

## GENOTOKSIČNI EFEKAT METANOLSKOG EKSTRAKTA BILJKE *COTINUS COGGYGRIA* SCOP. KOD *DROSOPHILA MELANOGASTER*

*Sanja Matić, Snežana Stanić, Milan Mladenović, Nevena Stanković*

**Izvod:** Uključivanje genotoksičnog pristupa u toksikološku evaluaciju biljnih ekstrakata, koji i pored povoljnih svojstava mogu da sadrže komponente sa mutagenim, teratogenim i/ili kancerogenim aktivnostima, je od velike važnosti. Primenom Komet testa kod eukariotskog model organizma *Drosophila melanogaster* u *in vivo* uslovima ispitivana je genotoksična aktivnost metanolskog ekstrakta biljke *Cotinus coggygria* Scop. Tretman sa ekstraktom u koncentraciji od 1% nije uzrokovao statistički značajne promene u odnosu na negativnu kontrolu. Na osnovu raspodela komet klasa i odabranih kvantitativnih parametara može se zaključiti da ekstrakt biljke *C. coggygria* ne pokazuje genotoksičnu aktivnost.

**Ključne reči:** Komet test, *Drosophila melanogaster*, *Cotinus coggygria* Scop.

### Uvod

Pored široko rasprostranjene tradicionalne primene kao medikamenata ili dodataka ishrani, većina vrsta familije Anacardiaceae nije detaljno okarakterisana i u literaturi postoji vrlo malo podataka o biološkoj aktivnosti i hemijskom sastavu kako ekstrakata, tako i etarskih ulja. Anacardiaceae je familija drvenastih dikotiledonih skrivenosemenica koja obuhvata oko 800 vrsta u 82 roda. U familiji se filogenetski razlikuju dve grupe rodova, organizovanih u potfamilije Anacardioideae i Spondoideae.

*Cotinus* je mali rod listopadnih drvenastih biljaka u okviru familije Anacardiaceae sa dve vrste: evroazijska, *Cotinus coggygria* Scop. (sinonim *Rhus cotinus* L.) i severnoamerička, *Cotinus obovatus* Raf. Flora Srbije definiše dva varijeteta vrste *Cotinus coggygria*: var. *laevis* i var. *arenaria* (Gajić, 1973). U Srbiji lokalni naziv za biljku je "ruj" ili "rujevina" jer lišće u jesen dobija ružičastu ili tamnocrveno-ljubičastu, rujnu boju usled oksidacije tanina. U narodnoj medicini se koristi kao antiseptik, za zarastanje rana, protiv upala i protiv krvarenja (Demirci i sar., 2003). Ova biljka se često koristi za lečenje raznih bolesti, kao što su dijareja i paradontoza (Ivanova i sar., 2005). Pokazano je da sirup štiti jetru od hemijskih oštećenja (She i sar., 1991). Ruj se

---

Sanja Matić, (autor za kontakte), Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno matematički fakultet, Institut za biologiju i ekologiju, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Srbija (sanjamatic@kg.ac.rs)

Snežana Stanić, Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno matematički fakultet, Institut za biologiju i ekologiju, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Srbija (stanic@kg.ac.rs)

Milan Mladenović, Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno matematički fakultet, Institut za hemiju, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Srbija (mmladenovic@kg.ac.rs)

Nevena Stanković, Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno matematički fakultet, Institut za hemiju, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Srbija (nevenas@kg.ac.rs)

upotrebljava kao adstrigens (za lečenje zapaljenja kože i sluzokože), protiv groznice (Johnson, 1999), kao koagulant, za povišenu temperaturu i kao tretman kod bolesti oka (PFAF, 2004). Severnoamerički Indijanci su upotrebljavali plodove ruja u svežem stanju ili su ga koristili umesto sirćeta i za pripremanje napitka sličnog limunadi. U kožarskoj industriji koristi se za štavljenje i bojenje kože i vune. Zahvaljujući crvenim listovima služi i kao dekorativna vrsta (Kišgeci, 2002).

Polazeći od pretpostavke da bi do sada neistražena biljna vrste roda *Cotinus*, sa teritorije republike Srbije, mogla biti potencijalni izvor novih biološki aktivnih jedinjenja, cilj ovog rada je da se primenom Komet testa ispita genotoksični efekat metanolskog ekstrakta biljne vrste *C. coggygria* kod eukariotskog model organizma *Drosophila melanogaster* na nivou somatskih ćelija u *in vivo* uslovima.

## Materijal i metode rada

### Biljni materijal

Biljka *C. coggygria* je sakupljena na teritoriji južne Srbije (u selu Rujištu, planina Rogozna, na severu Kosova), u toku maja i juna 2007. Vrsta je identifikovana i primerak je deponovan (16178, BEOU) na Katedri za botaniku Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

### Tretman i postupak

Za izvođenje Komet testa koriste se jedinke "divljeg tipa" ("*Canton S*"). Jedinke *D. melanogaster* (Umea Stock Centre, Sweden) se čuvaju u teglicama sa hranjivim supstratom na konstantnoj temperaturi od 25°C i pri relativnoj vlažnosti od 60%.

Za utvrđivanje genotoksičnog efekta metanolskog ekstrakta biljke *C. coggygria* koristi se prednji deo zadnjeg creva larvi na trećem stupnju razvika laboratorijske linije "*Canton S*". Jedna grupa larvi (10 larvi po grupi) starosti 72 ± 2 sata (24 ± 1°C) prebacuje se na supstrat sa etil metanosulfonatom (EMS, 1 ml 1 mM), druga grupa na supstrat sa metanolskim ekstraktom biljke *C. coggygria* (1%), treća samo na hranjivi supstrat. Nakon 24 sata ispiraju se sa 50 mM PSS (119.0 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 11.1 glukoza, 4.7 KCl, 1.6 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4). Odstrani se prednji deo zadnjeg creva i prebaci u ependorf sa 50 mM PSS i pripremi se ćelijska suspenzija po metodi Howell i Taylor-a (1968) modifikovanoj od strane Mukhopadhyay i sar. (2004). Zatim se 50 mM PSS zameni sa kolagenazom (300 µl 0.5 mg/mL u PBS-u, pH 7.4, 15 minuta na 24 ± 1°C). Ćelijska suspenzija se procedi kroz najlonsku mrežu (60 µm), a kolagenaza se ukloni ispiranjem sa PBS-om, 3 puta po 5 minuta uz blago mešanje, i na kraju se doda 80 µl PBS.

U 80 µl uzorka dodaje se 80 µl LMPA (eng. low melting point agarose u PbS-u), a zatim se odpipetira 75 µl i nanosi se na prethodno pripremljene pločice (Mukhopadhyay i sar., 2004). Nakon 10 minuta pločice se poređaju u plastične posude sa puferom za lizu (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, pH 10.0). Po isteku 2 sata na 4°C, pločice se prebacuju u plastične posude sa puferom za elektroforezu (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13.0) 10 minuta pre horizontalne elektroforeze na 0.7 V/cm (300 mA/25 V, 15 minuta). Pločice se izvade iz kadice za elektroforezu, obrišu se i

poređaju u plastične posude sa puferom za neutralizaciju (0.4 M Tris-HCl, pH 7.4; na sobnoj temperaturi 3 puta po 5 minuta). Pločice se boje etidijum bromidom (75 µl) i pokriju pokrovnim staklom. Primenom fluorescentnog mikroskopa Nikon (Ti-Eclipse) analiziraju se i slikaju ćelije, za svaki uzorak 3 merenja po 100 ćelija.

Stepen oštećenja DNK utvrđuje se pomoću dve komplementarne metode, kvantitativne i kvalitativne metode distribucije oštećenja. "Komete" su vizualno analizirane i klasifikovane u pet kategorija (Collins, 2004), definisanih kao 0, 1, 2, 3 i 4, gde 0 ukazuje na odsustvo DNK oštećenja; 1, 2 i 3 na manje, srednje i duge DNK migracije; i 4 na najviši stepen degradacije, "komete" sa vrlo malim glavama i dugim repom. Nakon vizualne analize ćelije su kvantifikovane primenom softvera TriTekCometScore™ Freeware v1.5 dostupan na web stranici [http://www.autocomet.com/main\\_home.php](http://www.autocomet.com/main_home.php). Dužina repa i % DNA u repu izabrani su kao parametri za procenu stepena oštećenja DNK.

### Rezultati istraživanja i diskusija

Primenom alkalne verzije Komet eseja utvrđen je stepen oštećenja DNK na osnovu kvalitativne analize dužine repa i kvantitativnih parametara (% DNK u repu i dužina repa) u somatskim ćelijama larvi vrste *D. melanogaster*.

Raspodela komet klasa nakon tretmana sa metanolskim ekstraktom biljke *C. coggygria* prikazana je u Tabeli 1. U odnosu na negativnu kontrolu, larve tretirane sa EMS-om pokazuju visok nivo genotoksičnosti sa dominacijom klasa 2, 3 i 4 (maksimum oštećenja). Analizirajući raspodelu komet klasa nakon tretmana sa metanolskim ekstraktom u koncentraciji od 1%, evidentno je da su "komete" sa oštećenjem koje se može klasifikovati u klase 0 i 1 (vrlo nizak i nizak stepen oštećenja DNK) najrasprostranjenije i da su "komete" sa srednjim stepenom oštećenja (klasa 2) retke.

Tabela 1. Genotoksični efekat metanolskog ekstrakta biljke *Cotinus coggygria* primenom kvalitativnih parametara

Table 1. Genotoxic effect of the *Cotinis coggygria* methanol extract using qualitative parameters

Tretman	Nivo DNK oštećenja					Ukupan skor <sup>a</sup>
	0	1	2	3	4	
Negativna kontrola	92.1±0.72	7.9±0.40	0.00±0.3	0.00±0.00	0.00±0.00	7.9±1.8
EMS <sup>b</sup>	5.63±0.31	20.0±0.90	32.1±0.33	27.12±0.50	15.15±1.02	226.16±0.41 <sup>*</sup>
CCM <sup>c</sup>	85.6±0.20	12.2±1.35	2.2±0.42	0.00±0.00	0.00±0.00	16.6±1.04 <sup>**</sup>

<sup>a</sup>Rezultati predstavljaju srednju vrednost i standardnu devijaciju tri nezavisna eksperimenta.

<sup>b</sup>EMS; etil metanosulfonat, pozitivna kontrola, 1 mM;

<sup>c</sup>CCM, *Cotinus coggygria* ekstrakt, 1%;

\* $p < 0.05$  u poređenju sa negativnom kontrolom,

\*\* $p < 0.05$  u poređenju sa EMS-om.

U Tabeli 2 prikazan je efekat metanolskog ekstrakta biljke *C. coggygria* na osnovu kvantitativnih parametara: % DNK u repu i dužina repa, u ćelijama koje su dobijene izolovanjem prednjeg dela zadnjeg creva larvi vrste *D. melanogaster*. Statistički značajne razlike u odabranim kvantitativnim parametrima, u odnosu na negativnu kontrolu, se mogu uočiti nakon tretmana sa EMS-om. *In vivo* tretman sa metanolskim ekstraktom biljke *C. coggygria* u koncentraciji od 1% nije uzrokovao statistički značajne promene u odnosu na negativnu kontrolu.

Tabela 2. Genotoksični efekat metanolskog ekstrakta biljke *Cotinus coggygria* primenom kvantitativnih parametara

Table 2. Table 1. Genotoxic effect of the *Cotinus coggygria* methanol extract using quantitative parameters

	Negativna kontrola	EMS <sup>a</sup>	CCM <sup>b</sup>
% DNK u repu	9.42±0.70	17.3±1.33*	10.17±0.51**
Dužina repa	4.21±0.99	23.1±0.32*	5.04±0.21**

Rezultati predstavljaju srednju vrednost i standardnu devijaciju iz tri nezavisna eksperimenta.

<sup>a</sup>EMS; etil metanosulfonat, pozitivna kontrola, 1 mM;

<sup>c</sup>CCM, *Cotinus coggygria* ekstrakt, 1%;

\* $p < 0.05$  u poređenju sa negativnom kontrolom,

\*\* $p < 0.05$  u poređenju sa EMS-om.

### Zaključak

Primenom alkalne verzije Komet eseja na model organizmu *D. melanogaster* nije utvrđena statistički značajna razlika u tretmanu sa metanolskim ekstraktom biljke *C. coggygria* u koncentraciji od 1% u odnosu na negativnu kontrolu. Na osnovu raspodela komet klasa i odabranih kvantitativnih parametara može se zaključiti da metanolski ekstrakt dobijen iz stabla biljke *C. coggygria* u koncentraciji od 1% ne pokazuje genotoksičnu aktivnost.

### Napomena

Istraživanja u ovom radu deo su projekata III43004 i III41010 koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

**Literatura**

- Gajić M. (1973). Flora Srbije. Beograd, Srbska akademija nauke i umetnosti, 63-65.
- Demirci B., Demirci F., Baser KH. (2003). Composition of the essential oil of *Cotinus coggygia* (Scop.) from Turkey. Flavour and Fragrance Journal, 18, 43-44.
- Ivanova D., Gerova D., Chervenkov T., Yankova T. (2005). Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 96, 145-150.
- She Q., Shang D., Ma F., Zhang Z. (1991). Pharmacological study on anti-hepatitis effect of *Cotinus coggygia* Scop. syrup. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 16, 746.
- Johnson T. (1999). CRC ethnobotany desk reference. Boca Raton, Fla: CRC Press, 708.
- Plants for a Future (PFAF). (2004). Online database *Cotinus coggygia*. Dostupno: <http://www.pfaf.org/database/plants.php?Cotinus+coggygia>
- Kišgeci J. (2002). Lekovito bilje - Gajenje, sakupljanje, upotreba. Partenon, Beograd.
- Howell S.L., Taylor K.W. (1968). Potassium ions and the secretion of insulin by islets of Langerhans incubated in vitro. Biochemical Journal, 108, 17-24.
- Mukhopadhyay I., Kar C.D., Bajpayee M., Dhawan A. (2004). Evaluation of *in vivo* genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline *Comet assay*. Mutagenesis, 19, 85-90.
- Collins AR. (2004). Comet assay for DNA damage and repair: Principles applications and limitations. Molecular Biotechnology, 26, 249-261.
- Manoharan K., Banerjee M.R. (1985).  $\beta$  -carotene reduces sister chromatid exchange induce chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. Cell Biology International Reports, 9, 783-789.

## **GENOTOXIC EFFECT OF THE *COTINUS COGGYGRIA* SCOP. METHANOL EXTRACT ON *DROSOPHILA MELANOGASTER***

*Sanja Matic, Snežana Stanić, Milan Mladenović, Nevena Stanković*

### **Abstract**

Plant extracts that appear to have favorable properties, may contain chemical compounds with mutagenic, teratogenic and/or carcinogenic activity, and it is of great importance to the inclusion of genotoxic approaches to toxicological evaluation of plant extracts. Using a comet assay on eukaryotic model organism *Drosophila melanogaster* in *in vivo* condition, potential genotoxic activity of the methanol extract of plant *Cotinus coggygria* Scop. was determined. Treatment with the methanol extracts, at a concentration of 1%, caused no significant changes compared to the negative control. Based on the distribution of comet class and selected quantitative parameters (% DNA in tail and tail length) it can be concluded that a methanol extract obtained from *C. coggygria* at a concentration of 1% does not show genotoxic activity.

**Key words:** Comet assay, *Drosophila melanogaster*, *Cotinus coggygria* Scop.

---

Sanja Matic, (contact person), University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Serbia (sanjamatic@kg.ac.rs)

Snežana Stanić, University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Serbia (stanic@kg.ac.rs)

Milan Mladenović, University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Serbia (mmladenovic@kg.ac.rs)

Nevena Stanković, University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Serbia (nevenas@kg.ac.rs)