

**DRUŠTVO ZA ZAŠTITU OD ZRAČENJA
SRBIJE I CRNE GORE**

ZBORNİK RADOVA

**XXIII SIMPOZIJUM DZZSCG
Donji Milanovac 2005,
26 – 28. septembar**

**Beograd
2005.**

ZBORNIK RADOVA

XXIII SIMPOZIJUM DZZSCG

26 – 28. septembar, 2005.

Izdavači:

Institut za nuklearne nauke „Vinča“

Društvo za zaštitu od zračenja Srbije i Crne Gore

Za izvršnog izdavača:

Dr Zlatko Rakočević

Urednik:

Mr Milojko Kovačević

ISBN 86-7306-075-3

© Institut za nuklearne nauke „Vinča“

Tehnička obrada: **Zoran Hadžić**

Štampa: Štamparija Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, Beograd

Tiraž: 120 primeraka

Štampa završena septembra 2005.

XXIII SIMPOZIJUM DRUŠTVA
ZA ZAŠTITU OD ZRAČENJA
SRBIJE I CRNE GORE
Donji Milanovac, 26 – 28. septembar 2005.

Organizatori:

DRUŠTVO ZA ZAŠTITU OD ZRAČENJA SRBIJE I CRNE GORE

INSTITUT ZA NUKLEARNE NAUKE „VINČA“

Laboratorija za zaštitu od zračenja i zaštitu životne sredine „Zaštita“

Organizacioni odbor:

Predsednik: Milojko Kovačević

Članovi:

Gordana Pantelić
Snežana Milačić
Dragana Todorović
Olivera Marinković
Tomislav Anđelić
Željka Ilić
Olivera Ciraj
Radoman Benderać
Sprko Marković
Dragoslav Nikezić

Redakcioni odbor:

Dr Gordana Joksić
Dr Ranko Kljajić
Dr Milan Orlić

Organizaciju su pomogli:

Ministarstvo za nauku i zaštitu životne sredine Republike Srbije

Ministarstvo zdravlja Republike Srbije

AMETEK-AMT (ranije: ORTEC)

Institut za nuklearne nauke "Vinča"

Ovaj Zbornik je zbirka radova saopštenih na XXIII Simpozijumu Društva za zaštitu od zračenja Srbije i Crne Gore koji je održan od 26 – 28. septembra 2005. godine u Donjem Milanovcu. Radovi su razvrstani po sekcijama. Mada su svi radovi u Zborniku recenzirani od strane Redakcionog odbora za sve iznesene tvrdnje i rezultate odgovorni su sami autori.

Organizacioni odbor se zahvaljuje svim autorima radova na uloženom trudu. Posebno se zahvaljujemo sponzorima koji su pomogli održavanje Simpozijuma i štampanje Zbornika.

Organizacioni odbor

EFEKAT FLAVONOIDA PROCIJANIDOLA NA UČESTALOST MIKRONUKLEUSA U HUMANIM LIMFOCITIMA OZRAČENIM IN VITRO

M. Stanković, A. Leskovic, S. Petrović
Institut za nuklearne nauke "Vinča", Laboratorija za fizičku hemiju

SADRŽAJ

U radu je praćena promena učestalosti mikronukleusa u neozraćenim i ozraćenim kulturama humanih limfocita tretiranih ($0,87\mu\text{M}$ i $4,37\mu\text{M}$) procijanidolom. Učestalost mikronukleusa u uzorcima koji su tretirani $0,87\mu\text{M}$ procijanidolom je ~40% manje u odnosu na učestalost mikronukleusa kontrolnih uzoraka, dok je u ozraćenim uzorcima tretiranim $0,87\mu\text{M}$ procijanidolom, učestalosti mikronukleusa ~15% manje u odnosu na učestalost mikronukleusa ozraćene kontrolne grupe. Ovako značajno smanjenje učestalosti mikronukleusa u uzorcima tretiranim $0,87\mu\text{M}$ procijanidolom potvrđuje njegov značajan protektivni efekat na kulture humanih limfocita.

UVOD

Ubrzani razvoj nauke i tehnologije doprineo je da se neprekidno povećava broj raznovrsnih genotoksičnih agenasa, prisutnih u životnoj sredini. Pojačano stvaranje slobodnih radikala mogu favorizovati spoljašnji činioci kao što su: jonizujuće zračenje, metaboliti različitih toksičnih jedinjenja i lekova kao i povećana koncentracija kiseonika. U uslovima nekontrolisanog stvaranja slobodnih radikala, njihova količina može prevazići kapacitet ćelije i tada nastaje oksidativni stres.

Baldi i saradnici [1], su izvršili kvalitativnu i kvantitativnu analizu polifenola iz grožđa i vina i zatim ispitivali antioksidativnu aktivnost frakcija i nekih pojedinačnih komponenti *in vitro* i *ex vivo* i pokazali da su frakcije koje sadrže proantocijanidole najefikasniji hvatači slobodnih radikala. Proantocijanidoli su proizvodi polimerizacije flavan-3-ola do oligomera. To su jedinjenja koja pripadaju grupi flavanola koji su derivati fenil-2-hromana. Osnovni skelet, kao i kod flavonoida, čine dva benzenova prstena (A i B) i jedan oksidovani heterociklični prsten. Za njih je karakteristično da pored OH grupe na C_3 atomu, istu funkcionalnu grupu uvek imaju i na C_7 i C_4 atomima. Gotovo sve aktivnosti proantocijanidola zasnivaju se na njihovoj antioksidativnoj aktivnosti dobrih hvatača slobodnih radikala [2,3]. Zahtevi za maksimalnom tačnošću i sigurnošću u ispitivanju oštećenja nastalih delovanjem jonizujućeg zračenja i genotoksičnih agenasa, na humanu populaciju su sve veći, jer čak i male nepravilnosti pri tako osetljivim istraživanjima mogu imati značajne posledice. U vezi sa tim analiza mikronukleusa citohalazin-B metodom za sada predstavlja najbolje rešenje. Sigurnost citohalazin-B mikronukleusnog testa zasniva se na činjenici da se iz jednog uzorka može analizirati više desetina hiljada binuklearnih limfoblasta, što daje objektivnu sliku učestalosti i distribucije hromozomskih aberacija. Osnovna prednost citohalazin-B mikronukleusnog testa je pouzdana identifikacija ćelija

koje su prošle samo jednu deobu. Danas, citohalazin-B mikronukleusni test nalazi široku primenu u ispitivanju mutagenog efekta različitih agenasa. Od strane velikog broja autora ova metoda je predložena kao alternativa za dugotrajne metafazne analize hromozoma [5], naročito kada se radi o populacionim monitoring studijama u kojima je potrebna brza i precizna informacija da li je data supstanca genotoksična ili ne.

MATERIJAL I METODE

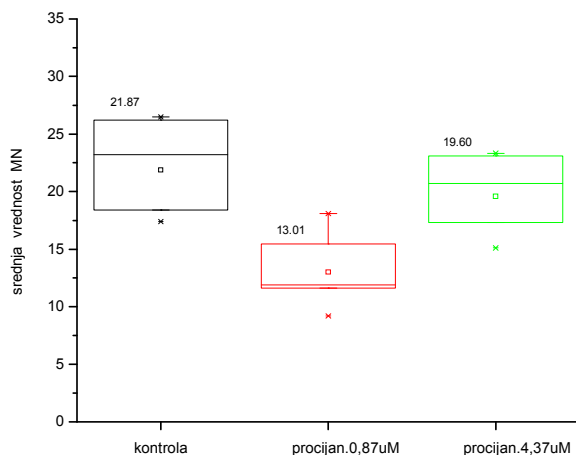
Za analizu mikronukleusa korišćeni su kriterijumi Countryman and Heddle [4]. Preparacija je obavljena po metodi Fenech and Morely [5]. Pregledano je 1000 binuklearnih ćelija po uzorku.

REZULTATI I DISKUSIJA

U ovom radu smo pratili promenu učestalosti mikronukleusa u neozračenim i ozračenim kulturama humanih limfocita tretiranih ($0,87\mu\text{M}$ i $4,37\mu\text{M}$) procijanidolom.

Na grafiku:1, je prikazana učestalost mikronukleusa u neozračenim uzorcima koji su tretirani različitim koncentracijama procijanidola ($0,87\mu\text{M}$, $4,37\mu\text{M}$).

Srednja vrednost učestalosti mikronukleusa u kontrolnim uzorcima iznosi: $21,87\pm 3,99$. U uzorcima koji su tretirani $0,87\mu\text{M}$ procijanidolom, srednja vrednost učestalosti mikronukleusa je $13,01\pm 3,20$ (~40% manje u odnosu na učestalost mikronukleusa kontrolnih uzoraka). Srednja vrednost učestalosti mikronukleusa u uzorcima tretiranim $4,37\mu\text{M}$ procijanidolom, iznosi: $19,60\pm 3,32$ (~10% manja učestalost mikronukleusa nego u kontrolnim uzorcima), (grafik:1).

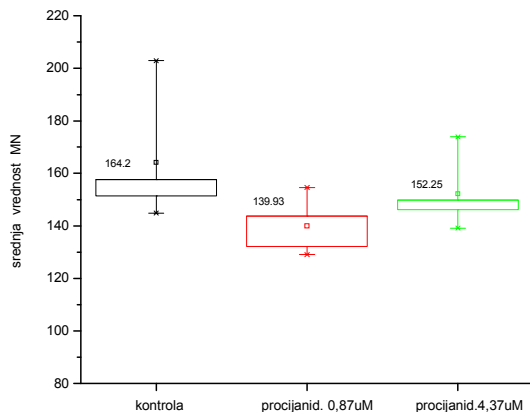


Grafik:1. Srednja vrednosti MN u neozračenim kontrolnim uzorcima uzorcima tretiranim procijanidolom

Dobijeni rezultati pokazuju da postoji statistički značajna razlika u učestalosti mikronukleusa između kontrolnih uzoraka i uzoraka tretiranih procijanidolom u koncentracijama: $0,87\mu\text{M}$; $4,37\mu\text{M}$, ($t = 7,51$; $p = 0,0006$., $t = 2,83$; $p = 0,036$). Statistička značajnost postoji i između uzoraka tretiranih koncentracijama procijanidola od $0,87\mu\text{M}$ i

4,37 μ M, ($t= 10,60$; $p= 0,00013$). Rezultati ispitivanja efekata procijanidola (konc. 0,87 μ M, 4,37 μ M) na ozračenim ćelijskim kulturama, prikazani su na grafiku:2).

Srednja vrednost učestalosti mikronukleusa u ozračenim kontrolnim uzorcima iznosi 164,20 \pm 26,32. U ozračenim uzorcima tretiranim 0,87 μ M procijanidolom, srednja vrednost učestalosti mikronukleusa je 139,93 \pm 11,67 (~15% manje u odnosu na učestalost mikronukleusa u kontrolnim uzorcima), a u ozračenim uzorcima tretiranim 4,37 μ M procijanidolom, srednja vrednost učestalosti mikronukleusa je 152,25 \pm 15,09 (što predstavlja smanjenje učestalosti mikronukleusa za 7% u odnosu na kontrolne uzorke), grafik 2.



Grafik:2. Srednja vrednosti MN u ozračenim kontrolnim uzorcima i u ozračenim uzorcima tretiranim procijanidolom

Rezultati dobijeni T-testom, pokazuju da nema statistički značajne razlike između ozračenih kontrolnih uzoraka i ozračenih uzoraka tretiranih 0,87 μ M i 4,37 μ M procijanidolom ($t=3,01$; $p= 0,057$., $t= 2,09$; $p= 0,127$).

Postoji korelacija između ozračenih kontrolnih uzoraka i ozračenih uzoraka tretiranih 4,37 μ M procijanidolom ($r=0,99$; $t=13,05$; $p=0,006$).

Ovako značajno smanjenje učestalosti mikronukleusa u uzorcima tretiranim 0,87 μ M procijanidolom potvrđuje njegov značajan protektivni efekat na kulture humanih limfocita. Ovaj rezultat je u toliko značajniji kad se zna da veštački protektori, (npr. Amifostin WR-2721) mogu da smanje učestalost mikronukleusa najviše za 20% u odnosu na kontrolne uzorke. Smatra se da dobra protektivna svojstva procijanidola potiču od njegove strukture. Uzimajući u obzir sve strukturne karakteristike procijanidola, u našem radu je pokazano da B2 dimeri (procijanidol 3-O-galat), predstavljaju najefikasnija jedinjenja u uklanjanju slobodnih radikala i za oko 40% smanjuju učestalost mikronukleusa u odnosu na kontrolne vrednosti. Procijanidoli efektivno štite ćeliju od jonizujućeg zračenja i pokazuju snažan antioksidativni efekat.

ZAKLJUČAK

Rezultati dobijeni u ovom radu su pokazali, da se genotoksični i citotoksični efekti u kulturama humanih limfocita, izazvani produkcijom slobodnih radikala, mogu meriti preko učestalosti mikronukleusa (markera DNK oštećenja). Najveći sadržaj proantocijanidola u grožđu imaju semenke [6,7], a od svih do sada ispitanih sorti, sivi

burgundac je u njima najbogatiji [8]. Procijanidoli sprečavaju oksidativnu degradaciju vitamina C, imaju antimutagena svojstva, a pokazali su se i kao efikasni inhibitori indukcije kancerogeneze. Brojna istraživanja su pokazala da vino sadrži veliku količinu derivata katehina-proantocijanodole, koje nemaju drugi proizvodi. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da bi procijanidoli mogli biti odgovorni za pozitivna fiziološka svojstva crvenih vina.

LITERATURA

- [1] Baldi,A.,Mulinacci,N.,Vincieri,F.,Ghiselli,A.: The antioxidant potencies of some polyphenols in grapes and wines. In Watkins TR, ed .Wine Nutritional and therapeutic benefits Washington DC: ASC, 166-179, (1997).
- [2] Bagchi,D.,Garg,A.,Krohn,R.L.,Bagchi,M.,Bagchi,D.J.,Balmoori,J.,Stohs,S.J.: Protective effects of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritonealmacrophage activation in mice. Gen.Pharmacol. 30: 771-776, (1998).
- [3] Joshi,S.S.,Kuszynski,C.A.,Benner,E.J.,Bagchi,M.,Bagchi,D.: Amelioration of the cytotoxic effects of chemotherapeutic agents by grape seed proanthocyanidin extract. Antioxid. Redox. Signal. 1: 563-570 (1999).
- [4] Countryman,P.I., and Heddle,J.A.: The production of micronuclei from chromosome aberration in irradiated cultures of human lymphocytes. Mut.Res., 41, 321-332, (1976).
- [5] Fenech,M., and Morley,A.A.: The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human population. Mutation Research., 285, 35-44, (1993).
- [6] Sun,SB.,Rinto,T.,Leandro,CM.,Ricardo da Silva,MJ.,Spranger,IM.:Transfer of catechins and proanthocyanidins from solid parts of the grape cluster into wine. Am.J.Enol.Vitic, 50:179-184 (1999).
- [7] Revilla,E.,Alonso,E.,Kovač,V.: The content of catechins and proanthocyanidins in grapes and wines as affected by agroecological factors and technological practices. In: Watkins TR,ed. Winw: Nutritional and therapeutic benefits. Washington DC: ASC, 69-80, (1997).
- [8] Kovač,V.,Pekić,B.: Procijanidoli grožđa i vina. Savr. poljoprivreda, 39:5-17, (1991).

ABSTRACT

THE EFFECT OF FLAVONOID PROCYANIDOL ON INDUCTION OF MICRONUCLEI IN HUMAN LYMPHOCYTES EXPOSED TO IONIZING RADIATION *IN VITRO*

M. Stanković, A. Leskovic, S. Petrović
Institute of Nuclear Sciences "Vinca" Physical Chemistry Laboratory

Phenolic components (procyanidols), common to red wine may be important in prevention of oxidative DNA damage. We have tested the hypothesis that the phenolic components of red wine are protective against the DNA-damaging by γ -radiation in vitro. The procyanidol (concentration, 87 μ M), added to unirradiated and irradiated samples, significantly reduced the yield of micronuclei, ~40% and ~15%, respectively. The study confirms strong radioprotective properties of procyanidols.