

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

# ZBORNİK RADOVA

**XXIV SIMPOZIJUM DZZSCG  
Zlatibor 2007,  
3 – 5. oktobar**

**Beograd  
2007**

ZBORNİK RADOVA  
XXIV SIMPOZIJUM DZZSCG  
3-5 oktobar 2007

Izdavači:

Institut za nuklearne nauke „Vinča“

Društvo za zaštitu od zračenja Srbije i Crne Gore

Za izvršnog izdavača:

Dr Jovan Nedeljković

Urednik:

Mr Miloško Kovačević

ISBN 978-86-7306-089-7

© Institut za nuklearne nauke „Vinča“

Tehnička obrada: Sesartić Gorijan

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

Tiraž: 120 primeraka

Štampa završena septembra 2007.

XXIV SIMPOZIJUM DRUŠTVA  
ZA ZAŠTITU OD ZRAČENJA  
SRBIJE I CRNE GORE  
Zlatibor, 3 – 5 oktobar 2007

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:

Ranko Kljajić  
Perko Vukotić  
Milan Pavlović  
Ištvan Bikit  
Olivera Marinković  
Tomislav Anđelić  
Gordana Pantelić  
Dragoslav Nikezić  
Snežana Milačić  
Snežana Dragović

Redakcioni odbor:

Dr Gordana Joksić  
Dr Olivera Ciraj  
Dr Marko Ninković

Organizaciju su pomogli:

Ministarstvo za nauku Republike Srbije  
Ministarstvo za zaštitu životne sredine  
VIP mobile  
AMETEK-AMT, ORTEC  
Institut za nuklearne nauke "Vinča"

*Ovaj Zbornik je zbirka radova saopštenih na XXIV Simpozijumu Društva za zaštitu od zračenja Srbije i Crne Gore koji je održan od 3 - 5. oktobra 2007. godine na Zlatiboru. 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*

**ANTIOKSIDATIVNA AKTIVNOST FLAVONOIDA  
(PROCIJANIDOLA, KVERCETINA, KEMFEROLA I LUTEOLINA)  
U HUMANIM LIMFOCITIMA OZRAČENIM *IN VITRO***

**Miroslava STANKOVIĆ, Andreja LESKOVAC, Sandra PETROVIĆ**  
*Institut za nuklearne nauke "Vinča", Laboratorija za fizičku hemiju*

**SADRŽAJ**

*U ovom radu je proučena promena učestalosti mikronukleusa(MN) i aktivnost antioksidativnih enzima katalaze(CAT) i glutathion S transferaze (GST), kao i produkcija malondialdehida(MDA) u neozračenim i ozračenim ćelijskim kulturama humanih limfocita tretiranih 0,87µM flavonoidima (procijanidolom, kvercetinom, luteolinom i kemferolom). Rezultati su pokazali da najbolji antioksidativni efekat na ćelijske kulture humanih limfocita pokazuje procijanidol, antioksidativni efekat luteolina i kemferola je slabiji, dok kvercetin pokazuje i prooksidativnu aktivnost.*

**1. Uvod**

Mnoge biljke sadrže slobodne ili glikozidno vezane flavonoide kao žute ćelijske pigmente (flavus-žut), lokalizovane u raznim organelama, naročito u cvetovima i lišću.

Flavonoidi su fenolna jedinjenja koja sadrže 15 atoma ugljenika (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), od kojih 9 pripada benzopirenskom prstenu (benzenski prsten-A, kondenzovan sa piranskim prstenom). Ostalih 6 C-atoma čine benzenski prsten (B), povezan sa benzopiranskim prstenom na poziciji dva ili tri. Različite vrste flavonoida međusobno se razlikuju prema tipu hibridizacije C atoma (sp<sup>3</sup> ili sp<sup>2</sup>), na poziciji 2, 3 i 4 benzopirenskog prstena i prema supstituentima na tim ugljenikovim atomima [1]. Gotovo sve aktivnosti flavonoida se zasnivaju na njihovoj antioksidativnoj aktivnosti dobrih hvatača slobodnih radikala [2,3].

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.

Glavni sistem zaštite od reaktivnih vrsta kiseonika (ROS), čini grupa antioksidativnih enzima u koje spadaju i glutathion-S transferaza (GST) i katalaza (KAT), koji predstavljaju prvu liniju odbrane u eliminaciji primarnih proizvoda redukcije molekuskog kiseonika. Antioksidativni zaštitni sistem (AOS-antioxidant defence system), nastao je tokom evolucije kod svih aerobnih organizama, kako bi se sprečila, ograničila ili "popravila" oštećenja nastala delovanjem reaktivnih vrsta kiseonika (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ·OH i <sup>1</sup>O<sub>2</sub>).

Zahtevi za maksimalnom tačnošću i sigurnošću u ispitivanju oštećenja nastalih delovanjem genotoksičnih agenasa na humanu populaciju su sve veći, jer čak i male nepravilnosti pri tako osetljivim istraživanjima mogu imati značajne posledice. Jedan od načina bolje rezolucije u citogenetskim ispitivanjima je povećanje broja analiziranih ćelija po ispitaniku. U vezi sa tim analiza mikronukleusa citohalazin-B metodom za sada predstavlja najbolje rešenje.

**2. Materijal i metode**

Za određivanje efekta pojedinačnih flavonoida na učestalost mikronukleusa i enzimsku aktivnost u kulturama humanih limfocita, mi smo u eksperimentu koristili flavonoide:

Procijanidol (-)-epigalokatehin-3-O-galat (EGCG); Kvercetin (3,5,7,3',4'-penta oksi flavonol); Luteolin (5,7,3',4'-tetrahidroksiflavon); Kemferol (3,5,7,4'-tetraoksiflavonol).

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.

Količina stvorenog MDA se meri spektrofotometrijski po metodi Aruoma [6] i predstavlja indeks lipidne peroksidacije.

Aktivnost GST je određivana po metodi Habiga i sar. [7], dok je katalazna aktivnost određivana po metodi Fleschera [8].

### 3. Rezultati i diskusija

U radu smo pratili promenu učestalosti MN i aktivnost antioksidativnih enzima CAT i GST u neozračenim i ozračenim kulturama humanih limfocita tretiranih 0,87 $\mu$ M flavonoidima (procijanidolom, kvercetinom, luteolinom i kemferolom).

Procijanidol dovodi do smanjenja prosečne učestalosti mikronukleusa za oko 40% u odnosu na učestalost mikronukleusa kontrolne grupe. Luteolin, za oko 22%, smanjuje prosečnu učestalost mikronukleusa u odnosu na učestalost mikronukleusa kontrolne grupe, dok kemferol smanjuje učestalost mikronukleusa za oko 10% u odnosu na učestalost mikronukleusa kontrolne grupe (Tabela 1).

U neozračenim ćelijskim kulturama tretiranim procijanidolom, dolazi do smanjenja produkcije malondialdehida približno 30% u odnosu na produkciju malondialdehida kontrolnih uzoraka. U neozračenim uzorcima tretiranim luteolinom, produkcija malondialdehida je približno 20% niža a u uzorcima tretiranim kvercetinom približno 10% viša u odnosu na produkciju malondialdehida kontrolnih uzoraka, dok je produkcija malondialdehida u neozračenim uzorcima tretiranim kemferolom slična produkciju malondialdehida kontrolnih uzoraka.

Aktivnost antioksidativnih enzima u uzorcima tretiranim procijanidolom i luteolinom je približno 4-5% niža u odnosu na vrednost izmerenu u kontrolnim uzorcima, dok je u grupi tretiranoj kvercetinom, aktivnost antioksidativnih enzima približno 6% veća u odnosu na enzimsku aktivnost izmerenu u kontrolnoj grupi (Tabela 1).

**Tabela 1. Učestalosti MN, produkcija MDA i aktivnost enzima CAT i GST prikazani kao % od kontrole u kontrolnim uzorcima i uzorcima tretiranim flavonoidima**

Konc. 0,87 $\mu$ M	MN	MDA	CAT	GST
Kontrola	100	100	100	100
Procijanidol	59,92	69,13	96,81	96,34
Kvercetin	102,1	110,72	106,04	105,6
Luteolin	77,95	81,78	94,52	97,34
Kemferol	92,15	99,86	99,46	98,15

Ako pogledamo tabelu 2, vidimo da procijanidol smanjuje prosečnu učestalost mikronukleusa u ozračenim kulturama za oko 15% u odnosu na učestalost mikronukleusa ozračenih kontrolnih uzoraka. Luteolin, smanjuje prosečnu učestalost mikronukleusa u ozračenim kulturama za oko 3%, dok kemferol smanjuje prosečnu učestalost mikronukleusa u ozračenim kulturama humanih limfocita za oko 10% u odnosu na učestalost mikronukleusa ozračenih kontrolnih uzoraka. Prooksidativna aktivnost kvercetin je jako mala, oko 1%, u odnosu na učestalost mikronukleusa ozračenih kontrolnih uzoraka (Tabela 2).

U ozračenim ćelijskim kulturama tretiranim flavonoidima, produkcija malondialdehida i aktivnost antioksidativnih enzima je približno ista kao i vrednosti izmerene u kontrolnim uzorcima (Tabela 2).

**Tabela 2. Učestalosti MN, produkcija MDA i aktivnost enzima CAT i GST prikazani kao % od kontrole u ozračenim kontrolnim uzorcima i u ozračenim uzorcima tretiranim flavonoidima**

Konc. 0,87 $\mu$ M	MN	MDA	CAT	GST
Kontrola	100	100	100	100
Procijanidol	85,22	97,52	98,19	98,8
Kvercetin	100,59	99,33	99,52	99,54
Luteolin	97,31	99,2	99	98,6
Kemferol	91.10	99.45	99.04	99.54

Rezultati su pokazali, da flavonoidi u koncentraciji od 0,87 $\mu$ M uneti u ćelijsku kulturu *in vitro*, inhibiraju lipidnu peroksidaciju i pokazuju antioksidativni efekat. Najbolji antioksidativni efekat ima procijanidol, dok kvercetin pokazuje prooksidativnu aktivnost jer produkcijom OH jona pokreće procese lipidne peroksidacije, i povećava aktivnost antioksidativnih enzima katalaze i glutation-S-transferaze.

Dobijeni rezultati su pokazali da i u ozračenim ćelijskim kulturama jedino procijanidol pokazuje smanjenu produkciju MDA dok ostali flavonoidi pokazuju aktivnost koja je veoma slična vrednostima kontrolne grupe.

Aktivnost enzima antioksidativnog stresa CAT i GST je veoma niska i skoro da se ne razlikuje od vrednosti dobijenih u kontrolnim uzorcima.

Ovako niska, aktivnost antioksidativnih enzima, je posledica jonizujućeg zračenja doze 2Gy, koje dovodi do kidanja peptidnih veza i do modifikacije u strukturi enzima, usled čega dolazi do gubitka enzimske aktivnosti. Smatra se da u uslovima intenzivne produkcije slobodnih radikala usled jonizujućeg zračenja, i intenzivne lipidne peroksidacije u membranama, oksidacija lipida može uzrokovati promene u konformaciji enzima (katalaze i GST-a).

#### 4. Zaključak

Rezultati koji su dobijeni u ovom radu pokazuju da se genotoksični i citotoksični efekti u kulturama humanih limfocita, izazvani produkcijom slobodnih radikala, mogu meriti preko učestalosti MN (markera DNK oštećenja), produkcije MDA i aktivnosti CAT i GST.

Dobijeni rezultati su pokazali da najbolji antioksidativni efekat ima procijanidol dok kvercetin pokazuje prooksidativnu aktivnost.



Na kraju treba reći, da je opravdano nastaviti istraživanja o biološkim efektima flavonoida kako bi se odredila njihova prava farmakološka svojstva, kao i mogućnost sinergizma između flavonoida i hemioterapijskih agenasa. Imajući u vidu širok spektar antioksidativnog delovanja flavonoida, može se očekivati i njihova raznovrsna primena u medicini, farmaciji i kozmetici.

### 5. Literatura

- [1] Rice-Evans, A.C., Miller, J.N. and Paganga, G.: Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol.20, No.7, pp. 933-956, (1996).
- [2] 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)*.
- [3] Greenrod, W. and Fenech, M.: The principal phenolic and alcoholic components of wine protect human lymphocytes against hydrogen peroxide and ionizing radiation induced DNA damage *in vitro*. *Mutagenesis*, Vol.18 No2, pp.119-126, (2003).
- [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] Aruoma, O.I., Halliwell, B., Laughton, M.J., Quinlan, G.J., Gutteridge, J.M.: The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron (II)-iron(III) complex. *Biochemical Journal* 258: 617-620, (1989).
- [7] Habig, H.W., Michael, J.P. and Jakoby, B.W. : Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.249, No.22, Issue of November 25, pp. 7130-7139, (1974).
- [8] Flescher, N., Tripo, Li., Salnikow & Burns: Oxidative stress suppresses transcription factor activities in stimulated lymphocytes. *Clinical & Experimental Immunology*, Vol 112, 242-250, (1998).

ABSTRACT

**THE ANTIOXIDANTS ACTIVITY OF FLAVONOIDS (PROCYANIDOL,  
QUERCETIN, LUTEOLIN AND KAEMPHEROL) IN HUMAN LYMPHOCYTES  
EXPOSED TO IONIZING RADIATION *IN VITRO***

**Miroslava STANKOVIC, Andreja LESKOVAC, Sandra PETROVIC**  
*Institute of nuclear sciences "Vinca" Physical Chemistry Laboratory*

Phenolic components (flavonoids), may be important in prevention of DNA damage. We have tested the hypothesis that the flavonoids are protective against the DNA-damaging by  $\gamma$ -radiation *in vitro*. The study confirms strong antioxidant activity and radioprotective properties of flavonoids.