi smatrao genotoksičnim. U ispitivanim uzorcima nivo aberacija je između vrednosti dobijenih u negativnoj i pozitivnoj kontroli, i povećava se sa porastom količine taurina u uzorku.

Tabela 2. Ukupna učestalost aberantnih ćelija u analiziranim uzorcima

Grupa	Ukupan broj analiziranih ćelija	Udeo aberantnih ćelija (%)
K-	700	2.1
K+	200	7.5
T 12.5	500	3.8
T 25	600	4.3
T 75	600	4.8

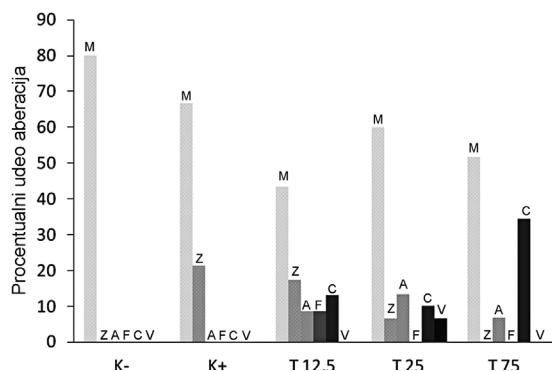
Tabela 3. Značajnost razlike učestalosti aberacija među analiziranim uzorcima (Fišerov test)

	K-	K+	T 12.5	T 25
K+	0.0006	–		
T 12.5	0.0508	0.0314	–	
T 25	0.0164	0.0533	0.3947	–
T 75	0.0058	0.1072	0.2394	0.3663

Kada uporedimo negativnu kontrolu sa grupama različitih koncentracija taurina i kofeina primećujemo da se grupe sa koncentracijama kofeina i taurina u odnosu 1:25 i 1:75 statistički značajno razlikuju, dok grupa 1:12.5 pokazuje marginalnu značajnost (tabela 3). Poređenjem pozitivne kontrole i uzoraka utvrđeno je da se uzorci sa koncentracijom taurina od 2000 mg (T 25) i 6000 mg (T 75) statistički značajno ne razlikuju. Važno je napomenuti da se grupa sa koncentracijom taurina od 1000 mg (T 12.5) statistički značajno razlikuje od pozitivne kontrole, što može ukazati na to da je manje genotoksična, za razliku od ostalih grupa. Kada uporedimo ispitivane uzorke sa različitim koncentracijom taurina međusobno, do-

Tabela 4. Rezultati ispitivanja genotoksičnosti uzoraka

Uzorak	Broj promena						Ukupan udeo genetičkih promena (%)
	Anafaza					Telofaza	
	Višestruke promene	Most	Zaostali hromozomi	Fragment	Multi-polarnost	Most	
K-	1	1	0	1	12	0	2.14
K+	0	0	3	1	10	1	7.5
T 12.5	1	2	4	2	10	3	3.84
T 25	2	4	2	1	18	3	4.28
T 75	0	2	1	1	15	10	4.84



Slika 4. Procentualni udeo svake genetičke promene pojedinačno

K- – negativna kontrola, K+ – pozitivna kontrola, T 12.5 – odnos koncentracija kofeina i taurina 1:12.5, T 25 – odnos koncentracija kofeina i taurina 1:25, T 75 – odnos koncentracija kofeina i taurina 1:75; M – multipolarnost, Z – zaostali hromozom, A – anafazni most, F – fragment, C – C-mitoza, V – višestruke aberacije

Figure 4. The percentage share of each individual genetic change

K- – negative control, K+ – positive control, T 12.5 – 1:12.5 ratio of the concentration of caffeine and taurine, T 25 – 1:25 ratio of the concentration of caffeine and taurine, T 75 – 1:75 ratio of the concentration of caffeine and taurine, M – multipolarity, Z – lagging chromosome, A – anaphase bridge, F – fragment, C – C-mitosis, V – multiple aberration

bijeni rezultati pokazuju da statistički značajna razlika pri merenju ukupne učestalosti aberacija ne postoji. Iz navedenog možemo zaključiti da uzorak sa najmanjom količinom taurina ima najniži nivo genotoksičnosti, dok se uzorci sa većim količinama taurina mogu smatrati genotoksičnim.

Najčešći tip aberacije su multipolarne mitoze čiji se broj povećava sa rastom koncentracije taurina u uzorku (tabela 4). Pomoću ovog podatka možemo zaključiti da sinergističko dejstvo taurina i kofeina ima najveći efekat na nivou deobnog vretena. Važno je napomenuti da je c-mitoza najučestalija u uzorku sa odnosom koncentracija 1:75, što znači da sa većom koncentracijom taurina dolazi i do inhibiranja deobnog vretena pored toga što dolazi do remećenja istog, što se može videti i u drugim uzorcima. Hromozom-

ske promene na nivou DNK imaju znatno manju učestalost. Od ovog tipa promena najčešći su zaostali hromozomi i promene koje dovode do formiranja anafaznog mosta, dok najređi tip promena predstavljaju telofazni mostovi.

Poređenjem učestalosti svake genetičke promene pojedinačno primećuje se da najveću zastupljenost imaju promene koje dovode do formiranja multipolarne ćelije (slika 4). Najmanja raspodela hromozomskih aberacija je detektovana u negativnoj kontroli, čak 80% pripada multipolarnim aberacijama što može ukazati na to da su ćelije korišćenih lukova sklonije aberacijama ovog tipa, dok prisustvo interakcije taurina i kofeina indukuje i druge vrste aberacija. Uzorak sa najnižom koncentracijom taurina ima najjednakačniju raspodelu hromozomskih abera-

cija, ali i dalje najveći udeo pripada multipolarnim ćelijama. Odnos koncentracija kofeina i taurina 1:12.5 indukuje sve vrste aberacija, pri odnosu koncentracija 1:25 ovaj efekat se zadržava, ali u manjoj meri jer najveći udeo nose multipolarne aberacije. Sa porastom količine taurina u uzorku spektar delovanja se ponovo sužava na deobno vreteno. Pri najvišoj koncentraciji taurina primećuje se naglo povećana učestalost c-mitoza što ukazuje na to da delovanje kofeina i taurina u ovom odnosu koncentracija pored toga što remeti deobno vreteno, ima sposobnost i da ga inhibira. Važno je napomenuti da su rezultati pokazali da efekat kofeina i taurina, po raznovrsnosti detektovanih aberacija, ima širi spektar formiranih aberacija od poznatog mutagena koji je korišćen kao pozitivna kontrola.

Tabela 5. Značajnost razlike broja aberacija na nivou deobnog vretena među analiziranim uzorcima

	K-	K+	T 12.5	T 25
K+	0.0053	–		
T 12.5	0.3473	0.0197	–	
T 25	0.0789	0.0756	0.223	–
T 75	0.0064	0.2710	0.0342	0.1624

Pri ispitivanju učestalosti aberacija na nivou deobnog vretena ne dolazi do statistički značajne razlike između negativne kontrole i uzoraka sa odnosa koncentracija 1:12.5 i 1:25. Primećuju se statistički značajne razlike u učestalosti aberacija između uzorka sa najnižom koncentracijom taurina i pozitivne kontrole, kao i pri poređenju pozitivne kontrole sa uzorkom najviše koncentracije taurina. Iz navedenog možemo smatrati da interakcija kofeina koncentracije 0.01% i taurina u nižim koncentracijama nema značajnije dejstvo na deobno vreteno, dok uzorak sa najvišom koncentracijom taurina dovodi do remećenja deobnog vretena. Pretpostavljamo da taurin u nižim koncentracijama ima protektivno dejstvo u odnosu na kofein koji je pokazan kao citotoksičan (Kihlman i Levan 1949), ali to ne možemo sa sigurnošću tvrditi jer sam kofein dovodi do inhibicije ćelijskog zida tek pri ispitanoj koncentraciji od 0.02% i mehanizmi delovanja sinergističkog dejstva taurina i kofeina još uvek nisu dovoljno poznati. Učestalosti aberacija na nivou hromozoma u nega-

tivnoj kontroli, pozitivnoj kontroli i uzorcima nisu upoređivane zbog veoma male prisutnosti.

Utvrđen je veoma visok procenat multipolarnih aberacija u skoro svim uzorcima. Negativna kontrola je predstavljala česmensku vodu, u kojoj su takođe gajeni i lukovi svih grupa tokom inkubacionog perioda. Kako bismo eliminisali moguće uticaje korišćene vode, upoređivali smo učestalosti aberacija bez multipolarnih ćelija. Značajna statistička razlika u učestalosti aberacija se javlja između negativne kontrole i svih uzoraka, kao i pozitivne kontrole (tabela 6). Iz navedenih podataka možemo smatrati da voda nije imala uticaj na citotoksičnost analiziranih uzoraka.

Tabela 6. Značajnost razlika u broju svih aberacija izuzev multipolarnih među grupama

	K-	K+	T 12.5	T 25
K+	0.0161	–		
T 12.5	0.0043	0.4820	–	
T 25	0.0171	0.3200	0.3473	–
T 75	0.0024	0.5359	0.5000	0.4217

## Zaključak

Analizirani makroskopski parametri su pokazali da sinergističko dejstvo taurina i kofeina u svim ispitivanim koncentracijama ima toksičan efekat. Efekat ispitivanih koncentracija kofeina i taurina, po raznovrsnosti detektovanih aberacija, ima širi spektar formiranih aberacija od poznatog mutagena (MMS) koji je korišćen kao pozitivna kontrola. Analizirani mikroskopski parametri pokazali su da dejstvo kofeina i taurina u ispitivanim koncentracijama uglavnom izaziva aberacije na nivou deobnog vretena, dok su aberacije na nivou hromozoma detektovane u malom broju. Zbog male učestalosti aberacija na nivou hromozoma možemo da kažemo da dejstvo taurina i kofeina u ispitivanim koncentracijama nema genotoksičan efekat, dok na citotoksični efekat ukazuju i makroskopski i mikroskopski parametri.

Postoji mali broj radova koji su se bavili interakcijom ove dve supstance, a nijedan nema za temu njihovo delovanje na ćeliju. Woojae (2003) je ispitujući efekte taurina u energetskom piću Red Bull

došao do zaključka da je uzročnik većine efekata koje daje ovaj napitak, najverovatnije sam kofein. Postoje dokazi da dolazi do formiranja kompleksa DNK-kofein kao jednog od efekata koji kofein ima na ćeliju, a koji uključuje i inhibiciju DNK reper mehanizma (Tempel i von Zallinger 1977). S druge strane, postoji niz mehanizama preko kojih taurin ispoljava citoprotektivna dejstva (Messina i Dawson 2000), na primer mehanizam inhibiranja oštećenja DNK. Pošto smo detektovali mali broj aberacija na nivou DNK, moguće je da je visoka koncentracija taurina dovela do toga da je umanjen nivo DNK oštećenja, ali je ipak došlo do promena na nivou deobnog vretena. Promene na nivou deobnog vretena mogu biti izazvane kofeinom, visokom koncentracijom taurina ili njihovim sinergističkim delovanjem. Neophodno je dalje ispitivanje da bi se ustanovilo koji mehanizam izaziva ovaj tip promena.

Aberacije na nivou deobnog vretena su povezane sa promenama u mitozu, koje mogu imati reverzibilan efekat, što potvrđuje citotoksičan efekat dejstva kofeina i taurina. Interakcija kofeina i taurina u nižim koncentracijama nema značajno dejstvo na deobno vreteno. Pretpostavljamo da taurin u nižim koncentracijama ima protektivno dejstvo u odnosu na kofein koji je pokazan kao citotoksičan, dok se sa povećanjem koncentracije taurina povećava i citotoksični efekat. Rezultati međusobnog poređenja broja aberacija bez multipolarnih ćelija ispitivanih uzoraka pokazuju da svi ispitivani rastvori imaju efekat sličan onome koji se detektuje u pozitivnoj kontroli. U ovom istraživanju je korišćena koncentracija kofeina od 0.01%, što je vrednost ispod one za koju je pokazano citotoksično dejstvo, tako da postoji mogućnost da je i ovako mala doza kofeina pri interakciji sa taurinom citotoksična.

## Literatura

Adnađević T. 2005. Ispitivanje genotoksičnih efekata uzoraka vode reka Srbije Allium anafazno-telofaznim testom. Diplomski rad. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Studentski trg 16, 11000 Beograd

Alam S. S., Hafiz A. N., Abeer H., El-Rahim A. 2011. Protective role of taurine against genotoxic damage in mice treated with methotrexate and tamoxifine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **31**: 143.

Andrew L. E. 1959. The mutagenic activity of caffeine in *Drosophila*. *The American Naturalist*, **93**: 135.

Artely B., Kihlman B. A. 1971. Caffeine, caffeine derivatives and chromosomal aberrations IV. Synergism between Mitomycin C and caffeine in Chinese hamster cells. *Hereditas*, **69**: 326.

Clauson A. K., Shields M. K., McQueen E. C., Persad N. 2008. Safety issues associated with commercially available energy drinks. *Pharmacy Today*, **14** (5): 52.

D'Ambrosio S. 1994. Evaluation of the genotoxicity data on caffeine. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **19**: 243.

Demerec M., Bertani G., Flint J. 1951. A survey of chemicals for mutagenic action in *E.coli*. *The American Naturalist*, **85**: 119.

Fiskesjö G. 1985. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, **102**: 99.

Fries N., Kihlman B. 1948. Fungal mutations obtained with methyl xanthines. *Nature*, **162**: 573.

Fries N. 1950. The production of mutations by caffeine. *Hereditas*, **36**: 134.

Gezelius K., Fries N. 1952. Phage resistant mutants induced in *Escherichia coli* by caffeine. *Hereditas*, **38**: 112.

Hansen S. H., Andersen L. M., Birkedal H., Cornett C., Wibrand F. 2006. The important role of taurine in oxidative metabolism. Taurine 6. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **583**: 129.

Itoyama M. M., Bicudo H. E. M. D. C. 1992. Effects of caffeine on fecundity, egg laying capacity and longevity in *D. prosaltans*. *Brasilian Journal of Genetics*, **15** (2): 303.

Kihlman B., Levan A. 1949. The cytological effect of caffeine. *Hereditas*, **35**: 109.

Kihlman B. A., Sturelid S. 1970. Differences between the chromosome-breaking effects of caffeine in onion root tips and in cell cultures of the Chinese hamster. *Newsletter Environmental Mutagen Society*, **3**: 18.

Kihlman B. A., Norlen K., Sturelid S., Odmark G. 1971. Caffeine and 8-ethoxycaffeine produce different types of chromosome-breaking effects depending on the treatment temperature. *Mutation Research*, **12**: 463.

Laidlaw A. S., Dietrich F. M., Lamtenzan P. M., Vargas I. H., Block B. J., Kopple D. J. 1989. Antimutagenic effects of taurine in a bacterial assay system. *Cancer Research*, **49**: 6600.



Lin F. J., Pierce M. M., Sehgal A., Wu T., Skipper D. C., Chabba R. 2010. Effect of taurine and caffeine on sleep-wake activity in *Drosophila melanogaster*. *Nature and Science of Sleep*, **2**: 221.

MAFF UK. 1988. Survey of caffeine and other methylxanthines in energy drinks and other caffeine-containing products (updated). Food Surveillance Information Sheet 144.

Messina S. A., Dawson R. Jr. 2000. Attenuation of oxidative damage to DNA by taurine and taurine analogs. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **483**: 355.

Miller E. K. 2008. Energy drinks, race, and problem behaviors among college students. *Journal of Adolescent Health*, **43**: 490.

Ostertag W., Duisberg E., Sturmman M. 1965. *The mutagenic activity of caffeine in man*. *Mutation Research*, **2**: 293.

Ricci L., Valoti M., Sgaragli G., Frosini M. 2009. Protection by taurine of rat brain cortical slices against oxygen glucose deprivation and reoxygenation-induced damage. *European Journal of Pharmacology*, **621**: 26.

Schneider M. B., Benjamin J. H. 2011. Clinical report – sports drinks and energy drinks for children and adolescents. *American Academy of Pediatrics*, **127**: 1098.

Smit J. H., Rogers J. P. 2000. Effects of low doses of caffeine on cognitive performance, mood and thirst in low and higher caffeine consumers. *Psychopharmacology*, **152** (2): 167.

Smit J. H., Rogers J. P. 2002. Effects of 'energy' drinks on mood and mental performance: critical methodology. *Food Quality and Preference*, **13**: 317.

Tempel K., von Zallinger C. 1997. Caffeine-DNA interactions: biochemical investigations comprising DNA-repair enzymes and nucleic acid synthesis. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, **52** (7-8): 466.

Timson J. 1970. The effect of caffeine on the mitosis of human lymphocytes in culture. *Br. J. Pharmacol.*, **38**: 731.

Yefremova G. I., Filippova L. M. 1974. Effect of caffeine on crossing-over in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **23**: 347.

Zetterberg, G. 1960. The mutagenic effect of 8-ethoxycaffeine, caffeine and dimethylsulphate in the *Ophiostoma* back-mutation test. *Hereditas*, **46**: 279.

Woojae K. 2003. Debunking the effects of taurine in Red Bull energy drink. *Nutrition Bytes*, **9** (1): 1.

---

Ljubica Mihaljević and Đorđe Božić

## Screening of Toxicity, Cytotoxicity, and Genotoxicity of Taurine and Caffeine by the Use of the *Allium* test

Energy drinks were introduced 25 years ago, but only a few studies of their toxicity have been done since. The toxicity, cytotoxicity and genotoxicity of an energy drink simulated by taurine and caffeine were investigated. Effects of different taurine and caffeine ratio on *Allium cepa* cells were analyzed. Constant caffeine concentration was used with various doses of taurine 12.5:1 (0.125% taurine and 0.01% caffeine), 25:1 (0.25% taurine and 0.01% caffeine), and 75:1 (0.75% taurine and 0.01% caffeine). Investigated macroscopic parameters have shown that the effect of caffeine and taurine, in all examined concentrations, was toxic. Microscopic parameters have shown that taurine and caffeine induce mitotic spindle aberrations, while chromosomal aberrations were detected at a low level. Spindle aberrations confirmed the cytotoxic effect of taurine and caffeine, but because of the low level of chromosomal aberrations we can consider this effect as non-genotoxic.

