

BIOLOŠKI FAKULTET
UNIVERZITET U BEOGRADU

Milena Radaković

**UTICAJ ADRENALINA I EFEDRINA
NA POJAVU PRIMARNIH
OŠTEĆENJA DNK U LIMFOCITIMA
ČOVEKA *IN VITRO***

doktorska disertacija

Beograd, 2013.

FACULTY OF BIOLOGY
UNIVERSITY OF BELGRADE

Milena Radaković

**INFLUENCE OF ADRENALINE AND
EPHEDRINE ON PRIMARY
DNA DAMAGE OF LYMFOCYTES
OF MAN *IN VITRO***

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013.

Mentori:

akademik Marko Anđelković, redovni profesor Biološkog fakulteta
Univerziteta u Beogradu u penziji

dr Ninoslav Đelić, redovni profesor Fakulteta veterinarske medicine
Univerziteta u Beogradu

Članovi Komisije:

akademik Marko Anđelković, redovni profesor Biološkog fakulteta
Univerziteta u Beogradu u penziji

dr Ninoslav Đelić, redovni profesor Fakulteta veterinarske medicine
Univerziteta u Beogradu

dr Marina Stamenković-Radak, vanredni profesor Biološkog fakulteta
Univerziteta u Beogradu

dr Zoran Stanimirović, redovni profesor Fakulteta veterinarske medicine
Univerziteta u Beogradu

dr Lada Živković, docent Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane:

Ovaj rad je urađen u Laboratoriji za genetiku životinja na Katedri za biologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu u okviru projekta III 46002- „Molekularno-genetička i ekofiziološka istraživanja u zaštiti autohtonih animalnih genetičkih resursa, očuvanja dobrobiti, zdravlja i reprodukcije gajenih životinja i proizvodnji bezbedne koji je finansiran od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Izrada ovog rada sigurno ne bi bila moguća bez pomoći i podrške mojih kolega zbog čega sam im neizmerno zahvalna.

Najlepše se zahvaljujem svom mentoru, profesoru dr Ninoslavu Deliću na predloženoj tematskoj oblasti istraživanja, na stručnom i naučnom rukovodstvu, korisnim savetima i velikoj pomoći tokom izrade ovog rada.

Takođe sam izuzetno zahvalna mentoru, akademiku dr Marku Anđelkoviću na dragocenim savetima, sugestijama i pomoći pri sagledavanju i kritičkoj analizi dobijenih rezultata.

Iskrenu zahvalnost dugujem profesoru dr Zoranu Stanimiroviću na podršci, podstiaju i korisnim savetima tokom izrade ovog rada.

Dalju reč zahvalnosti dugujem dr Ladi Živković i dr Marini Stamenković-Radak. Vaši saveti i sugestije su mi bili veoma korisni.

Zahvaljujem se prof. dr Bosiljki Plećaš-Solarević na velikoj pomoći u statističkoj obradi rezultata.

Na kraju, posebno bih se zahvalila mojoj porodici na безусловnoj ljubavi, podršci i ohrabrenju tokom svih ovih godina.

REZIME

UTICAJ ADRENALINA I EFEDRINA NA POJAVU PRIMARNIH OŠTEĆANJA DNK U LIMFOCITIMA ČOVEKA *IN VITRO*

U ovom radu cilj istraživanja je bilo ispitivanje primarnih oštećenja DNK izolovanih limfocita čoveka pod uticajem adrenalina i efedrina. Oštećenja DNK su evaluirana primenom *in vitro* Komet testa. Ispitivan je širok spektar koncentracija adrenalina i efedrina (u rasponu od 0,0005 μM do 500 μM) u različitim vremenskim intervalima (15 min, 60 min, 120 min, 240 min i 24 sata).

Najizraženije oštećenje DNK ustanovljeno je nakon 15 min tretmana adrenalinom, pri čemu su sve koncentracije izuzev najniže (0.0005 μM) dovele do povećane migracije DNK. Nakon 60 min, 120 min, 240 min tretmana adrenalinom indukovano je oštećenje DNK u opsegu od 5 do 300 μM . Najslabiji efekat ispoljen je nakon 24 sata, tako da su samo najviše koncentracije adrenalina (150 μM i 300 μM) dovele do povećanog stepena oštećenja DNK.

Radi utvrđivanja mogućeg učešća reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) u indukovanju DNK oštećenja pod dejstvom adrenalina upotrebili smo antiokisane katalazu (100 IU i 500 IU) i kvercetin (100 μM i 500 μM). Kotretman limfocita adrenalinom (300 μM) i antioksidansima nakon 15 ili 60 minuta doveo je do značajnog smanjenja količine DNK u repovima kometa. Prema tome, može se zaključiti da adrenalin ispoljava svoje genotoksične efekte indukcijom reaktivnih kiseoničnih vrsta i da se neka oštećenja poprave tokom prva četiri sata nakon tretmana adrenalinom.

Za razliku od adrenalina, efedrin nije doveo do povećanja migracije DNK u odnosu na negativnu kontrolu tokom različitih vremenskih intervala. Jedino je koncentracija efedrina od 500 μM nakon 15 minuta tretmana indukovala oštećenje DNK koje je bilo statistički značajno.

Odabrane koncentracije efedrina (1, 50, 300 μ M) su dalje testirane u prisustvu inhibitora reparacije (citozin arabinozid - AraC i hidroksiurea - HU) radi ispitivanja eventualnog povećanja oštećenja DNK. Tretman sa inhibitorima reparacije uzrokovao je značajna povećanja DNK oštećenja u svim koncentracijama efedrina (1, 50 and 300 μ M) nakon 15 i 60 min. S obzirom da su inhibitori reparacije takođe doveli do povećane migracije DNK i kod negativne kontrole povećana oštećenja u kotretmanu sa inhibitorima reparacije (AraC i HU) rezultat su postojanja DNK oštećenja koja su posledica već prisutnih endogenih oštećenja. Shodno tome, zaključuje se da efedrin ne ispoljava genotoksične efekte u *in vitro* Komet testu na humanim limfocitima.

Ključne reči: adrenalin, efedrin, genotoksičnost, Komet test, antioksidansi, inhibitori reparacije

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genetika

UDK broj: [577.175.5 + [547.94 : 582.685.2]] : 577.212

ABSTRACT

INFLUENCE OF ADRENALINE AND EPHEDRINE ON PRIMARY DNA DAMAGE OF LYMPHOCYTES OF MAN *IN VITRO*

The objectives of these investigations were to investigate primary DNA damage in isolated human lymphocytes exposed to adrenaline and ephedrine. DNA damage was evaluated by the *in vitro* Comet assay. A broad spectrum of adrenaline and ephedrine concentrations (range from 0.0005 μM to 300 μM) were examined in the Comet assay for various treatment times (15 min, 60 min, 120 min, 240 min and 24 h).

The most profound DNA damage was observed after 15 min of adrenaline treatment, as all concentrations tested except the lowest one (0.0005 μM) caused an increase in DNA migration. After 1 h, 2 h and 4 h of treatment, adrenaline induced DNA damage at concentration range from 5 μM to 300 μM . The slightest DNA damage was observed after 24 h of adrenaline treatment, therefore only the highest concentrations of adrenaline (150 μM and 300 μM) caused increased level of DNA damage.

In order to evaluate the potential contribution of reactive oxygen species (ROS)-induced DNA damage exposed to adrenaline, we used antioxidants catalase (100 IU and 500 IU) and quercetin (100 μM and 500 μM). Co-treatment of lymphocytes with adrenaline (300 μM) and antioxidants for 15 or 60 min, significantly reduced the quantity of DNA in the comet tails. Therefore, it can be concluded that adrenaline exhibits genotoxic effects mainly through induction of reactive oxygen species and that some of the DNA damage is repaired during the first four hours following the treatment with adrenaline.

Unlike adrenaline, ephedrine did not induce increased level of DNA migration in comparison to the negative control for various treatment times. Only the highest concentration of ephedrine (500 μM) induced a statistically significant DNA damage.

The chosen concentrations of ephedrine (1, 50, 300 μ M) were further tested with inhibitors of DNA repair (cytosine arabinoside and hydroxyurea) in order to evaluate the possible increase in DNA damage. Treatment with inhibitors of DNA repair caused significant rise in DNA damage in all chosen concentrations of ephedrine at 15 and 60 min. Since inhibitors of DNA repair also increased level of DNA migration in the negative control, increases of DNA damage co-treated with inhibitors of DNA repair (AraC + HU) resulted from unrepaired endogenous DNA damage. Hence, it can be concluded that ephedrine does not exhibit genotoxic effects in the *in vitro* Comet assay on human lymphocytes.

Keywords: adrenaline, ephedrine, genotoxicity, Comet assay, antioxidants, inhibitors of DNA repair

Scientific field: Biology

Narrower scientific field: Genetics

UDC number: [577.175.5 + [547.94 : 582.685.2]] : 577.212

SADRŽAJ

SPISAK TABELA I GRAFIKONA

1.	UVOD	1
2.	OPŠTI DEO	3
2.1.	Kateholamini	3
2.1.1.	Mehanizmi dejstva kateholamina	5
2.1.2.	Metabolizam kateholamina	8
2.2.	Genotoksičnost hormona	10
2.2.1.	Genotoksični efekti kateholamina	12
2.3.	Efedrin	15
2.3.1	Mehanizmi dejstva efedrina	16
2.4.	Kateholamini i ROS	19
2.4.1.	Oksidativna DNK oštećenja	22
2.4.2.	Detekcija oksidativnih oštećenja Komet testom	25
2.4.2.1.	Evaluacija oštećenja DNK primenom antioksidanasa u Komet testu	28
2.4.2.2.	Evaluacija oštećenja DNK primenom inhibitora reparacije u Komet testu	29
3.	CILJEVI ISTRAŽIVANJA	31
4.	MATERIJAL I METODE	32
4.1.	Materijal	32
4.2.	Metode	33
4.2.1.	Izolacija humanih limfocita i tretman	33
4.2.2.	Određivanje broja vijabilnosti ćelija	36

4.2.3.	Komet test	36
4.2.4.	Analiza podataka	37
4.2.5	Statistička analiza	38
5.	REZULTATI	39
5.1.	Komet test kod limfocita čoveka izloženih dejstvu adrenalina	39
5.2.	Efekat antioksidanasa na oštećenje DNK izazvana adrenalinom	48
5.3.	Komet test kod limfocita čoveka izloženih dejstvu adrenalina	55
5.4.	Efekat inhibitora reparacije na oštećenja DNK u prisustvu efedrina	62
6.	DISKUSIJA	73
6.1.	Ispitivanja Komet testom	73
6.2.	Uticaj antioksidanasa na genotoksičan efekat adrenalina	76
6.3.	Uticaj inhibitora reparacije u prisustvu efedrina	80
7.	ZAKLJUČCI	83
8.	LITERATURA	84

SPISAK TABELA I GRAFIKONA

TABELE

- Tabela 1. Prikaz primenjenih koncentracija adrenalina sa različitim vremenskim intervalima inkubacije u Komet testu
- Tabela 1a. Prikaz primenjenih koncentracija adrenalina koje odgovaraju određenim dozama
- Tabela 2. Prikaz primenjenih koncentracija efedrina sa različitim vremenskim intervalima inkubacije u Komet testu
- Tabela 3. Analiza DNK oštećenja u limfocitima čoveka nakon različitih tretmana adrenalinom.
- Tabela 4. Efekat katalaze i kvercetina naspram DNK oštećenje adrenalina u limfocitima čoveka nakon 15 minuta.
- Tabela 5. Efekat katalaze i kvercetina naspram DNK oštećenje adrenalina u limfocitima čoveka nakon 60 minuta.
- Tabela 6. Analiza DNK oštećenja u limfocitima čoveka nakon različitih tretmana efedrinom.
- Tabela 6. Analiza DNK oštećenje na limfocitima čoveka nakon 15 minuta tretmana efedrina i DNK inhibitora reparacije (citozin arabinoza i hidrokisiurea)
- Tabela 7. Analiza DNK oštećenje na limfocitima čoveka nakon 30 minuta tretmana efedrina i DNK inhibitora reparacije (citozin arabinoza i hidrokisiurea)

GRAFIKONI

- Grafikon 1. Efekat adrenalina na DNK oštećenje u humanim limfocitima nakon 15 minuta.
- Grafikon 2. Distribucija klasa kometa nakon 15 minuta izlaganja adrenalinom.
- Grafikon 3. Efekat adrenalina na DNK oštećenje u humanim limfocitima nakon 60 minuta.
- Grafikon 4. Distribucija klasa kometa nakon 60 minuta izlaganja adrenalinom.
- Grafikon 5. Efekat adrenalina na DNK oštećenje u humanim limfocitima nakon 120 minuta.
- Grafikon 6. Distribucija klasa kometa nakon 120 minuta izlaganja adrenalinom.
- Grafikon 7. Efekat adrenalina na DNK oštećenje u limfocitima čoveka nakon 240 minuta.
- Grafikon 8. Distribucija klasa kometa nakon 240 minuta izlaganja adrenalinom.
- Grafikon 9. Efekat adrenalina na DNK oštećenje u limfocitima čoveka nakon 15 minuta.
- Grafikon 10. Distribucija klasa kometa nakon 240 minuta izlaganja adrenalinom.
- Grafikon 11. Antioksidativni efekat katalaze i kvercetina u tretmanu sa adrenalinom nakon 15 minuta.
- Grafikon 12. Nivo DNK oštećenja u limfocitima čoveka nakon 15 minuta delovanja katalaze u tretmanu sa adrenalinom
- Grafikon 13. Nivo DNK oštećenja u limfocitima čoveka nakon 15 minuta delovanja kvercetina u tretmanu sa adrenalinom
- Grafikon 14. Antioksidativni efekat katalaze i kvercetina u tretmanu sa adrenalinom nakon 60 minuta.
- Grafikon 15. Nivo DNK oštećenja u limfocitima čoveka nakon 15 minuta delovanja katalaze u tretmanu sa adrenalinom
- Grafikon 16. Nivo DNK oštećenja u limfocitima čoveka nakon 60 minuta delovanja kvercetina u tretmanu sa adrenalinom
- Grafikon 17. Efekat efedrina na DNK oštećenje u limfocitima čoveka nakon 15 minuta.
- Grafikon 18. Distribucija klasa kometa nakon 15 minuta izlaganja efedrinom.

- Grafikon 19. Efekat efedrina na DNK oštećenje u limfocitima čoveka nakon 60 minuta.
- Grafikon 20. Distribucija klasa kometa nakon 60 minuta izlaganja efedrinom.
- Grafikon 21. Efekat efedrina na DNK oštećenje u limfocitima čoveka nakon 120 minuta.
- Grafikon 22. Distribucija klasa kometa nakon 120 minuta izlaganja efedrinom.
- Grafikon 23. Efekat efedrina na DNK oštećenje u limfocitima čoveka nakon 240 minuta.
- Grafikon 24. Distribucija klasa kometa nakon 240 minuta izlaganja efedrinom.
- Grafikon 25. Efekat efedrina na DNK oštećenje u limfocitima čoveka nakon 24 sata.
- Grafikon 26. Distribucija klasa kometa nakon 24 sata izlaganja efedrinom.
- Grafikon 27. Efekat citozin arabinoze (20 μM) i hidrokisiuree (2000 μM) u tretmanu sa efedrinom nakon 15 minuta.
- Grafikon 28. Efekat citozin arabinoze (40 μM) i hidrokisiuree (4000 μM) u tretmanu sa efedrinom nakon 15 minuta.
- Grafikon 29. Nivo DNK oštećenja efedrina nakon 15 minuta u limfocitima čoveka sa i bez prisustva inhibitorima reparacije (Arac 20 μM i HU 2000 μM).
- Grafikon 30. Nivo DNK oštećenja efedrina nakon 15 minuta u limfocitima čoveka sa i bez prisustva inhibitorima reparacije (Arac 20 μM i HU 2000 μM).
- Grafikon 31. Efekat citozin arabinoze (20 μM) i hidrokisiuree (2000 μM) u tretmanu sa efedrinom nakon 60 minuta.
- Grafikon 32. Efekat citozin arabinoze (40 μM) i hidrokisiuree (4000 μM) u tretmanu sa efedrinom nakon 60 minuta.
- Grafikon 33. Nivo DNK oštećenja efedrina nakon 60 minuta u limfocitima čoveka sa i bez prisustva inhibitorima reparacije (Arac 20 μM i HU 2000 μM).
- Grafikon 34. Nivo DNK oštećenja efedrina nakon 60 minuta u limfocitima čoveka sa i bez prisustva inhibitorima reparacije (Arac 20 μM i HU 2000 μM).

1. UVOD

Ljudi su danas konstantno izloženi mnogobrojnim agensima koji mogu da oštete genetički materijal. Poznato je da se dejstva hemijskih agenasa na DNK povezuju sa mutagenim događajima, koji mogu biti polazna tačka u razvoju kancera. Stoga mogućnost da neke hemikalije mogu narušiti genetički integritet ćelije privlači značajnu pažnju naučne javnosti. To je dovelo da razvoja niza testova koji mogu detektovati različite tipove genotoksičnih efekata kako bi predvideli potencijalnu genotoksičnost, a time i određeni stepen mutagenosti agenasa uključujući pre svega farmaceutske proizvode, kao i širok spektar fizičkih i hemijskih polutanata životne sredine (Stanimirović i sar., 2005; Stanimirović i sar., 2007).

Procena oštećenja genetičkog materijala endogenih jedinjenja, kao što su hormoni veoma je delikatna. Malo je verovatno očekivati da će prirodna selekcija u procesu evolucije dozvoliti prisustvo endogenih jedinjenja koja su sposobna da naruše genetički integritet (Djelic 1997), naročito ako se uzme u obzir značajna i nezamenljiva uloga hormona u održavanju vitalnih funkcija tela, uključujući rast, razvoj i reprodukciju. Opravdanost njihovih ispitivanja je stoga veća s obzirom na njihovu široku primenu u medicini u lečenju raznih bolesti i stanja (Dhillon i sar., 1994; Hundal i sar., 1997; Shadab i sar., 1999).

Postoje dokazi koji ukazuju da hormoni, posebno steroidni, pod određenim uslovima mogu ispoljiti genotoksične efekte (Ahmad i sar., 2000; Dhillon i Dhillon, 1995; Yared i sar., 2002). Iako steroidni hormoni vezivanjem za receptore utiču na nastanak malignih ćelija, otkriće različitih tipova DNK oštećenja indukovanih produktima metabolizma estrogena dovelo je do zaključka da estrogeni mogu ispoljiti mutageni potencijal nezavistan od hormonalne aktivnosti. Utvrđeno je da metaboličkom konverzijom fenolne grupe estrogena dolazi do formiranja reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i intermedijera sposobnih da oštete DNK (Liehr, 2001).

Podatak da fenolne grupe nekih nesteroidnih hormona (tireoidni hormoni, adrenalin) i neurotransmitera (dopamin, noradrenalin) mogu da se uključe u redoks cikluse praćene stvaranjem ROS i oksidativnog stresa, navelo nas je da izvršimo proučavanja genotoksičnog potencijala adrenalina. Uz to, evaluiran je genotoksičan efekat simpatomimetika efedrina koji ima sličnu hemijsku strukturu kao adrenalin, ali ne poseduje kateholnu grupu, kako bi se ispitao značaj prisustva kateholne grupe u ispoljavanju genotoksičnog efekta.

2. OPŠTI DEO

2.1. Kateholamini

Kateholamini čine klasu hemijskih neurotransmitera i hormona koji imaju važnu ulogu prevashodno u fiziološkim hemodinamičkim regulatornim mehanizmima. Integralni deo strukture adrenalina, noradrenalina i dopamina jeste hidroksilisani aromatični benzenov prsten, poznat kao katehol i bočni aminski lanac na osnovu čega su i dobili naziv kateholamini (slika 1).

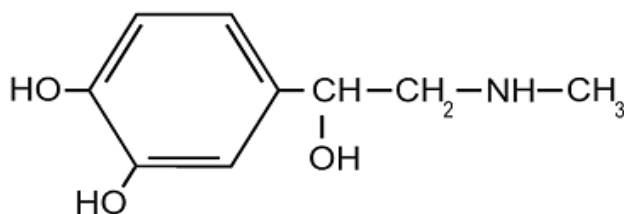
Iako kateholamini nisu esencijalni za život, praktično svi organi u telu su pod uticajem kateholamina (Sherwood, 2009). Primarno dejstvo adrenalina jeste mobilizacija fizioloških resursa u odgovoru na emocionalni i fizički stres. Adrenalin se intenzivno oslobađa tokom stresa dovodeći do povećavanja srčanog ritma, tonusa krvnih sudova i volumena ekstracelularne tečnosti čime doprinosi povećanju krvnog pritiska (Seifter i sar., 2005). S druge strane, adrenalin prouzrokuje glikogenolizu i lipolizu što se manifestuje povišenjem nivoa glukoze i koncentracije slobodnih masnih kiselina u krvi i time se obezbeđuje odgovarajuća energija za potrebe organizama. Na ovaj način adrenalin priprema organizam za „bori se ili beži” odgovor (engl. fight or flight) (Sherwood, 2009). Adrenalin je takođe značajan regulator sekrecije hormona. Sekrecija insulina može biti povećana ili snižena pod uticajem adrenalina (Lundoquist i Ericson, 1978). Uz to, adrenalin podstiče agregaciju trombocita preko prostaglandina E₁ koji ispoljava inhibitorski efekat na sam proces (Bentley, 2011).

Adrenalin osim u „bori se ili beži” odgovoru učestvuje u temperaturnoj regulaciji, regulaciji intermedijarnog metabolizma, a kod nekih životinja adrenalin igra značajnu ulogu u buđenju iz hibernacije (Bentley, 2011).

Osim u adrenalnoj srži, kateholamini se endogeno stvaraju u simpatičkim nervnim završecima, u ćelijama želuca kao i u limfocitima (Goldstein i sar., 2003). Tokom normalnog fiziološkog stanja ne postoji stalna sekrecija adrenalina. Bazalni nivo adrenalina u plazmi čoveka je u nanomolarnom opsegu. Međutim, u odgovoru na hipoglikemiju, hemoragijsku hipotenziju (Goldstein i sar., 2003), fizičku aktivnost (Kjaer, 1998), feohromocitoma (Gerlo i Sevens, 1994) i pojedine srčane poremećaje (Lameris i sar., 2000) koncentracija adrenalina može se znatno povećati.

Zbog značajnog uticaja na kardiovaskularni sistem kateholamini su se decenijama primenjivali u kardiovaskularnoj terapiji, a sam adrenalin koristio se više od sto godina u kardiopulmonarnom oživljavanju (Zhong i Dorian, 2005). Danas se u medicini adrenalin najčešće koristi kao lek izbora u otkljanjanju znakova izazvanim anafilaktičkim reakcijama. Adrenali se dodaje rastvorima lokalnih anestetika kako bi se produžilo njihovo delovanje na mestu aplikacije. Zbog vazokonstriktornog dejstva primenjuje se i kao lokalni hemostatik u zaustavljanju kapilarnih krvarenja kože i sluzokože, a u oftamologiji se primenjuje u terapiji glaukoma (NTP, 1990).

Na našem tržištu, adrenalin se može naći u vidu injekcionog rastvora adrenalin-hidrohlorida (1:1 000 ili 1 mg/mL) koji se primenjuje subkutano ili intramuskularno (0.2-1.0 mL) ili u vidu aerosola (5.5 mg/mL) gde se po tretmanu osloboda 0.22-0.25 mg adenalina (NTP, 1990).



Slika 1. Strukturna formula adrenalina
(preuzeto sa <http://www.worldofmolecules.com/emotions/Epinephrine.png>)

2.1.1. Mehanizam delovanja kateholamina

Kateholamini spadaju u jedinjenja koja ne prolaze kroz membranu target ćelija već svoje delovanje ostvaruju interakcijom sa različitim adrenergičkim receptorima (adrenoreceptori) koji se nalaze u membranama odgovarajućih ćelija. Ovi receptori ne utiču direktno na ekspresiju gena, već prenose poruku tj. signal kroz ćelijsku membranu u citosol gde se pokreće novi mehanizam specifičnih reakcija u kome učestvuju sekundarni glasnici.

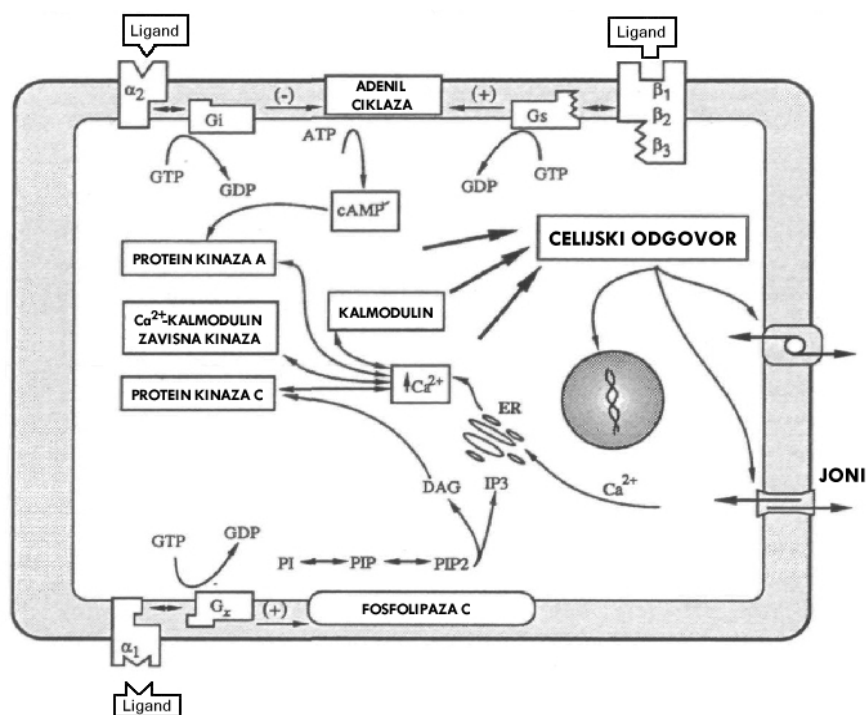
Adrenoreceptori se klasifikuju u šest podtipova α i tri podtipa β adrenoreceptora. U poslednje dve decenije postoje dokazi da veliki broj ćelijskih tipova poseduje na svojoj površini adrenoreceptore, delujući na niz ćelijskih funkcija. Mnogi organi sadrže samo α - ili samo β - adrenoreceptore. Krvni sudovi kože, sluznica, bubrega i drugih visceralnih organa imaju više α - nego β - adrenoreceptora, dok krvni sudovi srca, skeletnih mišića imaju više β - adrenoreceptora. Adrenalin stimuliše oba tipa receptora, ali veći afinitet ima prema β - adrenoreceptorima dok noradrenalin više deluje na α - adrenoreceptore. U osnovi, β - adrenoreceptori deluju ekscitatorno na srčani mišić; stimulacija vaskularnih α - adrenoreceptora vodi vazokonstrukciji, a stimulacija vaskularnih β - adrenoreceptora vodi vazodilataciji.

Svaki adrenoreceptor osvaruje vezu sa G-proteinom koji ima značajnu ulogu u transmembranskom prenošenju signala. Većina poznatih G proteina su heterotrimeri sastavljeni od α subjediniice labavo vezane za $\beta\gamma$ dimer i imaju ulogu kao posrednici između receptora i raznih efektorih proteina čiju funkciju regulišu ovi receptori (Varagić i Milošević, 2003). Adrenoreceptori imaju različito dejstvo u zavisnosti od podtipa G proteina sa kojim su povezani i mehanizma signalne transdukcije vezanog za specifičan G protein što je veoma važno jer će izazavana fiziološka dejstva varirati u zavisnosti od specifičnosti receptora za koji se kateholamin veže (Molina, 2004).

Aktivacijom α_1 receptora aktivira se fosfoinozitol-specifična fosfolipaza C posredstvom stimulantnog G-proteina (Gs) koja prouzrokuje razlaganje fosfoinozitida na dva sekundarna glasnika: inozitol-trifosfat (IP_3) i diacil glicerol

(DAG) (Jezdimirović, 2005) (slika br. 2). IP₃ povećava koncentraciju kalcijumovih jona (Ca²⁺) u citosolu (Minneman, 1988) čime se aktivira odgovarajuća protein kinaza preko proteina kalmodulina. Kalmodulin ne poseduje enzimsku aktivnost, nego se vezuje za druge ciljne proteine ili pojedinim enzimima može poslužiti kao stalna regulatorna subjedinic. Na taj način kalmodulin aktivira enzime koji vrše fosforilaciju odgovarajućih proteina.

DAG, sekundarni glasnik, aktivira protein kinazu C koja dalje vrši fosforilaciju ciljnih proteina u ćeliji. U izvesnim glatkomišićnim ćelijama aktivacija α₁ receptora dovodi do pojačanog ulaska Ca²⁺ kroz membranu otvaranjem receptorskih kalcijumovih kanala (Tsujimoto i sar., 1989).



Slika 2. Šematski prikaz signalnih transdukcionih puteva vezani za adrenergičke receptore (preuzeto iz Raymond i sar., 1990, Hypertenzion)

Aktivacijom β receptora dolazi do konformacione promene receptora koja omogućuje zamenu GDP sa GTP na α subjedinici. Aktivna α subjedinica se odvaja od $\beta\gamma$ proteina i aktivira adenilat ciklazu koja katalizuje sintezu cAMP od ATP-a. cAMP dalje aktivira protein kinazu zavisnu od cAMP (A-kinazu) katališući fosforilaciju odgovarajućih proteina. Adenilat ciklaza je aktivna sve dok je GTP intaktan, a kad dođe do hidrolize GTP u GDP, prestaje stimulisanje adenilat ciklaze. α_2 receptori inhibišu adenilat ciklazu posredstvom inhibitornog G-proteina (Gi), usled čega se smanjuje intracelularna koncentracija cAMP-a (Varagić i Milošević, 2003).

Poznato je da su kateholamini značajni regulatori kardiovaskularnih funkcija i energetskog metabolizma. Postoji sve više dokaza o značajnoj modulatornoj ulozi kateholamina u proliferaciji imunih ćelija, stvaranju citokina i antitela (Sanders i Kohm, 2002; Madden, 2003). Svoje antiproliferativno dejstvo na limfocite adrenalin ostvaruje preko β adrenoreceptora. S obzirom da limfociti sadrže adrenoreceptore, pretpostavlja se da molekularnim mehanizimima signalne transdukcije, adrenalin indukuje povećanu količinu cAMP, što vodi narušavanju citoskeletnih elemenata koji učestvuju u ćelijskoj deobi (Sanders i sar., 2001; Kavelaars, 2002) Takođe, preko cAMP-a kateholmini deluju na citokine i time učestvuju u regulaciji supresivnih i stimulatornih efektata imunog odgovora. Stoga kateholamini predstavljaju veoma bitnu kariku između nervnog, endokrinog i imunog sistema.

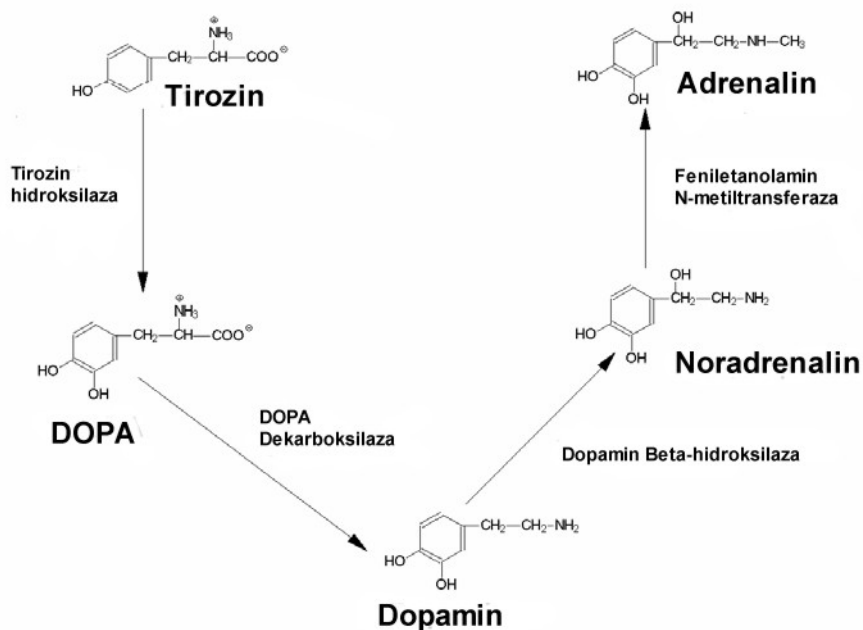
2.1.2. Metabolizam kateholamina

Adrenalin je prirodni hormon koji se nakon sinteze distribuira do svih delova tela, izuzev mozga (zbog krvno-moždane barijere). Krajnji enzimatski korak u biosintezi adrenalina uključuje N-metilaciju noradrenalina putem enzima feniletanolamin N-metiltransferaze (PNMT) koji je pre svega lokalizovan u adrenalnoj srži.

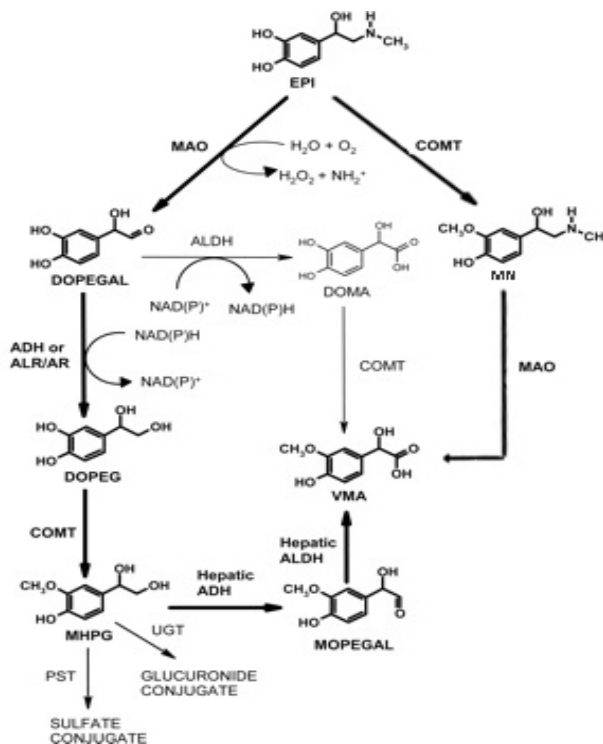
Kateholamini u svojoj strukturi poseduju 3,4-dihidrofenolni prsten koji potiče od prekursora tirozina (unešen putem ishrane ili hidroksilacijom fenilalanina) koji se konvertuje u 3,4 dihidrofenilalanin (DOPA) dejstvom enzima tirozin hidroksilaze u prisustvu kiseonika i tetrahidrobiopterinskog kofkatora (slika 3). Transformacija tirozina u DOPA predstavlja ograničavajući korak u biosintezi kateholamina s obzirom da je količina pomenutog enzima 200 puta manja u odnosu na ostale enzime. DOPA je supstrat za enzim dopamin dekarboksilazu pri čemu se stvara dopamin. Pomenuti enzim nalazi se u čitavom telu i zahteva pirodoksal fosfat za svoje delovanje. Hidroksilacijom dopamina nastaje noradrenalin aktivnošću enzima dopamin β -hidroksilaze u prisustvu Ca^{2+} jona, askorbinske kiseline i kiseonika. Konačno, noradrenalin se konvertuje do adrenalina putem enzima PNMT. Enzimi tirozin hidroksilaza, dopamin β -hidroksilaza i PNMT poseduju sličan proteinski domen u svojoj primarnoj strukturi i imaju veliki stepen podudarnosti u kodirajućim sekvencama odgovarajućih gena (Beaulieu i Kelly, 1990).

U katabolizmu adrenalina učestvuju dva enzima (slika 4.) koji su odgovorni za stvaranje šest metabolita uključujući sulfate i glukoronit konjugate (Copper i sar., 1982). Katehol-O-metil transferaza (COMT), citoplazmatički enzim lokalizovan u jetri i bubrezima odgovoran za ekstraneuralni katabolizam, prevodi adrenalin i njegove deaminovane metabolite do O-metil derivata na poziciji 3-hidroksilne grupe kateholnog prstena. S druge strane, monoamino oksidaza (MAO), mitohondrijalni flavoprotein, koji se nalazi u većini tkiva, katališe deaminaciju adrenalina do aldehida koji se dalje redukuju do odgovarajućih alkoholnih metabolita kao što je 3,4- dihidroksifenil glikol (DOPEG) ili se oksidiše do 3,4- dihidroksimendelične kiseline (DOMA).

Oksidativnom deaminacijom O-metil derivata (metanefrina) vodi formiranju vanilmandelične kiseline (VMA) (Eisenhofer i sar., 2004).



Slika 3. Biosinteza kateholamina
(preuzeto sa <http://themedicalbiochemistrypage.org/images/catecholaminesynthesis.jpg>)



Slika 4. Katebolizam adrenalina

2.2. Genotoksičnost hormona

U poslednjih dvadeset godina mnoštvo podataka preplavilo je naučnu i širu javnost o uticaju egzogenih agenasa u mutagenezi. Kako se senzitivnost i specifičnost testova povećavala pretpostavka da se genetička struktura može narušiti jedino sredinskim uticajima počela se dovoditi pod sumnju. Postavlja se pitanje u kojoj meri endogeni agensi mogu doprineti mutagenezi?

Poznato je da hormoni kao endogene supstance ispoljavaju svoju aktivnost uglavnom vezivanjem za odgovarajuće receptore. Međutim, osim svojih fizioloških uloga, neki hormoni pod određenim okolnostima mogu da naruše genetički integritet ćelije indukujući nastanak DNK adukata, oksidativna oštećenja DNK ili poremećaj mitotičkog aparata ćelije (Metzler, 2002). Poznato je da akumulacija genetičkih promena nastalih kao rezultat DNK oštećenja može voditi aktivaciji onkogeni ili inaktivaciji tumor supresor gena (Weinberg, 1996).

Na osnovu kliničkih i eksperimentalnih podataka utvrđeno je da steroidni hormoni igraju značajnu ulogu u nastanku kancera mlečnih žlezda i reproduktivnih organa kod ljudi i životinja (Ulfelder, 1976; Bishun and Williams, 1977). Zbog široke primene steroidnih hormona u hormonskoj terapiji i kontracepciji posebna pažnja se pridala ispitivanjima potencijalnih genotoksičnih efekata pomenutih hormona.

Estradiol, kao najvažniji ženski polni hormon indukuje prekide DNK u humanim limfocitima i MCF-7 ćelijama (Anderson i sar., 1997; Yared i sar., 2002). Mutageni potencijal estradiola potvrđen je praćenjem razmene sestrinskih hromatida (SCE) na humanim limfocitima gde je ispoljen pozitivan efekat (Dhillon i Dhillon, 1995; Ahmad i sar., 2000). U pogledu delovanja estradiola na hromosome, nađeno je da estradiol indukuje numeričke aberacije u humanim limfocitima i u V79 ćelijama kineskog hrčka (Schuler i sar., 1998, Sato i sar., 1992) kao i strukturne aberacije u humanim fibroblastim embriona i epitelnim ćelijama bubrega (Serova i Kerkis, 1974). Međutim, estradiol nije indukovao genske mutacije u sisarskim ćelijama (Richold, 1988; Tsutsui i sar., 2000).

Među sintetičkim estrogenim preparatima, snažan citotoksični efekat ispoljio je dietilstilbestrol (DES) koji pored toga, poseduje kancerogeni i teratogeni efekat (Folkman, 1971). Međutim, dostupni podaci o genetičkoj aktivnosti DES-a u različitim test sistemima su kontradiktorni. DES nije stvarao mutacije u *Salmonella typhimurium* testu, u V79 ćelijama kineskog hrčka i u kulturama embriona Sirijskog hrčka (Glatt, 1979; McCann i sar., 1975). S druge strane, DES je indukovao SCE u humanim fibroblastima i limfocitima (Rudiger i sar., 1979; Hill i Wolff, 1982). Osim pomenutog DES-a, nađeno je da etinil-estradiol i mestranol poseduju genotoksični potencijal indukovanjem visoko značajne frekvence hromozomskih aberacija i razmene sestrinskih hromatida (SCE) u humanim limfocitima kao i visoku frekvencu mikronukleusa u kostnoj srži miševa (Dhillon i sar., 1994; Pinto, 1986; Wheeler i sar., 1986).

Za razliku od estrogena i njegovih sintetičkih produkata testosteron i njegovi estri nisu ispoljili aneugeni i klastogeni efekat (Morita i sar., 1997; Wheeler i sar., 1986). Međutim, indukcija SCE u kulturama humanih limfocita i ćelija kostne srži miševa zabeležena je kod anaboličkog steroida fluoksimesterona (Dhillon i sar., 1995).

Takođe, ispitivani su i ostali steroidni hormoni kao što su kortikosteroidi mada su podaci o njihovom mutagenom delovanju veoma oskudni. Postoje slabi dokazi da sintetički kortikosteroid deksametazon ispoljava klastogeni efekat i povećava frekvencu SCE u humanim limfocitima i ćelijama kostne srži pacova (Singh i sar., 1994).

Osim steroidnih hormona za koje postoji mnoštvo podataka u pogledu njihovog mutagenog delovanja, nađeno je da i nesteroidni hormoni mogu ispoljiti navedeni efekat.

U pogledu genotoksičnog delovanja tiroidnih hormona postoje oprečni rezultati. Primenom *in vitro* Komet testa utvrđeno je da su tiroidni hormoni indukovali DNK oštećenja u humanim limfocitima i spermatozoidima (Djelić i Anderson, 2003; Dobrzynska i sar., 2004). Međutim, tiroksin je ispoljio slab klastogeni efekat praćenjem frekvence SCE u kulturama humanih limfocita, dok je negativan rezultat zabeležen u mikronukleus testu (Djelic i sar., 2006) i u *in vitro* citogenetičkom testu (Djelic i sar., 2007).

Genotoksični potencijal insulina ispitivan je primenom *in vitro* SCE testa i analize mikronukleusa u binuklearnim limfocitima u kojima je insulin dao negativan rezultat (Đelić, 2001). S druge strane, postoje dokazi da insulin može uticati na stvaranje tumora povećanjem DNK sinteze što dovodi do podsticanja mitogeneze (Gupta i sar., 2002).

Melatonin kao prirodni onkostatski faktor i poznati antioksidans nije ispoljio genotoksični efekat u Ames-ovom i Komet testu na CHOK1 ćelijama (Musatov i sar., 1999). Odsustvo genotoksičnosti melatonina uočeno je i primenom *in vitro* SCE testa, ali je zapaženo inhibitorno dejstvo melatonina na proliferaciju humanih limfocita (Vijayalaxmi i sar., 1996).

2.2.1. Genotoksični efekti kateholamina

Još ranih 80-tih godina prošlog veka Moldeus i sar., (1983) su pokazali da dopamin indukuje jednolančane prekide u humanim fibroblastima kože i genske mutacije u ćelijama limfoma miša, ali je ispoljio negativan efekat u Ames-ovom testu, SCE testu na humanim limfocitima, testu polno vezanih recesivno-letalnih mutacija i mikronukleus testu kod miša i pacova. Zbog zaštitnog efekta primenjene superoksid dismutaze (SOD), zaključeno je da genotoksičnost dopamina može biti uzrokovana stvaranjem reaktivnih kiseoničnih vrsta. Da bitnu ulogu u mutagenizi kateholamina imaju kiseonični derivati potvrđeno je u testu genskih mutacija na L5178Y ćelijama limfoma miša u kome su dopamin i adrenalin ispoljili mutageni potencijal (McGregor, 1988).

Takođe, zabeležen je genotoksični potencijal L-dopa, prekusora dopamina. L-dopa je ispoljio mutageni efekat u Ames-ovom testu genskih mutacija i testu genskih mutacija na V79 ćelijama kineskog hrčka (Glatt, 1990). U mikronukleus testu u V79 ćelijama L-DOPA je ispoljio klastogeni efekat u prisustvu Mn^{2+} i Cu^{2+} (Snyder i Friedman, 1998). Halliwell i sar. (1990) su ukazali da dopamin, L-DOPA i 3-O-metil-DOPA mogu uzrokovati modifikacije azotnih baza. Uz to, L-dopa u prisustvu Cu^{2+} može uzrokovati DNK oštećenje

putem reaktivnih kiseoničnih vrsta kao što je hidroksi radikal (Husain i Hadi, 1998).

Noradrenalin, strukturno sličan adrenalinu indukuje jednolančane prekide u srčanim ćelijama mioblasta (Okamoto i sar., 1996). Isto tako, pokazano je da noradrenalin i adrenalin mogu indukovati jednolančane prekide u plazmidnoj DNK u prisustvu ADP-Fe³⁺ (Miura i sar., 2000). Djelić i Anderson (2003) su ukazali da su za delovanje noradrenalina odgovorni reaktivni kiseonični derivati pošto je antioksidant katalaza smanjivala efekte noradrenalina u *in vitro* Komet testu na humanim limfocitima. Genotoksičnost noradrenalina je zabeležena i u humanoj spermi primenom Komet testa, a stepen oštećenja DNK pod uticajem noradrenalina je redukovan u kotretmanu sa katalazom (Dorbzyska i sar., 2004). Slično tome, nađeno je da adrenalin stimuliše stvaranje DNK prekida u testu fluorescentne analize neodmotane DNK (Crespo i Bicho, 1995). Stepem oštećenja DNK pod uticajem adrenalina značajno se smanjuje primenom enzima katalaze i superoksid dismutaze (Crespo i Bicho, 1995). S druge strane, Djelić i sar. (2003) su zabeležili odsustvo klastogenog efekta adrenalina u kulturama cele krvi humanih limfocita.

Navedeni rezultati su u saglasnosti sa otkrićima da adrenalin i drugi kateholamini mogu biti uključeni u redoks ciklus (Genova i sar., 2006) pri čemu nastaju ROS (Masserano i sar., 2000; Levay i sar., 1997). Stvaranje DNK-reaktivnih vrsta odvija se preko oksidacionih produkata kateholamina, hinona i semihinona neenzimatskim putem u prisustvu metala (Levay i sar., 1997; Spencer i sar., 2011) ili putem enzima (Bindoli i sar., 1992) U vezi stim, zabeleženo je da kateholamini stvaraju značajan nivo oksidacionih produkata u organizmu (Dhalla i sar., 1989; Dhalla i sar., 2001).

Stvoreni superoksidni anjon može uzrokovati hromozomske prekide, razmenu sestrinskih hromatida (SCE) u humanim limfocitima *in vitro* (Emerit i sar., 1982), kao i hromozomske aberacije u fibroblastima i jajnim ćelijama kineskog hrčka (Sofuni i Ishidate, 1984; Philips i sar., 1982). S druge strane, sposobnost nastanka DNK adukata putem stvaranja reaktivnih semihinona i hinona je dokazan na različitim humanim ćelijskim linijama (Stokes i sar., 1999; Levay i Bodell, 1993).

S obzirom da kateholamini svoja dejstva ostvaruju preko receptora i podatka da receptor aktivisane signalne kaskade mogu biti uključene u indukciji DNK oštećenja otvorio se novi pristup u pogledu ispitivanja genotoksičnosti kateholamina. Stopper i sar. (2009) su ispitivali genotoksičnost dopamina primenom hvatača slobodnih radikala (2,2,6,6-tetrametilpiperidin-N-oksill - TEMPOL i dimetiltiourea - DMTU) i inhibitora transportera dopamina (DAT) kao što su GBR 12909 i nomifenzin u Komet testu i mikronukleus testu u kulturama sisarskih ćelija. Ispoljeni genotoksičan efekat je redukovano nakon istovremenog tretmana dopaminom i hvatačima radikala ili DAT inhibitorima. S obzirom da dopamin ulazi u ćeliju putem DAT, ovi rezultati ukazuju da dopamin ispoljava genotoksičnost nakon ulaska u ćeliju i stvaranja radikala unutar nje. Do sličnih rezultata su došli Fazeli i sar. (2012) otkrivši da je dopamin ispoljio genotoksičnost nakon transporta u ćeliju i oksidacije putem MAO. Primenjen enzim (MAO) je redukovao nastanak mikronukleusa i oksidativnog DNK adukta 8-oxodG.

Interesantno istraživanje sprovedli su Flint i sar. (2007) ispitujući mehanizame kojima stres hormoni (noradrenalin i adrenalin) utiču na oksidativna DNK oštećenja i na procese popravke u prekanceroznim 3T3 ćelijama. Autori sugerišu da stres hormoni vezivanjem za receptore pokreću seriju kaskadnih puteva. U navedenom istraživanju stres hormoni su povećavali stepen oštećenja DNK i modulirali transkripciju gena, posebno onih koji su odgovorni za odlaganje ćelijskog ciklusa nakon DNK oštećenja. Antagonist β -adrenergičnih receptora propranolol je blokirao genotoksične efekte noradrenalina i adrenalina, što ukazuje da su indukovana DNK oštećenja izazvana hormonima specifična i nezavisna. Rezultati ovih istraživanja svedoče o kompleksnosti molekularnih mehanizama u osnovi genotoksičnih efekata kateholamina. Naime, genotoksični efekti pod uticajem kateholamina nisu prouzrokovani samo njihovim uključivanjem u redoks cikluse praćene stvaranjem ROS, već jednim delom i preko citobiohemijjskih promena nastalih direktnim uticajima na adrenergičke receptore.

2.3. Efedrin

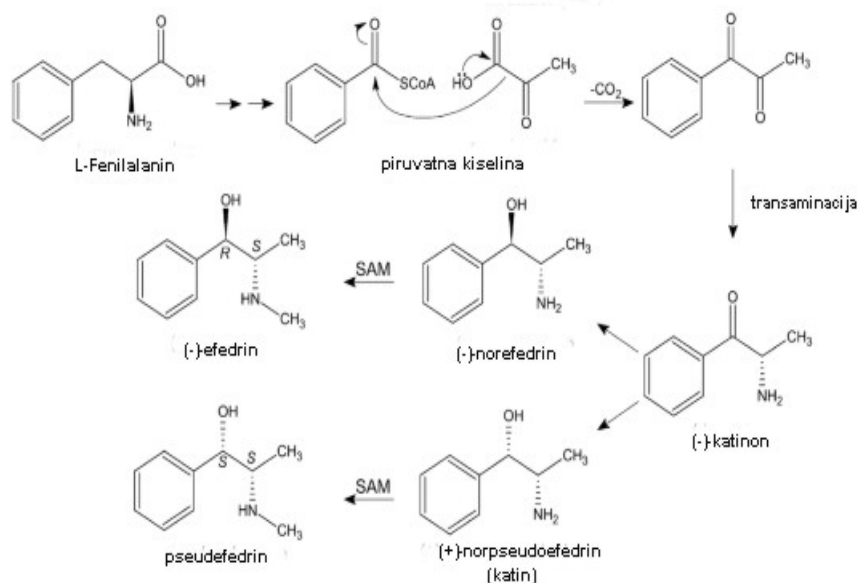
Efedrin je prirodni alkaloid biljaka roda *Ephedra*. Najpoznatija biljka među njima je Ma Huang (*Ephedra sinica*) koja sadrži 1 do 2% efedrina kao najzastupljenijeg alkaloida, dok efedrin i pseudoefedrin čine čak 80% sadržaja alkaloida kod biljaka u osušenom stanju (Haller i sar., 2002; Sheu, 1997). Efedrin je takođe glavni alkaloid belog sleza (*Sida cardifolia*) (Franzotti i sar., 2000). Osim u prirodi, efedrin i slični alkaloidi se mogu dobiti sintetskim putem (slika 5).

U tradicionalnoj kineskoj medicini Ma Huang se već hiljadama godina koristi u lečenju astme, bronhijalnog spazma (Roman, 2004). Takođe, Ma Huang se koristi za lečenje artritisa, povišene temperature, osipa, glavobolje, bolova u zglobovima i kostima i niskog krvnog pritiska (Leung i Foster, 1996).

U zapadnoj medicini efedrin je našao primenu u lečenju astme, prehlada, zapušnja nosne duplje, alergijskog rinitisa (WHO, 1999). Zbog termogenetskih i lipolitičkih osobina dijetetski suplementi koji sadrže ekstrakte efedre se komercijalno koriste kao sredstva za smanjene telesne težine i jačanje sportskih performansi (Josefson, 1995; Shekelle i sar., 2003). Ovi dodaci se često kombinuju sa drugim botaničkim sastojcima kao što su kantarion i karnitin (CANTOKS, 2000). Pretpostavlja se da se broj konzumenata koji koriste efedrin broji milionima.

Čist efedrin alkaloid je dostupan kao farmaceutski preparat i koristi se kao bronhodilatator, vazopresor i sastojak različitih dekondezanata (Pederson i sar., 2001; Kernan i sar., 2000). Druga dostupna forma ovog alkaloida je u vidu dijetetskog suplementa koji sadrži oko 20 mg efedrina (Haller i sar., 2004).

Nakon oralne primene efedrin alkaloidi se veoma brzo apsorbuju. Delovanje efedrina traje oko 1 čas, dok je njegov poluživot između 3-11 sati. Najveći procenat (8-20%) aplikovanog efedrina metaboliše se N-demetilacijom do noradrenalina, dok 4-13% podleže oksidativnoj deaminaciji stvarajući 1-fenilpropan-1,2-diol dalje do benzoične i hipurične kiseline (Wilkinson i Beckett, 1968; Sever i sar., 1975).



Slika 5. Sinteza efedrina i sličnih alkaloida
(preuzeto sa <http://www.e Pharmacognosy.com/2012/07/phenylalanine-derived-alkaloids.html>)

2.3.1. Mehanizmi dejstva efedrina

Hemijska struktura efedrina je slična neurotransmiteru adrenalinu (slika 6). Mehanizam delovanja efedrina zasniva se na strukturnoj sličnosti sa pomenutim kateholaminom.



Slika 6. Poređenje strukturnih formula efedrina i adrenalina
(preuzeto iz Rietjens i sar., 2004, Mol Nutr Food Res)

Efedrin poseduje dva hiralna centra i može postojati u četiri izomerne forme (1*R*,2*S*- i 1*S*,2*R*-efedrin i 1*R*,2*R*- i 1*S*,2*S* pseudoefedrin (Griffith i Johnson, 1995). Poznato je da se dejstva efedrina i sličnih analoga odvijaju putem receptora direktnim intrakcijama sa α – i β – adrenergičkim receptorima. Kao simpatomimetički agonist α i β adrenergičkih receptora efedrin utiče na povećanje srčanog ritma, kontraktilnost, perifernu vazokonstrikciju, bronhodilataciju i stimulaciju CNS-a (Schaneberg i sar., 2003).

Uz direktna dejstva, efedrin ispoljava indirektno simpatomimetičku aktivnost oslobađanjem kateholamina iz nervnih završetaka (Abourashed i sar., 2003). Povećano oslobađanje kateholamina nakon upotrebe efedrina zasniva se na sistemu negativne povratne sprege, koji ima tendenciju da inhibira delovanje i oslobađanje kateholamina. Sistem negativne povratne sprege uključuje oslobađanje adenzina u sinaptičke pukotine i povećanje aktivnosti fosfodiesteraze, što rezultuje u degradaciji cikličnog adenzin monofosfata (cAMP). Smatra se da alkaloidi Efedre 1*R*, 2*S* konfiguracije ispoljavaju direktan efekat na adrenergične receptore dok izomeri 1*S*, 2*S*- i 1*S*, 2*R*- konfiguracije imaju indirektno dejstvo (Vansal i Feller, 1999; Liles i sar., 2006).

Međutim, poslednjih godina efedrin zaokuplja sve veću pažnju zbog ozbiljnih neželjenih efekata povezanih sa upotrebom ovog alkaloida. Neadekvatnom primenom efedrin alkaloida rezultovalo je u više od 1000 slučajeva trovanja, uključujući i smrt u periodu od 1993.-2000. godine u Americi (FDA, 2000). Uočena neželjena dejstva su: ishemijski i hemoragijski udar, psihoze, akutni infarkt miokarda, pa čak i smrt (Bruno i sar., 1993; Haller i Benowitz, 2000; Doyle i Kargin, 1996). Najviše zabeleženih slučajeva trovanja efedrinom vezano je za kardiovaskularni sistem (Samenuk i sar., 2002). Pretpostavlja se da se mehanizam toksičnosti efedrina zasniva na povećanom nivou Ca^{2+} koji menja električnu i kontrakcijsku sposobnost srca (Dunnick i sar., 2007). Efedrin vezivanjem za adrenergične receptore uzrokuje oslobađanje kateholamina, praćenim povećanjem IP_3 koji dovodi do oslobađanja Ca^{2+} jona iz intracelularnih depoa.

Toksičnost ne mora biti ograničena na farmakološka dejstva samih alkaloida. Lee i sar. (2000) ukazali na citoksične efekte efedrina i ekstrakata Efedre na ćelijskim linijama neuroblastoma miševa i humanih hepatoblastoma. Do sličnih rezultata je došao Fukushima (2004) ispitivanjem citotoksičnog

efekta efedrina i ekstraktima Efedre na humanim neuroblastomima i mioblastomima pacova. S druge strane, efedrin nije ispoljio toksični efekat na humanim limfocitima već imunostimulatornu aktivnost što bi moglo imati značaj u imunologiji tumora (Attard i Vella, 2009).

Zanimljivo je da postoje indicije da efedrin i ekstrakti Efedre poseduju antimutagena svojsva. Horikawa i sar. (1994) su ispitivali antimutagenu aktivnost vodenog ekstrakta *E. sinica*. Rezultati su ukazali da pri koncentraciji od 1 mg, ekstrakt ispoljava antimutageno dejstvo. Takođe je zabeležena antitumorska aktivnost efedrina i ekstrakata Efedre na ćelijskim linijama melanoma pacova (Kuznetsova i sar., 2004; Nam i sar., 2003).

Uprkos mnogobrojnim podacima o toksičnim efektima efedrina, podaci o potencijalnom genotoksičnom efektu efedrina su veoma oskudni. U *in vitro* i *in vivo* proučavanjima efedrina i ekstrakata biljke *Ephedra*, efedrin nije ispoljio genotoksični efekat na *Salmonella typhimurium* niti u kulturama ovarijalnih ćelija kineskog hrčka (NTP, 1986). Efedrin nije indukovao oštećenja hromozoma u *in vitro* testu hromozomskih aberacija u sisarskim ćelijama (Hillard i sar. 1998). Odsustvo genotoksičnosti efedrina zabeležili su i Brambilla i Martelli (2009) u testu bakterijskih mutacija i u *in vitro* citogenetičkim proučavanjima.

Na osnovu dostupnih podataka zapaža se da efedrin nije ispoljio genotoksične efekte u nekim testovima na genotoksičnost, ali za sada nije ispitivan u Komet testu. Stoga smo genotoksičnost efedrina ispitivali na humanim limfocitima primenom Komet testa, kao veoma senzitivne metode za detekciju oštećenja DNK. S obzirom da efedrin umesto kateholnog prstena poseduje benzenov prsten, evaluacijom efekata efedrina ispitaćemo značaj kateholne grupe za koju se smatra da je odgovorna za ispoljavanje genotoksičnih efekata pojedinih hormona i neurotransmitera.

2.4. Kateholamini i ROS

Iako kateholamini igraju značajnu ulogu u fiziološkim procesima posebno kod ekstremnih situacija, pod određenim okolnostima mogu ispoljiti toksičan efekat (Dhalla i sar., 2001; Smythies i sar., 2002; Miura i sar., 2000; Djelić i Anderson, 2003).

Dugi niz godina postojalo je uverenje da se osnovni mehanizam toksičnosti kateholamina ostvaruje putem stimulacije adrenergičkih receptora. Najviše podataka o toksičnosti kateholamina vezuje se za kardiotoksičnost. Putem stimulacije adrenergičkih receptora (Adameova i sar., 2009) dolazi do intraćelijskog povećanja Ca^{2+} , oslobađanje energije hidrolizom fosfatnih grupa ATP-a, i subćelijskih promena što vodi oštećenju miokarda, ventrikularnim aritmijama i iznenadnom srčanom zastoju (Dhalla i sar., 2010). Visoke koncentracije kateholamina ostvaruju kardiotoksičan efekat preko povećanja cAMP-a koji utiče na visok nivo Ca^{2+} u ćeliji (Adameova i sar., 2009; Dhalla i sar., 2001).

Međutim, postoji sve više dokaza koji ukazuju da oksidativni procesi igraju značajnu ulogu u ispoljavanju toksičnih efekata kateholamina (Dhalla i sar., 2001; Smythies i sar., 2002; Miura i sar., 2000; Djelić i Anderson, 2003). U prilog tome, zabeleženo je da adrenohrom i reaktivne kiseonične vrste nastaju procesom oksidacije kateholamina u organizmu (Dhalla i sar., 1989; Dhalla i sar., 2001). Oksidacioni produkt adrenalina, adrenohrom, povezan je sa nekoliko patoloških stanja (Roberts i sar., 2003; Rump i Klaus, 1994). Toksični efekti u srcu uglavnom se pripisuju adrenohromu (Behonick sar., 2001) koji se višestruko povećava pri oksido-redukcionim procesima kateholamina izazvanim enzimima ili metalnim jonima (Singal i sar., 1993). Adrenohrom kao visoko toksično ortohinonsko jedinjenje deluje na ćelijsku membranu i stvara poremećaj u katjonskim kanalima i nivou Ca^{2+} (Adameova i sar., 2009) i zajedno sa ROS izaziva toksičan efekat na kardiomiocite (Rump i Klaus, 1994). Adrenohrom deluje i na ćelijski metabolizam inhibiranjem aktivnosti pojedinih enzima (Bindoli i sar., 1992). Aminohromi ispoljavaju toksične efekte i na nervnom tkivu (Bindoli i sar., 1989). Gubitak neurona povezan je sa

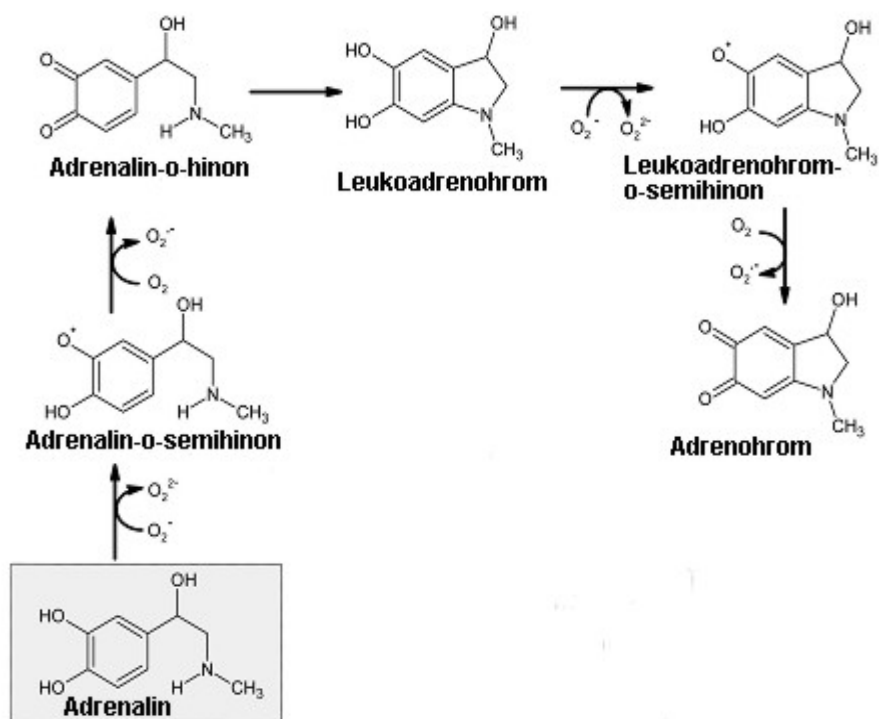
oksidacionim produktima kateholamina i stvaranjem ROS (Levay i sar., 1997; Miyazaki i Asanuma, 2008).

Jedan od izvora ROS i oksidacionih produkata koji mogu oštetiti ćeliju jeste uključivanje adrenalina u redoks cikluse. Autoksidacija adrenalina je alternativni put metabolizma kateholamina i veoma je spora pri fiziološkom pH (Bindoli i sar., 1992; Remião i sar., 2001). U prisustvu metalnih katjona kao što su Cu^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} i Fe^{3+} i enzima ksantin oksidaze, peroksidaze ili tirozinaze oksidacija kateholamina se može znatno ubrzati (Foppoli i sar., 1997; Bindoli i sar., 1992). Oksidativnim metabolizmom adrenalina stvaraju se o-hinoni preko intermedijarnih produkata o-semihinona uz redukciju kiseonika (O_2) do superoksidnog aniona ($\text{O}_2^{\cdot -}$) (slika 7). Stvoreni o-hinon može podleći 1,4 intermolekularnoj ciklizaciji dovodeći do stvaranja nestabilnog leukoaminohroma koji se može brzo oksidovati do odgovarajućih aminohroma (Bindoli i sar., 1989; Remião i sar., 2004). Jedan od krajnjih produkata oksidacije, adrenohrom u prisustvu redukcionog sistema stimuliše oksidaciju adrenalina pri čemu nastaje $\text{O}_2^{\cdot -}$ i H_2O_2 . S druge strane, adrenohrom se može redukovati pomoću superoksidnog radikala do odgovarajućeg semihinona koji reagujući sa kiseonikom može stvoriti superoksid i ponovo adrenohrom (Bindoli i sar., 1990).

Hinoni stvoreni oksidativnim metabolizmom mogu ispoljavati citotoksične, imunotoksične i karcinogene efekte *in vivo*. (Bolton i sar., 2000; Monks i Lau, 1990). Hinon kao visoko reaktivno jedinjenje podleže redukciji do semihinon radikala koji lako ulazi u redoks ciklus vodeći do nastanka ROS. Drugi mehanizam toksičnosti hinona zasniva se na reakciji sa nukleofilima kao što su glutation, proteini ili DNK i formiranju kovalentnih adukata koji mogu značajno uticati na integritet i funkciju ćelije (Bolton i sar., 2000; Remião i sar., 2004). O-hinon stvoren putem redoks ciklusa adrenalina (Bindoli i sar., 1999) u prisustvu glutationa (GSH), može formirati 5-glutationil adrenalin detektovan u živim sistemima pomoću glutation-S-transferaze (Baez i sar., 1997). Katehol tioetri za razliku od nesupstituisanih hinona imaju sposobnost veće redoks aktivnosti (Monks i Lau, 1990), što doprinosi citotoksičnosti ovih adukata (Spencer i sar., 1998). Uz to, GSH konjugati mogu napustiti DNK i stvoriti

apurinska mesta pri čemu nastaju mutacije koje mogu voditi nastaku kancera (Cavalieri i sar., 2002).

Veoma bitnu ulogu u štetnim efektima na ćeliju imaju i ROS nastale tokom redoks ciklusa kateholamina jer je pokazano da antioksidansi umanjuju njihove genotoksične efekte (Djelić i Anderson, 2003; Dorbzyńska i sar., 2004). Za nas je od posebnog značaja učešće ROS u indukciji oksidativnih oštećenja DNK, kao jedan od najčešćih tipova oštećenja humane DNK.



Slika 7. Oksidativni metabolizam adrenalina (modifikovano iz Costa i sar., 2007, Chem Res Toxicol.)

2.4.1. Oksidativna DNK oštećenja

Treba istaći da se ROS normalno stvaraju u ćeliji tokom metaboličkih procesa koji uključuju kiseonik. Postoji čak 60 enzimskih reakcija u kojima se koristi kiseonik prilikom čega nastaju slobodni radikali. ROS se oslobađaju tokom ćelijskog disanja, procesa biosinteze, biodegradacije, biotransformacije ksenobiotika i aktivnosti fagocita. ROS igraju dvojnu ulogu u biološkim sistemima, jer mogu da budu korisni ili štetni za žive sisteme (Valko i sar., 2004). U niskim koncentracijama ROS učestvuju u regulaciji ćelijskih funkcija kao što je nivo Ca^{2+} jona i glukoze homeostaze (Higaki i sar., 2008) endocitnoznih puteva, autofagije (Chen i sar., 2008), a kao sekundarni prenosioci učestvuju u intracelularnim signalnim putevima (Scandalios, 2002; Klein i Ackerman, 2003). Nivo ROS se održava u balansu zahvaljujući mehanizmima antioksidativne odbrane koja ima ulogu da inaktivise ROS ili da prekida reakcije u kojima ove kiseonične vrste nastaju. Među najznačajnije antioksidativne enzime spadaju: superoksid-dismutaza (SOD), katalaza (CAT), glutation-peroksidaza (GSH-Px). Ukoliko dođe do disbalansa između slobodnih radikala i antioksidativne odbrane nastupa stanje koje se naziva oksidativni stres. Naime, nivo ROS se može značajno povećati toliko da ćelija više nije sposobna da se zaštiti i tada ove kiseonične vrste prouzrokuju oštećenja ćelijskih komponenti uključujući proteine, lipide i DNK.

Učešće oksidativnog stresa potvrđeno je kod mnogih bolesti i patoloških stanja uključujući kardiovaskularne bolesti, diabetes, neurološka oboljenja, različite plućne bolesti i zapaljenske procese, kao i sterilitet (Cooke i sar., 2003; Halliwell i sar., 1990; Shen i Ong, 2000). Međutim, neke bolesti mogu biti uzrokovane oksidativnim oštećenjem ćelije, ali isto tako oksidativni stres može biti posledica, a ne uzrok primarnih procesa kod mnogih bolesti. Sem toga, oksidativni stres vezan je za teoriju starenja. Prema ovoj teoriji, u procesu starenja propada i slabi prirodna antioksidativna sposobnost organizma što potencira delovanje ROS i dovodi do oštećenja različitih molekula (Harman, 1956).

ROS su posebno privukle pažnju naučne javnosti kao uzročnici kancerogeneze. Naime, postoje mnogobrojni dokazi koji ukazuju na snažnu

povezanost oksidativnog stresa, genske nestabilnosti i razvoja kancera (Klaunig i Kamendulis, 2004; Toyokuni i sar., 1995; Loft i Poulsen, 1996). Kod normalnih ćelija oksidativne lezije DNK iznose oko 1×10^6 baza, što je vrednost koja je viša nego nivo adukata detektovanih kod ćelijama izloženim mutagenima na osnovu čega možemo zaključiti da endogena oštećenja DNK putem slobodnih radikala imaju izvestan doprinos u razvoju kancera (Loft i Poulsen, 1996). Stoga oksidativna oštećenja mogu biti korisni indikatori rizika za nastanak kancera. Pretpostavlja se da mutacije izazvane oksidativnim oštećenjem putem ROS značajno doprinose kancerogenzi (Guyton i Kensler, 1993). Treba naglasiti da su mutacije u genomu često bezopasne, ali specifične mutacije posebno u delovima odgovornim za regulaciju ćelijskog rasta mogu biti povezane sa inicijacijom kancera. Protoonkogeni tj. geni koji tokom razvika učestvuju u regulaciji ćelijskog procesa mogu mutirati u onkogene i dovesti do ćelijske transformacije. Mnoge vrste kancera imaju mutacije u genu koji kodira p53, protein koji učestvuje u supresiji rasta tumora, aktiviranjem usporavanja progresije kroz ćelijski ciklus. Kada je ćelija oštećena putem ROS, dolazi do usporavanja progresije kroz ćelijski ciklus i sprečava se replikacija pre nego oštećenje bude popravljeno. Ukoliko ćelija nije sposobna da popravi oštećenja uzrokovana ROS, obično se aktivira apoptoza, programirana ćelijska smrt. Poremećene funkcije u ovim kontrolnim tačkama omogućuju razvoj tumora.

Na osnovu navedenog se zaključuje da je redoks ciklus kateholamina od izuzetnog značaja za žive sisteme u kojima nastaju reaktivni hinoni i ROS kao što su H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} (Graham, 1978; Miller i sar., 1990). Sve prisutne modifikacije u DNK molekulu mogu se povećati u *in vitro* ili *in vivo* sistemima stvaranjem ROS. Stepem DNK oštećenja zavisi od reaktivne kiseonične vrste koja je uključena, od mesta nastanka ROS-a kao i prisustva jona metala.

Najznačajnija reakcija u kojoj nastaje $O_2^{\cdot-}$ je oksidacija o-semihinona do o-hinona. $O_2^{\cdot-}$ može sniziti aktivnost nekih enzima uključujući antioksidativne enzime odbrane kao što je katalaza, glutation peroksidaza i NADH dehidrogenaza. Takođe $O_2^{\cdot-}$ može delovati i na ribonukleotid reduktazu koji učestvuje u sintezi DNK (Willcox i sar., 2004). Iako $O_2^{\cdot-}$ nije jak oksidans pomoću superoksid dismutaze $O_2^{\cdot-}$ može biti konvertovan u H_2O_2 u reakciji poznatoj kao Fentonova reakcija sa tranzicijom metalnog jona kao katalizatora pri čemu se produkuje veoma reaktivan hidroksi radikal (OH^{\cdot}).

Vodonik peroksid (H_2O_2) je veoma difuzibilan i može lako proći ćelijsku membranu. Putem katalaze ili glutacion peroksidaze H_2O_2 se metaboliše do vode i kiseonika. H_2O_2 indukuje porast slobodnih jona Ca^{2+} i aktivira poli-(ADP-riboza) polimerazu (PARP) (Herson i sar., 1999; Okamoto, 1985) što vodi ka smrti ćelije. Iako je H_2O_2 najmanje reaktivan molekul među ROS, veoma je opasan zato što se može prevesti do hidrosil radikala (OH^\bullet) u prisustvu jona metala kao što su Fe^{2+} ili Cu^{2+} .

Hidroksi radikal (OH^\bullet) je glavni oksidant odgovoran za oštećenje molekula DNK. OH^\bullet može da reaguje sa svim komponentama DNK tj. sa azotnim bazama i šećerno-fosfatnim lancem. Stopa reakcije OH^\bullet sa azotnim bazama je približno pet puta veća nego sa šećernom komponentom DNK. Proučavanja su pokazala da iako sve četiri baze mogu biti modifikovane putem OH^\bullet , mutacije se uglavnom povezuju sa modifikacijom GC baznog para dok AT bazni par ređe vodi mutaciji (Retel i sar., 1993). Ove mutacije su obično supstitucije baznih parova dok su delecije i insercije baza ređe učestale. Iako postoji preko 100 različitih DNK adukata nastalih reakcijom između OH^\bullet i baze, najpoznatiji među njima je 8-oksoguanin (8-OHdG) nastao kao rezultat modifikacije guanina uzrokujući G→T trasverziju. Kod pojedinih humanih tumora G→T trasverzija spada u najčešće učestale mutacije kod p53 supresor gena (Brash i sar., 1991; Harris i Hollstein, 1993). Mutacije gena p53 nađene su kod čak 50% kancera. U sisarskim sistemima 8-OHdG može indukovati kodon 12 aktivaciju c-Ha-ras ili K-ras onkogeno transverzijom G→T (Behrend i sar., 2003; Wu i sar., 2004). Konverzija guanina u 8-OHdG može delovati na enzime odgovorne za metilaciju citozina i uticati na regulaciju genske ekspresije (Willner, 2004). Osim toga oksidovane baze su neplanarne i mogu promeniti lokalnu strukturu molekula DNK što se može odraziti na tačnost DNK polimeraze u procesu replikacije i voditi nastanku mutacija (Wiseman i Halliwell, 1996).

Iako modifikovane baze predstavljaju najčešći tip oksidativnih oštećenja, OH^\bullet može napasti i šećerno-fosfatni lanac DNK i dovesti do nastanka apurinskih mesta (AP) gde je baza uklonjena u reakciji posredovanoj oksidantima. Jedan od indikatora napada OH^\bullet na lanac DNK je i fragmentacija dezoksiriboze. Jednolančani prekid DNK lanca odvija se preko vodonika

napadom na C-4 poziciju, vodeći do oksidacije šećernog prstena, a zajedno sa drugom oksidacijom šećerne komponente komplementarnog lanca vodi dvolančanom prekidu. Jednolančani prekidi u DNK molekulu mogu se pokazati mutagenim ili čak smrtonosnim za ćeliju (Friedberg i sar., 1995).

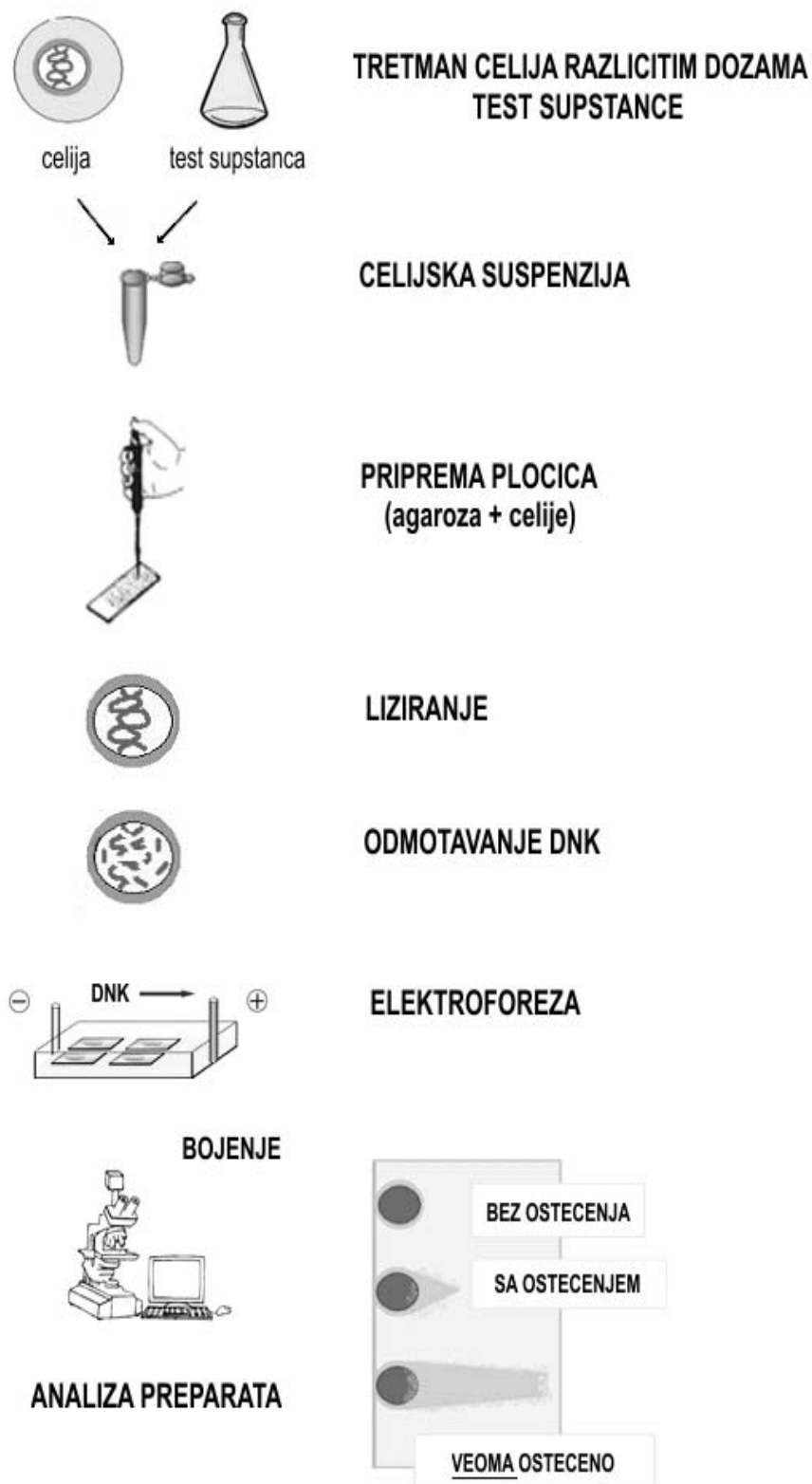
2.4.2. Detekcija genotoksičnih efekata Komet testom

Komet test (test elektroforeze pojedinačnih ćelija, engl. the Comet assay – single cell gel electrophoresis) je ekonomična, brza i jednostavna metoda kojom se detektuju oštećenja DNK u pojedinačnim ćelijama. Oosting i Johanson su 1984. godine razvili ovu mikrogel elektroforetsku tehniku, a 1988. godine Singh i saradnici su modifikovali ovaj test uvođenjem alkalnih uslova tokom elektroforeze. Kod poslednje verzije testa moguće je detektovati jednolančane prekide, apurinska mesta, nekompletna mesta popravke, DNK-protein i DNK-DNK ukrštene veze (engl. crosslinks) u bilo kojom tipu ćelija od koje se može dobiti ćelijska suspenzija.

Osnovni princip Komet testa je otkrivanje oštećenja DNK ćelija praćenjem migracije iste u agaroznom gelu (slika 8.) Prvo se ćelije izlažu testiranoj supstanci određeno vreme, nakon čega se unose u agarozu niske tačke topljenja (engl. low melting point agarose, LMPA) i nanose na predmetna stakla na kojima se već nalazi osušen sloj agaroze koji omogućuje bolju adheziju. Obično se preko toga dodaje još jedan sloj agaroze, da bi se nakon toga pristupilo liziranju u cilju dezintegracija ćelijskih membrana kako bi se uklonili ćelijski i jedarni proteini. U alkalnoj verziji Komet testa, tretmanom sa bazama (obično 10 M NaOH), pri veoma visokom pH ($\text{pH} > 13$) dolazi do denaturacije DNK (engl. DNA unwinding). Nakon toga, pod uticajem električnog polja fragmenti DNK migriraju prema anodi formirajući rep komete. Količina DNK u repu proporcionalna je stepenu DNK oštećenja – što je više DNK u repu utoliko je stepen oštećenja izraženiji. Nakon elektroforeze uzorci se tretiraju neutrališućim puferom kako bi se snizio pH i time izbeglo ometanje prilikom

bojenja sa etidijum bromidom ili nekom drugom fluorescentnom bojom sa visokim afinitetom prema molekulu DNK (npr. sybergreen, DAPI itd.)

U poređenju sa drugim genotoksičnim testovima prednosti ove metode su: visoka senzitivnost u otkrivanju niskog stepena oštećenja DNK; mogućnost otkrivanja genotoksičnosti u odsustvu mitotičke aktivnosti; zahteva mali broj ćelija po uzorku; fleksibilnost; jedostavna primena i relativno kratak period je potreban da bi se obavio eksperiment. Poslednjih dvadesetak godina Komet test je postala jedna od osnovnih metoda koju koriste istraživači u širokom spektru naučnih polja uključujući genetičku toksikologiju, ekogenotoksikologiju, proučavanja popravke DNK i humanog biomonitoringa (Rojas i sar., 1999; Andersson i sar., 2003; Cotelle i Ferard 1999; Collins i Harrington 2002; Marcon i sar., 2003; Albertini i sar., 2000; Moller, 2005).



Slika 8. Ilustrativan prikaz principa Komet testa

2.4.2.1. Evaluacija oštećenja DNK primenom antioksidanasa u Komet testu

Senzitivnost Komet testa i njegova specifičnost se može povećati primenom određenih antioksidanasa pomoću kojih možemo indirektno da utvrdimo mehanizam DNK oštećenja nastalih dejstvom različitih agenasa.

Katalaza je enzim koji se nalazi u skoro svim telesnim organima, ali naročito je prisutna u jetri. Ovaj enzim katališe redukciju H_2O_2 na O_2 i H_2O na osnovu čega je katalaza našla primenu u određivanju da li je mehanizam nastanka oštećenja DNK indukovano reaktivnim kiseoničnim vrstama. Za potrebe našeg istraživanja izabrali smo katalazu jer je u brojnim israživanjima (Djelic i Anderson, 2003; Diaz-Llera i sar., 2002; Cemelli i sar., 2006) potvrđeno da katalaza poseduje antioksidativno dejstvo što je rezultovalo u snižavanju oštećenja DNK izazvanih brojnim jedinjenjima. Katalaza je snižavala efekat DNK oštećenja u humanim limfocitima i u spermi izazvanim estrogenim jedinjenjima što ukazuje da je za njihovo delovanje odgovoran H_2O_2 . Takođe, katalaza je ispoljila zaštitni efekat pri istovremenom tretmanu sa noradrenalinom i tiroidnim hormonima. U našim istraživanjima koja su sprovedena sa katalazom primenjivane su koncentracije od 100 ili 500 IU/ml i pokazalo se da pri ovim koncentracijama dolazi do značajnog smanjenja stepena DNK oštećenja u prisustvu adrenalina ili H_2O_2 . Sama katalaza nije ispoljila genotoksičan efekat pri koncentraciji od 500 IU/ml, čime se isključuje bilo koja prooksidativna aktivnost.

Kvercetin spada u najzastupljeniji flavanoid ljudske ishrane, uz to poznat je i kao čistač visoko reaktivnih vrsta kao što su hidroksil radikali, superoksid radikali i peroksinitriti. Nedavna istraživanja ukazuju da kvercetin smanjuje oksidativna oštećenja u Komet testu. Uočeno je da kvercetin poseduje zaštitnu ulogu protiv oksidativnih oštećenja DNK kao što su jednolančani prekidi u humanim limfocitima *in vitro* i spermi. Antioksidativno dejstvo kvercetina potvrđeno je i na ćelijskim linijama Caco-2, HepG2 i V79 (Aherne i Brien, 2000). U humanim melanoma ćelijskim linijama (HMB-2) kvercetin je redukovao frekvencu hromozomskih aberacija nastalih putem H_2O_2 (Horvatova

i sar., 2005) Uz to, kvercetin je redukovao oštećenja DNK izazvanim estrogenim jedinjenjima i H₂O₂ kao pozitivnom kontrolom u spermi i limfocitima. Postoje istraživanja koja su pokazala da flavanoidi mogu biti genotoksični i mogu delovati kao prooksidanti/antioksidanti u zavisnosti od primenjene doze (Szeto i sar., 2002; Laughton i sar., 1989) Prooksidativni efekat kvercetina je ostvaren na koncentracijama od 100 mM dok je antioksidativni efekat zabeležen na 500 mM. Smatra se da je autoksidacija kvercetina odgovorna za ispoljena prooksidativna svojstva.

2.4.2.2. Evaluacija oštećenja DNK primenom inhibitora reparacije u Komet testu

Osim antioksidanasima, senzitivnost Komet testa može biti povećana uvođenjem inhibitora reparacije kao što su citozin arabinozid (Ara-C) i hidroksiurea (HU). Inkubacija sa inhibitorima reparacije ima za cilj da blokira popravku i uzrokuje nagomilavanje prekida DNK što omogućuje senzitivan način otkrivanja efekata štetnih tretmana ili spontanih DNK oštećenja. Uvođenje inhibitora reparacije u standardni Komet test omogućava otkrivanje šireg opsega genetičkih oštećenja i genotoksičnog potencijala većeg broja genotoksičnih jedinjenja.

Na upotrebljivost navedenih inhibitora reparacije prvi put su ukazali Martin i sar. (1999), kada su zapazili da nekoliko jedinjenja koji indukuju mikronukleuse u MLC-5 ćelijama ispoljavaju povećani efekat jedino u Komet testu u prisustvu inhibitora reparacije HU i Ara-C. Ovi inhibitori reparacije omogućavaju prepoznavanje i isecanje baza u procesu ekscizione reparacije, ali inhibiraju naredni korak, DNK sintezu što rezultuje u akumulaciji jednolančanih prekida. Naime, Ara-C blokira korak popravke tj. DNK sintezu inhibiranjem DNK polimeraze koji se normalno odvija nakon ekscizije baza (base excision repair, BER) ili ekscizije nukleotida (nukleotide excision repair, NER). Inhibitorski efekat Ara-C ostvaruje bilo direktnim delovanjem na DNK polimerazu ili indirektno, ubacivanjem u region popravke DNK čineći ga nestabilnim za dalje delovanje enzima. Pokazalo se da je efikasnost Ara-C povećana dodatkom HU. Hidroksiurea inhibira popravku blokiranjem

ribonukleotid reduktaze i time utiče na replikacione kontrolne tačke što vodi povećanju citotoksičnosti. Na osnovu navedenih efekata primena pomenutih inhibitora reparacije može biti veoma korisna u proučavanjima doprinosa DNK popravke (Speit i Hartman, 1995) u efektima viđenim u Komet testu kao i u određivanju kapaciteta DNK popravke (Cipollini i sar., 2005).

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Istraživanja u oblasti genotoksikologije uglavnom su obuhvatala različite agense životne sredine koji uglavnom nastaju usled snažnog razvoja hemijske i ostalih industrija. Međutim, sve je više podataka da u telima životinja i čoveka postoje i tzv. endogeni mutageni – supstance koje pod određenim okolnostima, mogu da dovedu do oštećenja naslednog materijala.

Među najbolje proučene endogene mutagene ubrajamo steroidne hormone koji ispoljavaju genotoksičan efekat putem metaboličke konverzije fenolne grupe pri čemu se stvaranju reaktivne kiseonične vrste koje mogu da dovedu do kovalentih oštećenja genetskog materijala.

Interesantno je da fenolne grupe nekih nesteroidnih hormona (tireoidni hormoni, adrenalin) i neurotransmitera (dopamin, noradrenalin) mogu da se uključe u redoks cikluse praćene stvaranjem reaktivnih kiseoničnih vrsta i oksidativnog stresa.

Imajući u vidu podatke o potencijalnim genotoksičnim efektima nesteroidnih hormona i značaju prisustva kateholne grupe u ispoljavanja datih efekata ciljevi ove doktorske disertacije definisani su na sledeći način:

- Evaluacija stepena oštećenja DNK u humanim limfocitima tretiranih širokim spektrom koncentracija adrenalina primenom Komet testa
- Evaluacija stepena oštećenja DNK u humanim limfocitima tretiranih širokim spektrom koncentracija efedrina primenom Komet testa
- Praćenje kinetike ispoljavanja oštećenja DNK pod uticajem adrenalina i efedrina u funkciji vremena.
- Utvrđivanje mehanizma potencijalnih genotoksičnih efekata testiranih supstanci primenom antioksidanasa (katalaza i kvercetin).
- Ispitivanje da li dolazi do povećanog ispoljavanja oštećenja DNK u prisustvu inhibitora reparacije.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Materijal

U ovom istraživanju ispitivani su genotoksični efekti adrenalinhidrohlorida (CAS No. 329-63-5, Jugoremedija, Zrenjanin) i efedrinhidrohlorida (CAS No 50-98-6, Sigma, St. Louis, MO, USA). Kao pozitivna kontrola korišćen je vodonik peroksid (100 μ M) (Galafarm, Skoplje, Makedonija), a za negativnu kontrola uzet je sam rastvarač, odnosno PBS (Torlak, Beograd, Srbija).

Za izolaciju humanih limfocita upotrebljen je: RPMI 1640 medijum sa dodatkom L-glutamina i hepesa (PAA Laboratories GmbH), Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare Biosciences AB Švedska) i natrijum heparin (Galenika, Beograd, Srbija).

Za Komet test upotrebljene su sledeće hemikalije: agarozna normalne tačke topljenja (NMPA) (CAS No 9012-36-6), agarozna niske tačke topljenja (LMPA) (CAS No 39346-81-1), EDTA (CAS No 6381-92-6), natrijum hlorid (CAS No 7647-14-5), Tris (hidroksimetil aminometan) (CAS No 77-86-1), kvercetin dihidrat 98% HPLS (CAS No 6151-25-3), katalaza iz goveđe jetre (CAS No 9001-05-2), hidroksiurea (CAS No 127-07-1) i citozin-arabinozid (CAS No 147-94-4). Sve gore navedene hemikalije za Komet test su nabavljene od Sigma Chemical Co., St. Louis, SAD. Dimetil sulfoksid (DMSO) i natrijum hidroksid su nabavljeni od Merck KGaA, Darmstadt, Nemačka. Triton X-100 Plus One naručeni su od Amersham Biosciences, Švedska. Za vizuelizaciju kometa upotrebljen je etidijum-bromid (2 μ g/mL) (Serva, Heidelberg, Nemačka).

4.2. Metode

4.2.1. Izolacija limfocita čoveka i tretman

Prema potrebi istraživanja korišćena je periferna venska krv troje muških osoba starosti ispod 30 godina. Uzorci krvi su heparinizovani nakon čega je pristupljeno procesu izolacije limfocita. Humani limfociti su izolovani naslojavanjem fikola (Ficoll-Paque™ Plus) i centrifugiranjem 15 minuta na 1900 rpm. Limfociti su formirali prsten ispod krvne plazme koja je uklonjena, a ćelije su prikupljene i resuspendovane dva puta u RPMI 1640 medijumu, između ispiranja obavljeno je centrifugiranje 10 minuta na 1800 rpm. Na kraju, supernatant je pažljivo uklonjen, a talog je resuspendovan u RPMI 1640 medijumu.

Uticaj adrenalina na stepen oštećenja DNK evaluiran je u širokom opsegu (tabela 1a) počev od koncentracije koja odgovara fiziološkoj vrednosti kod čoveka ($0,0005 \mu\text{M}$) do $100\times$ veće vrednosti od maksimalne terapijske doze ($500 \mu\text{M}$) u različitim vremenskim intervalima na 37°C (tabela 1). Koncentracije adrenalina (300 , 50 i $1 \mu\text{M}$) sa prihvatljivom ćelijskom vijabilnošću (preko 90% u „Trypan Blue” testu) korišćena su za dalja ispitivanja. Izolovani limfociti su tretirani sa odabranom koncentracijom adrenalina ($300 \mu\text{M}$) i antioksidansom katalazom (CAT) u dve različite koncentracije (100 IU/mL i 500 IU/mL) u vremenskim intervalima od 15 minuta ili 1 čas. Isti postupak je ponovljen sa drugim antioksidansom kvercetinom (QUE) u koncentracijama od $100 \mu\text{M}$ i $500 \mu\text{M}$.

Takođe, ispitan je efekat efedrina na stepen oštećenja DNK u širokom spektru koncentracija u različitim vremenskim intervalima na 37°C (tabela 2). Nakon toga, odabrane koncentracije efedrina od 300 , 50 i $1 \mu\text{M}$ inkubirane su na 37°C u vremenskom intervalu od 15 minuta ili 1 čas sa inhibitorima reparacije citozin arabinozidom (AraC) i hidroksiureom (HU). Prema tome, obavljen je

zajednički tretman limfocita sa pojedničnim koncentracijama efedrina i inhibitorima reparacije (20 μM AraC + 2000 μM HU), a zatim smo upotrebili iste koncentracije efedrina sa inhibitorima reparacije viših koncentracija (40 μM AraC + 4000 μM HU). Isti tretman je obavljen bez prisustva inhibitora reparacije.

Tabela 1. Prikaz primenjenih koncentracija adrenalina sa različitim vremenskim intervalima inkubacije u Komet testu

SUPSTANCE	KONCENTRACIJE	VREME INKUBIRANJA				
	(μM)	(sati)				
Negativna kontrola, PBS	/	0.25	1	2	4	24
Adrenalin	0.0005	0.25	1	/	/	/
Adrenalin	0.001	0.25	1	/	/	/
Adrenalin	0.01	0.25	1	2	4	24
Adrenalin	0.2	0.25	1	/	/	/
Adrenalin	1	0.25	1	2	4	24
Adrenalin	5	0.25	1	2	4	24
Adrenalin	50	0.25	1	2	4	24
Adrenalin	150	0.25	1	/	/	/
Adrenalin	300	0.25	1	/	/	/
Adrenalin	500	0.25	1	/	/	/
Pozitivna kontrola, H_2O_2	100	0.25	1	2	4	24

Tabela 1a. Prikaz primenjenih koncentracija adrenalina koje odgovaraju određenim dozama

DOZE	KONCENTRACIJE ADRENALINA(μ M)
Fiziološki nivo kod čoveka	0.0005
50x fiziološki nivo	0.001
500x fiziološki nivo	0.01
Minimalna terapijska doza u humanoj medicini	0.2
Srednja terapijska doza	1
Maksimalna terapijska doza	5
10x maksimalna terapijska doza	50
30x maksimalna terapijska doza	150
60x maksimalna terapijska doza	300

Tabela 2. Prikaz primenjenih koncentracija efedrina sa različitim vremenskim intervalima i inkubacije u Komet testu

SUPSTANCE	KONCENTRACIJE	VREME INKUBIRANJA				
	(μ M)	(sati)				
Negativna kontrola, PBS	/	0.25	1	2	4	24
Efedrin	0.0005	0.25	1	/	/	/
Efedrin	0.001	0.25	1	/	/	/
Efedrin	0.01	0.25	1	2	4	24
Efedrin	0.2	0.25	1	/	/	/
Efedrin	1	0.25	1	2	4	24
Efedrin	5	0.25	1	2	4	24
Efedrin	50	0.25	1	2	4	24
Efedrin	150	0.25	1	/	/	/
Efedrin	300	0.25	1	/	/	/
Efedrin	500	0.25	1	/	/	/
Pozitivna kontrola, H ₂ O ₂	100	0.25	1	2	4	24

4.2.2. Određivanje broja i vijabilnosti ćelija

Manualno ćelijsko brojanje i procena ćelijske vijabilnosti obavljani su „Trypan Blue” testu u hemocitometru. 20 μ L ćelijske suspenzije je pomešano sa 20 μ L 0.4% boje Tripan plavo (Sigma) i inkubirano 5 min na sobnoj temperaturi, nakon čega je uzeto 10 μ l obojene suspenzije i stavljeno u komoru (Neubauer). Brojanje ćelija je izvršeno pod svetlosnim mikroskopom (Olympus, CX21) na uvećanju 40 \times . Da bi israživanje Komet testom bilo validno, neophodno je da vijabilnost ćelija bude najmanje 80%, dovoljno da se izbegnu citotoksični artefakti u testu (Henderson i sar. 1998).

4.2.3. Komet test

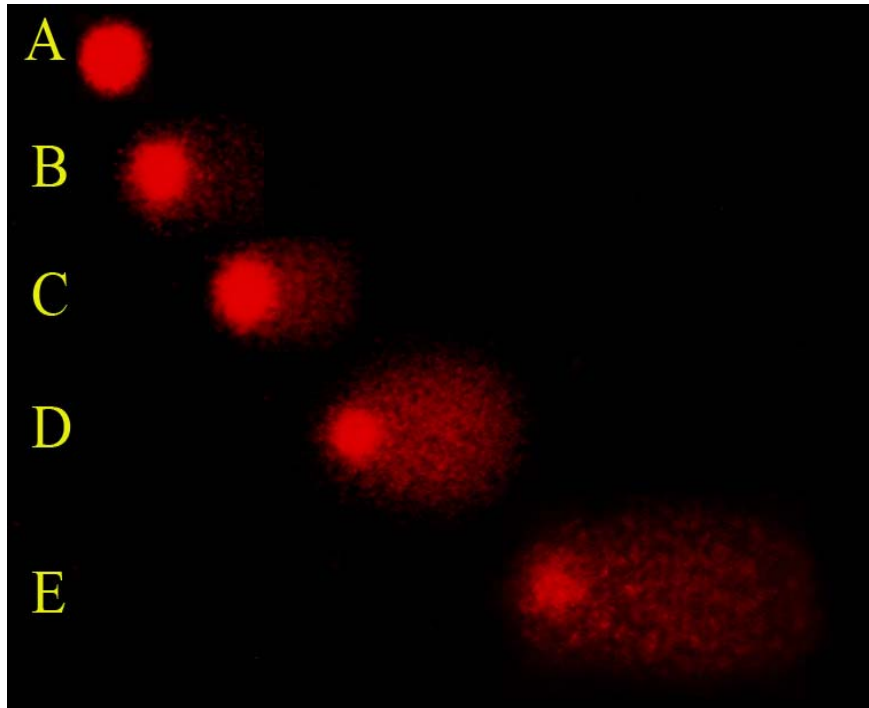
Bazni Komet test je obavljen prema Sing-u i sar., (1988) i Tice i sar., (1991) uz neznatne modifikacije. Pre izvođenja eksperimenta mikroskopske pločice su premazane 1% agarozom agarozom normalne tačke topljenja (NMA) (Sigma, St. Louis, MO) i ostavljene na sobnoj temperaturi najmanje 48 sati kako bi se agaroz osušila. Suspenzije limfocita su inkubirane u rastvoru PBS sa različitim koncentracijama testiranih supstanci. Nakon tretmana, ćelijske suspenzije su centrifugirane na 2000 rpm, 5 min., i dobijeni ćelijski talog je pomešan sa jednakom količinom 1% agaroze niske tačke topljenja (LMPA) (Sigma, St. Louis, MO), a zatim naslojen na prethodno premazane mikroskopske pločice. Pločice se drže 5 minuta na 4°C kako bi agarozni sloj očvrstnuo, a nakon toga na pločice se nasloj treći sloj agaroze (0.5% LMPA). Nakon polimerizacije gela, pločice se potapaju u lizirajući rastvor (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10) i ostave preko noći na 4°C. Sutradan, pločice se postavljaju u kadicu za horizontalnu gel elektroforezu i potapaju u hladni alkalni elektroforetski pufer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH \geq 13) da bi se omogućila denaturacija DNK. Nakon 30 min obavljena je elektroforeza pod sledećim uslovima: 25 V, 300 mA, 30 min. Svi navedeni

koraci su obavljani u tamnoj prostoriji kako bi se sprečilo dodatno oštećenje DNK pod uticajem UV zračenja. Nakon završene elektroforeze pločice se ispiraju neutrališućim rastvorom (0,4 M Tris baza, pH 7.5) tri puta po 5 min. Pločice se zatim fiksiraju u hladnom metanolu, osuše na 55-60°C i odlažu na suvom i do trenutka analize kometa. Kako bi se omogućila vizualizacija ćelija, osušene pločice se najpre potope 15 min u ledeno hladnu destilovanu vodu i zatim se svaka pločica boji sa 50 μ L ethidijum bromida (20 μ g/mL).

4.2.4. Analiza podataka

Ćelije su posmatrane na Olympus BX 50 mikroskopu (Hamburg, Nemačka) korišćenjem fluorescentne svetlosti, talasne dužine 510-560 nm. Kod svakog donora i za svaku pojedinačnu koncentraciju analizirano je 100 nasumično odabranih ćelija tj. po 50 ćelija po pločici jer za svaku eksperimentalnu tačku postoje 2 pločice.

Za kvalitativnu procenu ćelije su svrstane u pet kategorija (slika 9.) u zavisnosti od stepena DNK oštećenja : (A) bez oštećenja, <5%; (B) nizak nivo oštećenja, 5–20%; (C) srednji nivo oštećenja, 20–40%; (D) visok nivo oštećenja 40–95%; (E) potpuno oštećenje >95% (Anderson i sar., 1994). Kako bismo izvršili semi-kvantitativnu analizu podataka, vrednost DNK oštećenja sračunat i izražen preko TCS vrednosti (eng. Total Comet Scor)., pri čemu je $TCS = 2 \times B + 3 \times C + 4 \times D + 5 \times E$, gde B do E označavaju procenat ćelija u okviru gore navedenih kategorija.



Slika 9. Različiti stepeni DNK oštećenja na humanim limfocitima u Komet testu

A) neoštećena ćelija B) slabo oštećena ćelija C) srednje oštećena ćelija C) viskoko oštećena ćelija E) totalno oštećena ćelija (preuzeto iz Radakovic i sar., 2011, Acta Vet)

4.2.3. Statistička analiza

Statistička obrada podataka je izvršena pomoću analize varijanse (ANOVA) praćene Tukey multiplim testom. Vrednost total komet skora (TCS) je data kao srednja vrednost \pm SEM. *P* vrednost od najmanje ≤ 0.05 se smatra statistički značajnom.

5. REZULTATI

5.1. Komet test kod limfocita čoveka izloženih dejstvu adrenalina

Vijabilnost limfocita tretiranih adrenalinom u testu tripan plavim je bila veća od 90% čime su se stekli uslovi za dalja istraživanja. Analiza DNK oštećenja primenom Komet testa izvršena je na izolovanim humanim limfocitima izloženim širokom spektru koncentracija adrenalina (0.0005 μ M do 500 μ M) u vremenskim intervalima od 15, 60, 120, 240 minuta i 24 časa. Oštećenja DNK su predstavljena preko TCS vrednosti. Radi ispitivanja senzitivnosti testa korišćen je 100 μ M vodonik peroksid (H₂O₂) kao pozitivna kontrola koja je u svakom tretmanu pokazala visoko značajno oštećenje DNK ($p < 0.001$) u odnosu na negativna kontrolu (PBS).

Efekti adrenalina na oštećenja DNK u humanim limfocitima nakon 15 min. su sumirani u tabeli 3 i grafikonima 1 i 2. Uočava se trend povećanja DNK oštećenja sa povećanjem koncentracije testiranog kateholamina. Adrenalin je ispoljio najizraženiji efekat u oštećenju DNK nakon 15 minutnog tretmana, jer su sve koncentracije izuzev najniže (0.0005 μ M, fiziološki nivo) statistički značajno indukovale DNK oštećenje u odnosu na netretirane ćelije ($p < 0.01$, $p < 0.001$). Procenat ćelija bez oštećenja u tretmanu adrenalina bio je u opsegu od 27% - 44%. Posebno su tretmani višim koncentracijama adrenalina (50 μ M - 500 μ M) rezultovali u povećanom broju ćelija sa visokim stepenom DNK oštećenja - vrednost TCS je bila 1.4 do 1.9 puta veća od TCS vrednosti kontrole.

Analiza DNK oštećenja adrenalina nakon 60 min. je predstavljena je u tabeli 3 i na grafikonima 3 i 4. Koncentracije adrenalina od 0.001 μM do 1 μM nisu statistički značajno indukovale DNK oštećenja ($p>0.05$) u poređenju sa istim koncentracijama nakon kraćeg vremenskog intervala. Značajno povećanje TCS vrednosti tj. oštećenja DNK je uočeno pri koncentracijama adrenalina od 5 μM (maksimalna terapijska doza) do 300 μM ($p<0.05$), gde je procenat neoštećenih ćelija bio ispod 46%. Uočava se da najviša koncentracija adrenalina (500 μM) blago, ali statistički značajno oštećenja DNK u limfocitima ($p<0.05$), verovatno da je došlo do ukrštenih veza (engl. crosslinks) što je uzrokovalo smanjenje stepena migracije DNK.

Efekti adrenalina na stepen DNK oštećenja u humanim limfocitima nakon 120 min. su predstavljeni u tabeli 3 i grafikonima 5 i 6. Nakon 120 minuta jasno se uočava veći nivo oštećenja DNK humanih limfocita sa porastom doze adrenalina. Koncentracije adrenalina od 0.01 i 1 μM indukovala su blaga oštećenja DNK, ali ne statistički značajna ($p>0.05$) u odnosu na kontrolu. Visoko značajna razlika u nivou DNK oštećenja ($p<0.001$) je uočena u tretmanima adrenalinom od 50, 150 i 300 μM u odnosu na netretirane ćelije. Na višim koncentracijama adrenalina (50 μM – 300 μM), 36% - 55% humanih limfocita nije pretrpelo DNK oštećenje. Koncentracija adrenalina od 300 μM je ispoljila najveći efekat, što se ogleda u najvećem broju ćelija sa jakim oštećenjem (21%, klasa D i E) u odnosu na ostale grupe. S druge strane, koncentracija adrenalina od 5 μM (maksimalna terapijska doza) dovela je do nešto slabijeg oštećenja DNK, koje je ipak bilo statistički značajno u odnosu na negativnu kontrolu ($p< 0.05$).

U tabeli 3 i na grafikonima 7 i 8 prikazan je efekat adrenalina nakon 240 min. na limfocitima čoveka. Adrenalin je ispoljio sličan efekat zavisno od doze kao i pri upola kraćem tretmanu. Tretamni adrenalinom od 0.01 i 1 μM nisu značajno uticale na migraciju DNK ($p>0.05$) u odnosu a netretirane ćelije. Koncentracije adrenalina od 5 μM do 300 μM su značajno indukovale oštećenje DNK ($p<0.001$). Posebno su veće koncentracije adrenalina (150 μM i 300 μM) indukovale jako oštećenje u humanim limfocitima (17%, klasa D i E).

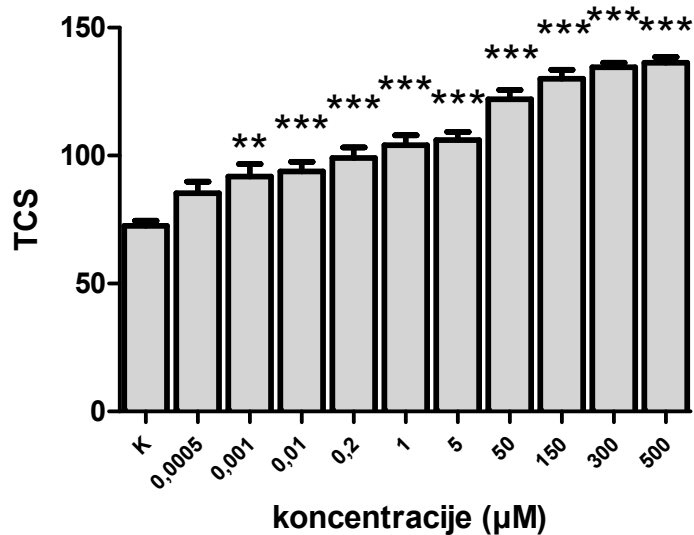
Efekat adrenalina na DNK oštećenja adrenalina u humanim limfocitima nakon 24 sata su predstavljeni u tabeli 3 i na grafikonima 9. i 10. Adrenalin je ispoljio najslabiji efekat posle jednodnevnog tretmana, jer su samo visoke koncentracije adrenalina od 150 i 300 μM indukovala značajno oštećenje DNK ($p < 0.001$). Tretmani visokim koncentracijama adrenalina (150 i 300 μM) uzrokovala su smanjenje procenta neoštećenih ćelija za 8% i 11.3%, a naročito se povećao procenat ćelija sa oštećenjem u klasi C i D.

Tabela 3. Analiza DNK oštećenja u limfocitima čoveka nakon različitog vremena tretmana adrenalinom.

KONCENTRACIJE	VREME INKUBACIJE (X±SE)				
	0.25 h	1 h	2 h	4 h	24 h
Negativna kontrola PBS	72.50±2.062	71.17±2.056	60.50±0.563	60.83±3,971	57.17±3,545
Adrenalin					
0,0005	85.25±4.516	81.17±6.096	/	/	/
0,001	93.75±3.860**	91.50±5.182	/	/	/
0,01	91.75±4.990***	94.83±6.720	61.50±0.719	61.17±1.276	56.33±0.881
0,2	99.00±4.143***	96.67±5.352	/	/	/
1	104.50±3.979***	99.17±6.353	63.33±1.229	69.67±2.936	57.50±0.718
5	106.00±3.317***	102.20±7.115*	72.33±2.616*	75.33±3.048***	60.33±1.054
50	122.00±3.742***	105.30±6.365*	75.83±2.301**	92.50±2.680***	61.00±1.366
150	130.00±3.582***	106.20±11.58*	94.83±1.759**	104.50±2.778***	64.83±1.302***
300	134.50±1.848***	119.00±9.471*	108.20±1.249**	116.70±1.626***	66.67±1.116***
500	136.30±2.287***	02.50±2.349*	/	/	/
Pozitivna kontrola H₂O₂	199.0±8.010***	188.0±1.025***	195.50±7.279***	189.30±4.595***	189.30±4.344***

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. negativna kontrola

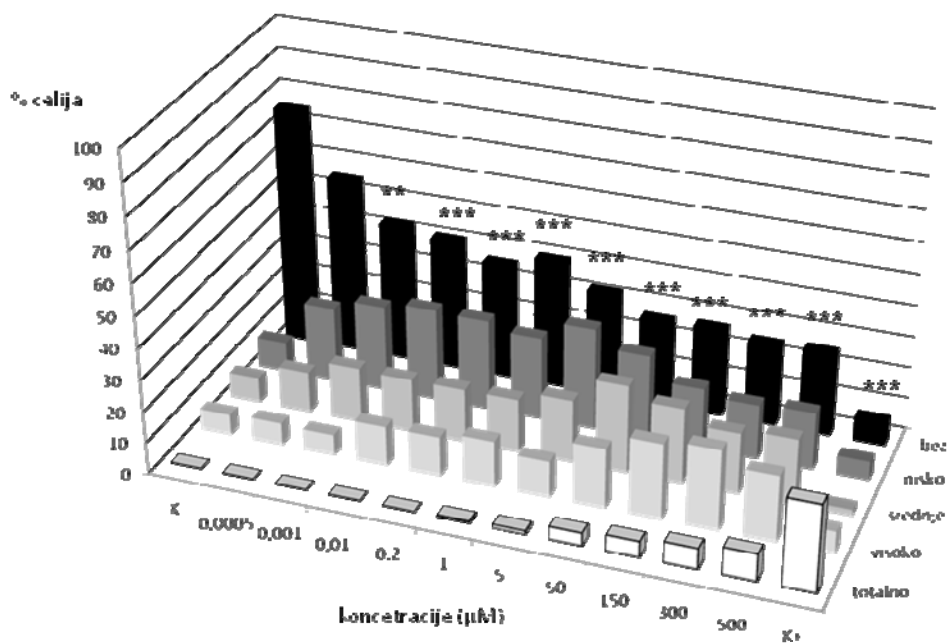
Grafikon 1. Efekat adrenalina na DNK oštećenje u limfocitima čoveka nakon 15 minuta.



K – negativna kontrola

** p < 0.01, *** p < 0.001 vs. negativna kontrola

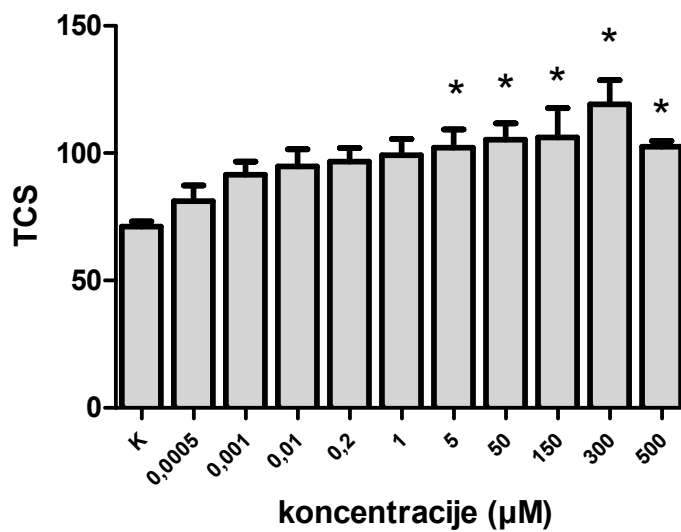
Grafikon 2. Distribucija klasa kometa nakon 15 minuta izlaganja adrenalinom.



K – negativna kontrola, K+ - pozitivna kontrola

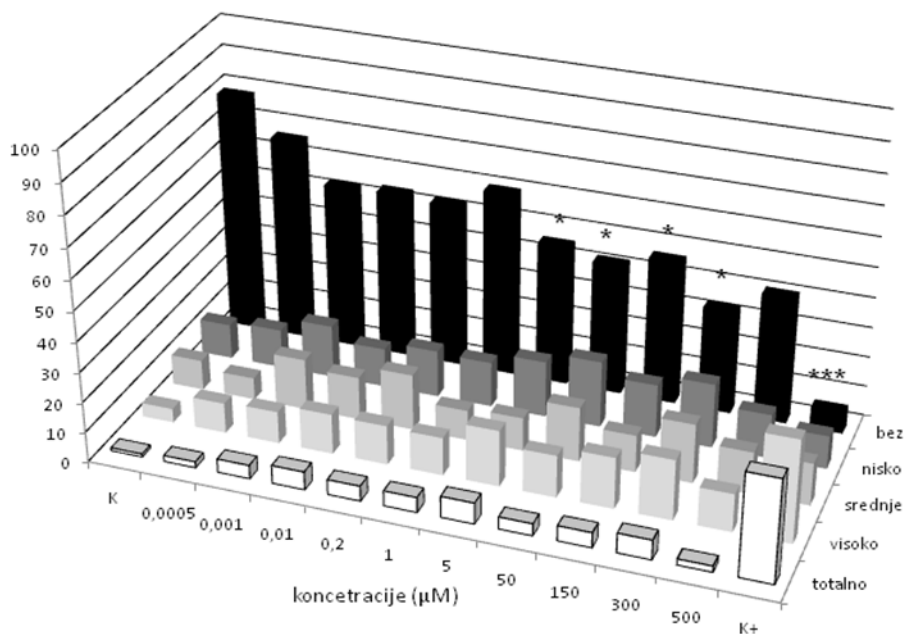
p < 0.01, *p < 0.001 vs. negativna kontrola

Grafikon 3. Efekat adrenalina na DNK oštećenje u limfocitima čoveka nakon 60 minuta.



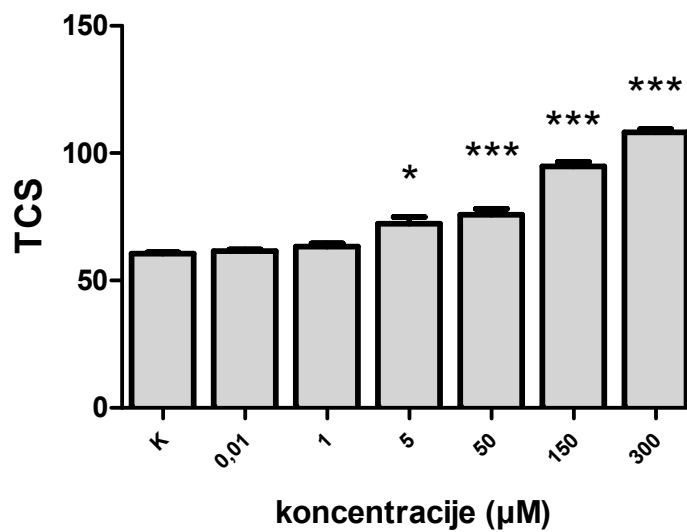
K – negativna kontrola
 * $p < 0.05$ vs. negativna kontrola

Grafikon 4. Distribucija klasa kometa nakon 60 minuta izlaganja adrenalinom



K – negativna kontrola, K+ - pozitivna kontrola
 * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. negativna kontrola

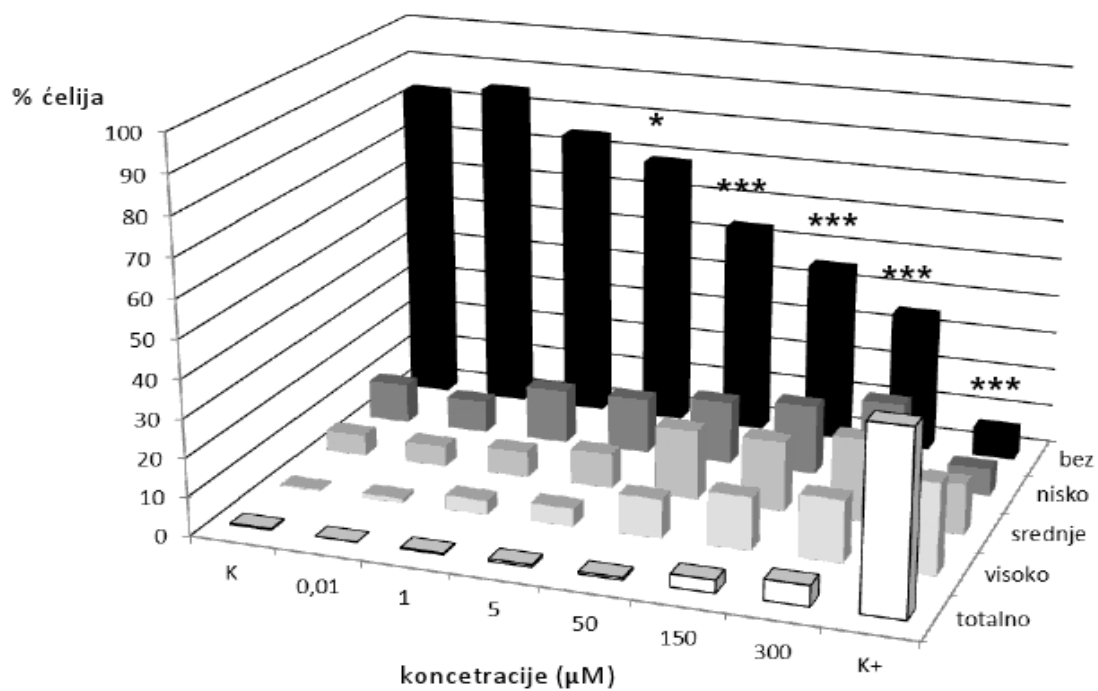
Grafikon 5. Efekat adrenalina na DNK oštećenje u limfocitima čoveka nakon 120 minuta.



K – negativna kontrola

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. negativna kontrola

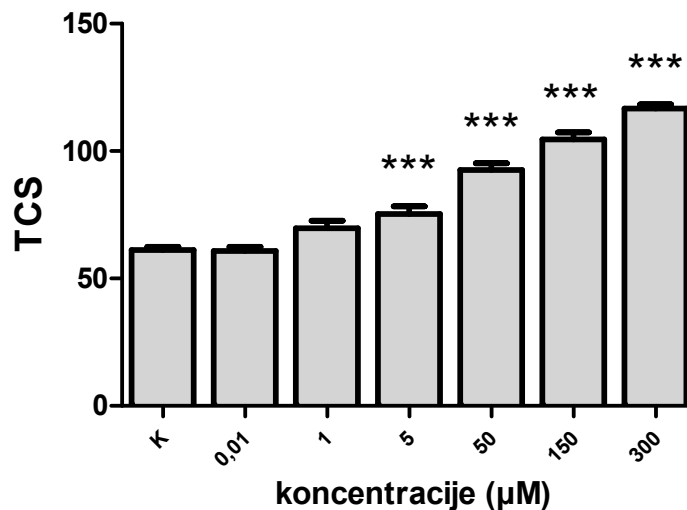
Grafikon 6. Distribucija klasa kometa nakon 120 minuta izlaganja adrenalinom



K – negativna kontrola, K+ - pozitivna kontrola

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ vs. negativna kontrola

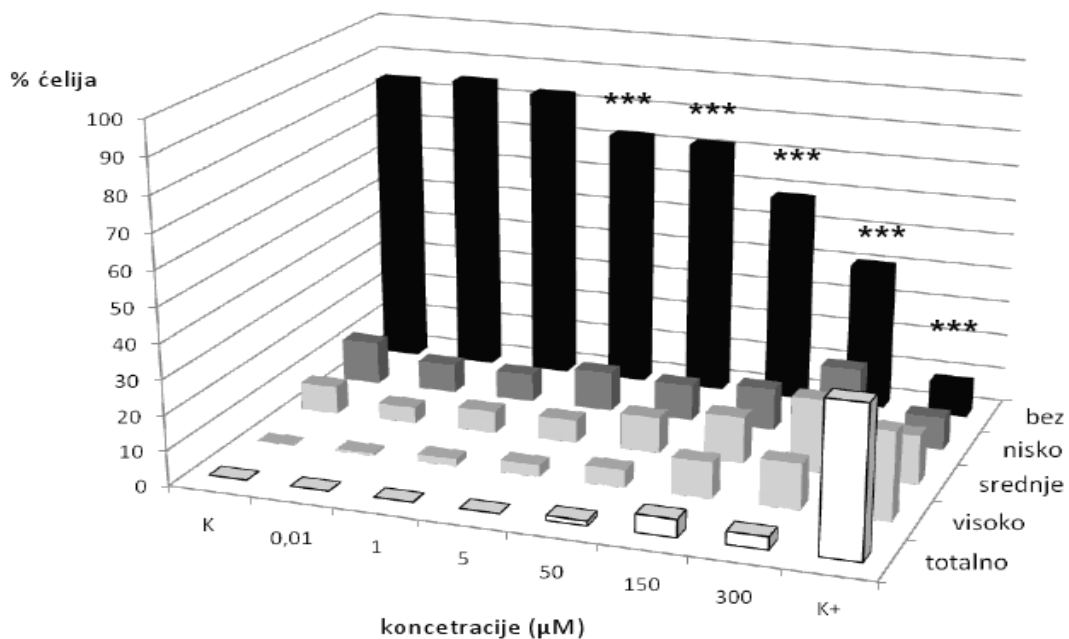
Grafikon 7. Efekat adrenalina na DNK oštećenje u limfocitima čoveka nakon 240 minuta.



K – negativna kontrola

***p < 0.001 vs. negativna kontrola

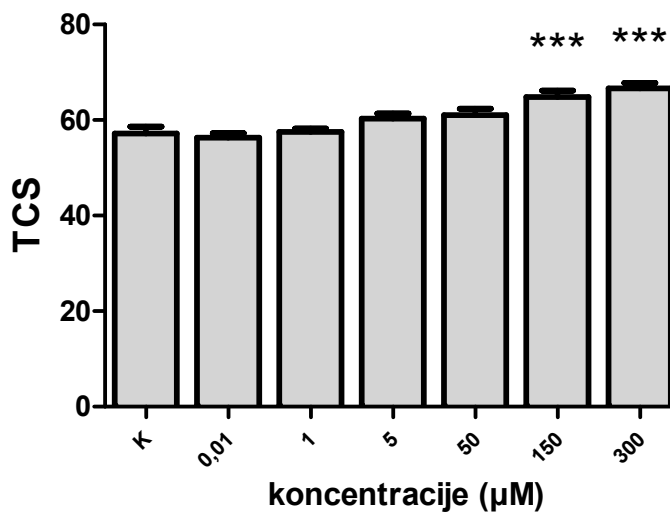
Grafikon 8. Distribucija klasa kometa nakon 240 minuta izlaganja adrenalinom.



K – negativna kontrola, K+ - pozitivna kontrola

***p < 0.001 vs. negativna kontrola

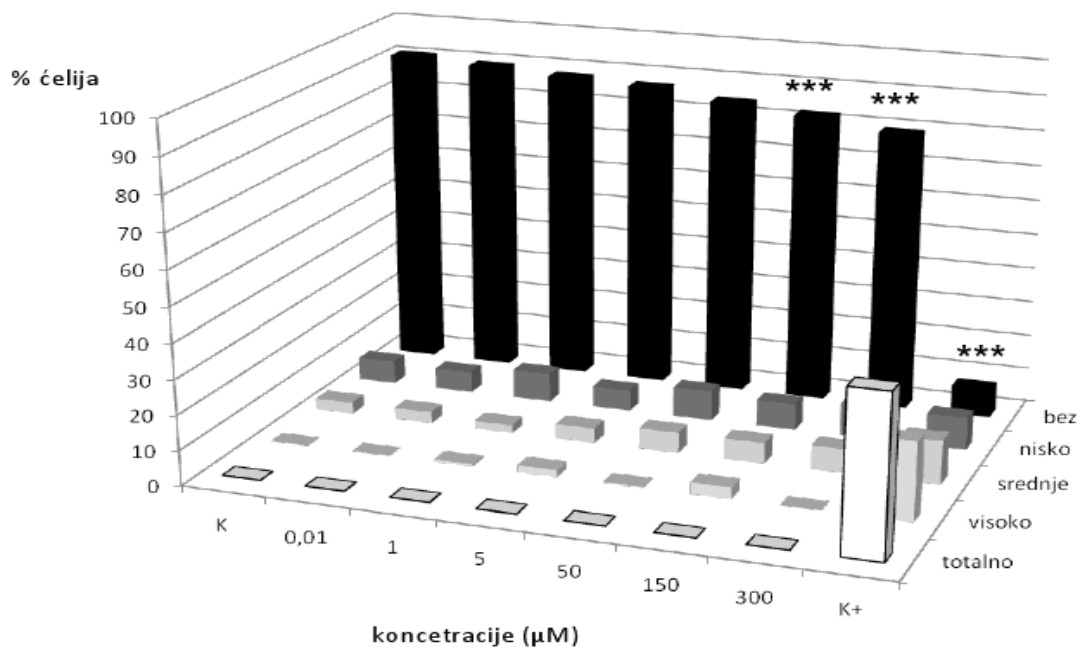
Grafikon 9. Efekat adrenalina na DNK oštećenje u limfocitima čoveka nakon 24 sata.



K – negativna kontrola

***p < 0.001 vs. negativna kontrola

Grafikon 10. Distribucija klasa kometa nakon 24 sata izlaganja adrenalinom



K – negativna kontrola, K+ - pozitivna kontrola

***p < 0.001 vs. negativna kontrola

5.2. Efekti antioksidanasa na oštećenja DNK izazvana adrenalinom

Kako bismo ispitivali moguće učešće ROS u ispoljavanju genotoksičnog efekta adrenalina uveli smo u Komet test antioksidanase katalazu i kvercetin. Efekti katalaze na indukciju DNK oštećenja pod dejstvom adrenalina nakon 15 minuta predstavljeni su u tabeli 4 i na grafikonima 11 i 12. Očekivano, humani limfociti su pretrpeli najveće oštećenje DNK ($p < 0.001$) u tretmanu sa vodonik peroksidom ($100 \mu\text{M}$) kao pozitivnom kontrolom. Odabrana doza adrenalina od $300 \mu\text{M}$ je značajno indukovala DNK oštećenja u humanim limfocitima ($p < 0.001$). U tretmanu sa adrenalinom 69.3% ćelija je pretrpelo DNK oštećenje. Nivo DNK oštećenja u humanim limfocitima je značajno smanjen ($p < 0.001$) dodatkom katalaze (100 IU / mL) u odnosu na tretman samim adrenalinom. Procenat oštećenih limfocita tretiranih sa adrenalinom i katalazom je smanjen i iznosio je 44%. Visoko značajna razlika ($p < 0.001$) u oštećenju DNK se uočava i u ko-tretmanu adrenalina i više koncentracije katalaze 500 IU / mL u odnosu na efekat samog adrenalina. Uočava se doza efekat katalaze jer je pri višoj koncentraciji (500 IU/mL) antioksidant uzrokovao još uočljivije smanjenje oštećenih ćelija (38.6%).

Efekti kvercetina na DNK oštećenja adrenalina nakon 15 minuta predstavljeni su u tabeli 4 i na grafikonima 11 i 13. Kvercetin je takođe ispoljio zaštitni efekat, jer je u tretmanu sa adrenalinom značajno smanjio oštećenje DNK u humanim limfocitima ($p < 0.001$). Kvercetin ($100 \mu\text{M}$) je redukovao broj ćelija sa oštećenjem sa 69.3% na 51.3%. Značajno smanjenje DNK oštećenja ($p < 0.001$) je uočeno i kod tretmana adrenalina sa kvercetinom veće koncentracije ($500 \mu\text{M}$), procenat oštećenih ćelija je smanjen za još 7.3%.

U tabeli 5, grafikonu 14. i 15. prikazan je efekat katalaze na DNK oštećenja adrenalina nakon 60 minuta. Tretman sa adrenalinom ($300 \mu\text{M}$) je

značajno povećao oštećenje DNK u humanim limfocitima ($p < 0.001$) u odnosu na netretirane ćelije. Humani limfociti su u tretmanu sa adrenalinom pretrpeli oštećenje od 66.6%. Pozitivna kontrola (H_2O_2 , 100 μM) je uzrokovala uočljivo oštećenje DNK (83%). Nakon 60 min antioksidans katalaza (100 IU/mL) je značajno snizila ($p < 0.05$) oštećenje DNK uzrokovano adrenalinom, smanjenjem broja oštećenih ćelija (41.6%). Trend značajnog smanjenja ($p < 0.01$) DNK oštećenja sa povećanjem koncentracije katalaze (500 IU/mL) uočen i je nakon dužeg tretmana, jer je broj broj oštećenih ćelija je smanjen za još 5%.

Efekti kvercetina na DNK oštećenja u humanim limfocitima u tretmanu sa adranalinom nakon 60 min. su prikazani u tabeli 5 i na grafikonima 14 i 16. Tretman adrenalina sa kvercetinom (100 μM) je pokazao trend smanjenja DNK ćelija u humanim limfocitima, ali nije dostignuta statistička značajnost ($p > 0.05$). Međutim, na većoj koncentraciji kvercetin (500 μM) je značajno smanjio oštećenje DNK u humanim limfocitima ($p < 0.01$). Procenat limfocita sa oštećenjem DNK dodatkom kvercetina je značajno smanjeno (35.6%).

Tabela 8. Efekat katalaze i kvercetina naspram DNK oštećenja adrenalina u limfocitima čoveka nakon 15 minuta.

TRETMAN	X ± SE	S.D.
Negativna kontrola PBS	64.00±1.571	3.847
ADR 300µM	126.30±1.783 ^{***}	4.367
ADR 300µM + 100U/ml CAT	92.33±1.256 ^{***}	3.077
ADR 300µM + 500U/ml CAT	86.17±1.797 ^{***}	4.401
ADR 300µM + 100 µM QUE	98.17±1.797 ^{***}	4.401
ADR 300µM + 500 µM QUE	91.17±1.078 ^{***}	2.639
Pozitivna kontrola H ₂ O ₂	182.50±4.193 ^{***}	10.27

ADR – adrenalin, CAT- katalaza, QUE- kvercetin

. ***p<0.001 vs. adrenalin

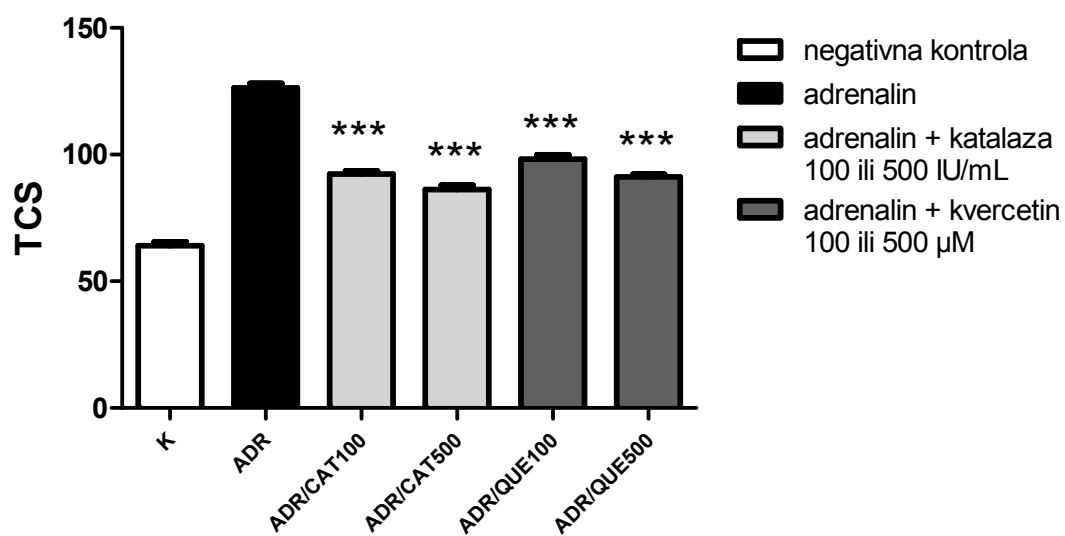
Tabela 9. Efekat katalaze i kvercetina naspram DNK oštećenja adrenalina u limfocitima čoveka nakon 60 minuta.

TRETMAN	X ± SE	S.D.
Negativna kontrola PBS	74.00±4.817	11.800
ADR 300µM	123.00±3.173	7.772
ADR 300µM + 100U/ml CAT	95.33±6.988 [*]	17.120
ADR 300µM + 500U/ml CAT	93.33±4.341 ^{**}	10.630
ADR 300µM + 100 µM QUE	105.00±4.517	11.060
ADR 300µM + 500 µM QUE	88.83±5.540 ^{**}	13.230
Pozitivna kontrola H ₂ O ₂	177.7±1.687 ^{***}	4.131

ADR – adrenalin, CAT- katalaza, QUE- kvercetin

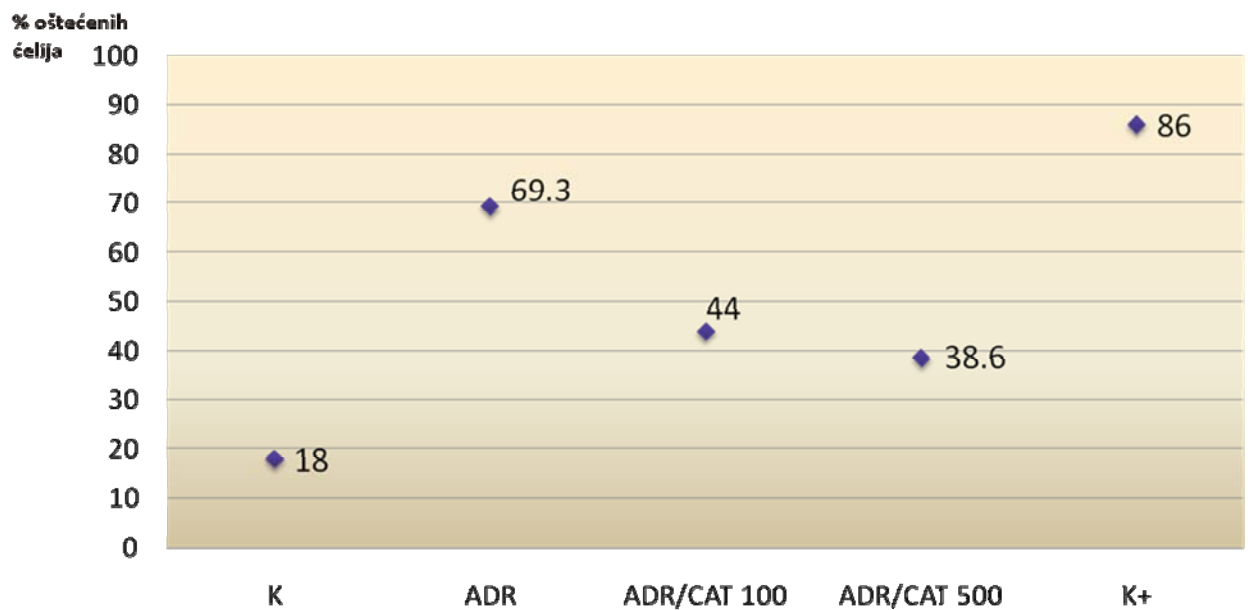
*p<0.05, **p<0.01,***p<0.001 vs. adrenalin

Grafikon 11. Antioksidativni efekat katalaze i kvercetina u tretmanu sa adrenalinom nakon 15 minuta



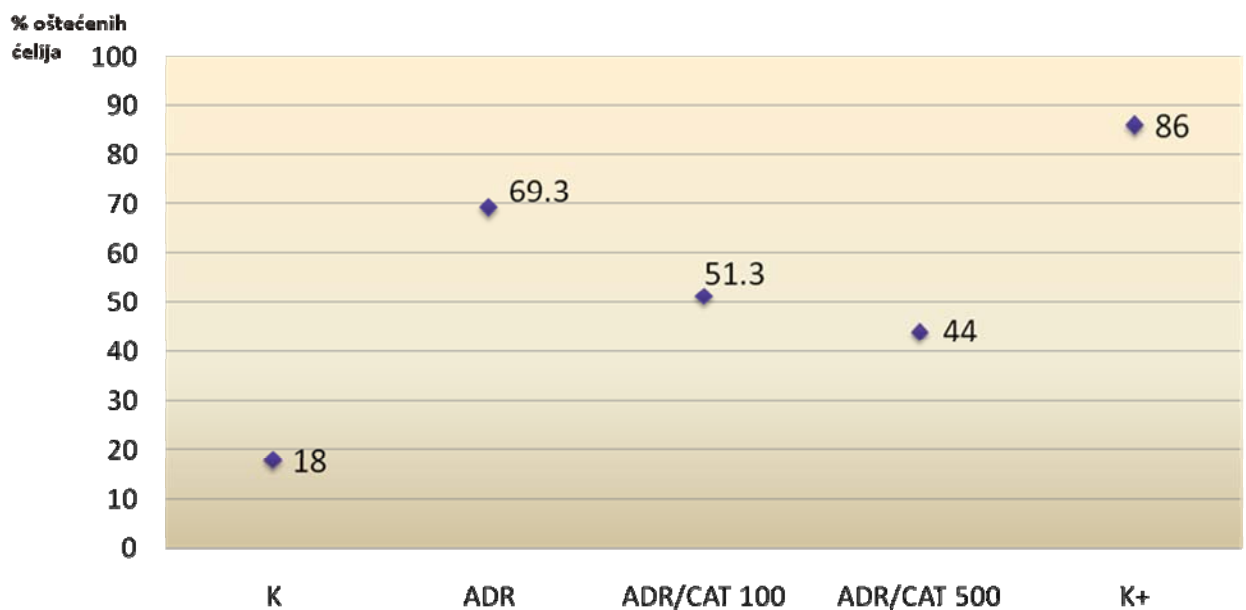
*** $p < 0.001$ vs. adrenalin

Grafikon 12. Nivo DNK oštećenja u humanim limfocitima nakon 15 minuta delovanja katalaze u tretmanu sa adrenalinom



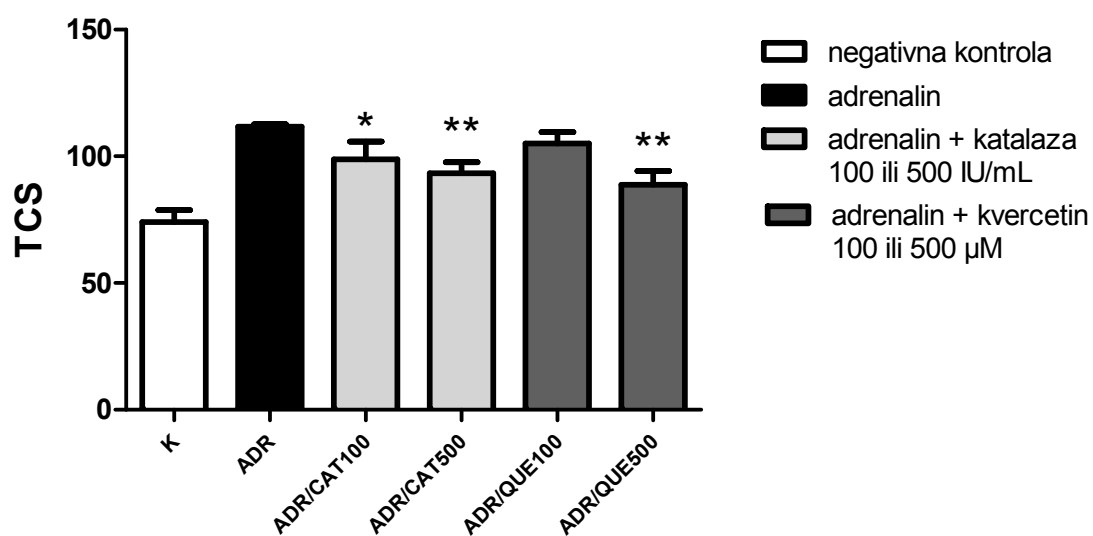
K – negativna kontrola, K+ - pozitivna kontrola

Grafikon 13. Nivo DNK oštećenja u humanim limfocitima nakon 15 minuta delovanja kvercetina u tretmanu sa adrenalinom



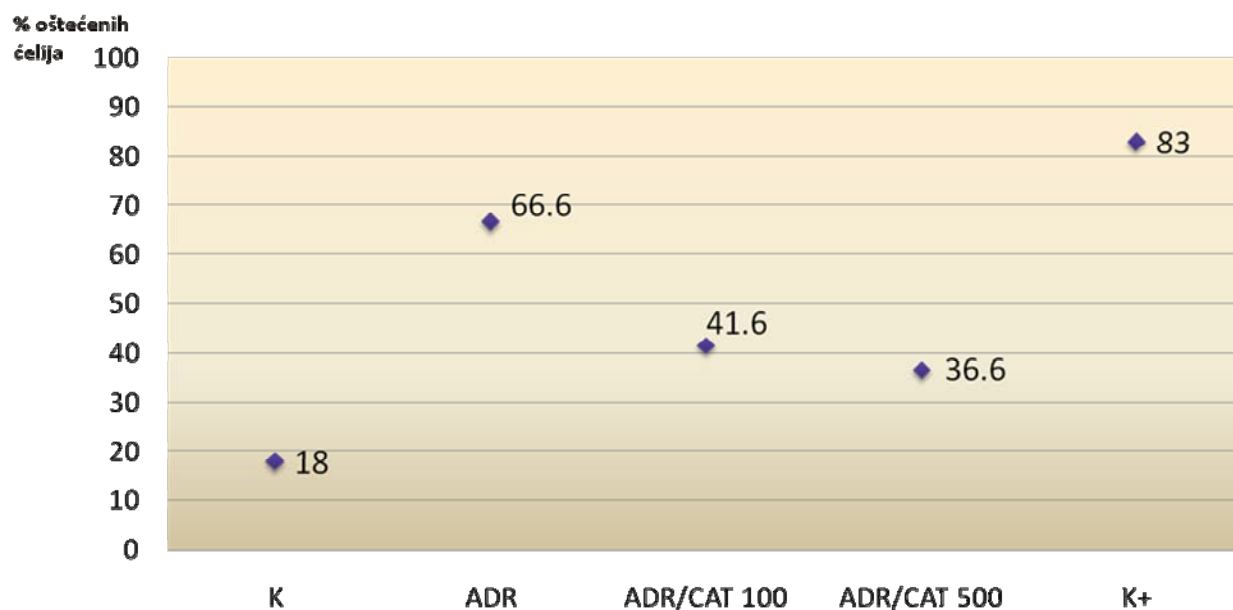
K – negativna kontrola, K+ - pozitivna kontrol

Grafikon 14. Antioksidativni efekat katalaze i kvercetina u tretmanu sa adrenalinom nakon 60 minuta



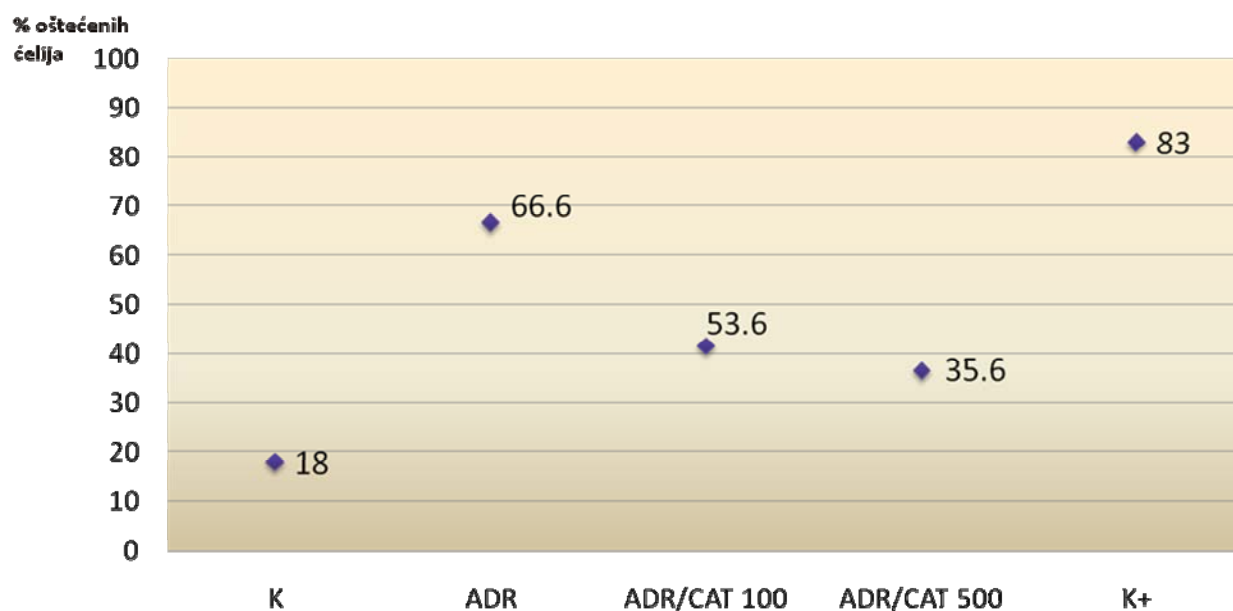
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. adrenalin

Grafikon15. Nivo DNK oštećenja u limfocitima čoveka nakon 60 minuta delovanja katalaze u tretmanu sa adrenalinom



K – negativna kontrola, K+ - pozitivna kontrola

Grafikon 16. Nivo DNK oštećenja u u limfocitima čoveka nakon 60 minuta delovanja kvercetina u tretmanu sa adrenalinom



K – negativna kontrola, K+ - pozitivna kontrola

5.3. Komet test kod limfocita čoveka izloženih dejstvu efedrina

Širok spektar koncentracije efedrina (0.0005 μM do 500 μM) ispitan je u Komet testu na izolovanim humanim limfocitima u vremenskim intervalima od 15, 60, 120, 240 minuta i 24 časa. Sve primenjene koncentracije efedrina uzrokovale su manje od 10% citotoksičnosti u „Trypan Blue” testu, tako da su uslovi bili odgovarajući za detekciju DNK oštećenja.

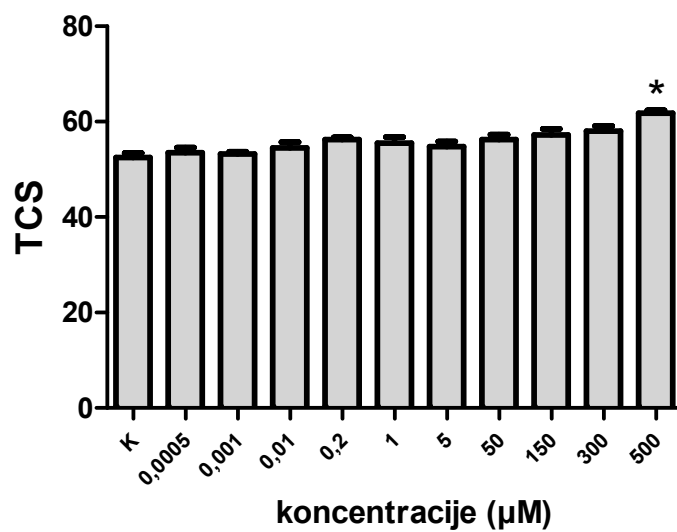
Efekti efedrina na oštećenja DNK u humanim limfocitima sumirani su u tabela 6 i grafikonima 17-26. Očekivano, pozitivna kontrola (100 μM H_2O_2) u svim vremenski intervalima je dala značajno povećanje DNK oštećenja ($p < 0.001$), procenat neoštećenih ćelija je bio u opsegu od 22-32%. Statističkom analizom rezultata nije uočeno značajno povećanje stepena DNK oštećenja pod uticajem efedrina u humanim limfocitima u odnosu na negativnu kontrolu ($p > 0.05$). Procenat humanih limfocita izloženih efedrinom koji nije pretrpeo oštećenje je bio u opsegu od 80-90%. Primećuje se da je jedino tretman efedrina na koncentraciji od 500 μM indukovao slabo, ali statistički značajno oštećenje DNK nakon 15 minuta ($p < 0.05$). Distribucija DNK oštećenja u ćelijama tretiranih sa 500 μM efedrina pokazuje blago povećanje procenta DNK oštećenja za svaku od četiri kategorije (B do E) koje je statistički značajno ($p < 0.05$).

Tabela 4. Analiza DNK oštećenja u limfocitima čoveka nakon različitog vremena tretmana efedrinom.

KONCENTRACIJE	VREME INKUBACIJE X±SE				
	0.25 h	1 h	2 h	4 h	24 h
Negativna kontrola PBS	52.50±0.957	57.25±0.478	57.50±1.000	58.00±0.5774	56.25±1.109
Efedrin					
0,0005	53.50±1.041	58.00±1.225	/	/	/
0,001	53.25±0.478	59.25±1.190	/	/	/
0,01	54.50±1.190	59.00±1.134	58.50±1.190	60.75±1.797	58.50±2.630
0,2	57.75±0.853	59.50±1.190	/	/	/
1	57.70±1.826	58.00±0.816	58.75±1.190	62.50±0.500	60.00±1.780
5	54.75±1.109	58.25±0.750	58.75±1.181	62.00±1.291	60.50±2.062
50	56.25±1.103	58.75±0.750	59.00±1.000	62.00±1.291	63.50±1.555
150	57.75±1.493	60.25±1.315	60.00±2.309	62.25±1.493	63.25±2.250
300	58.00±1.080	59.75±1.031	60.25±1.436	62.50±0.645	63.25±2.250
500	58.25±0,853*	59.00±0.707	/	/	/
Pozitivna kontrola H₂O₂	189.00±3.000***	184.5±2.784***	183.50±2.255***	191.30±3.521***	173.30±3.705***

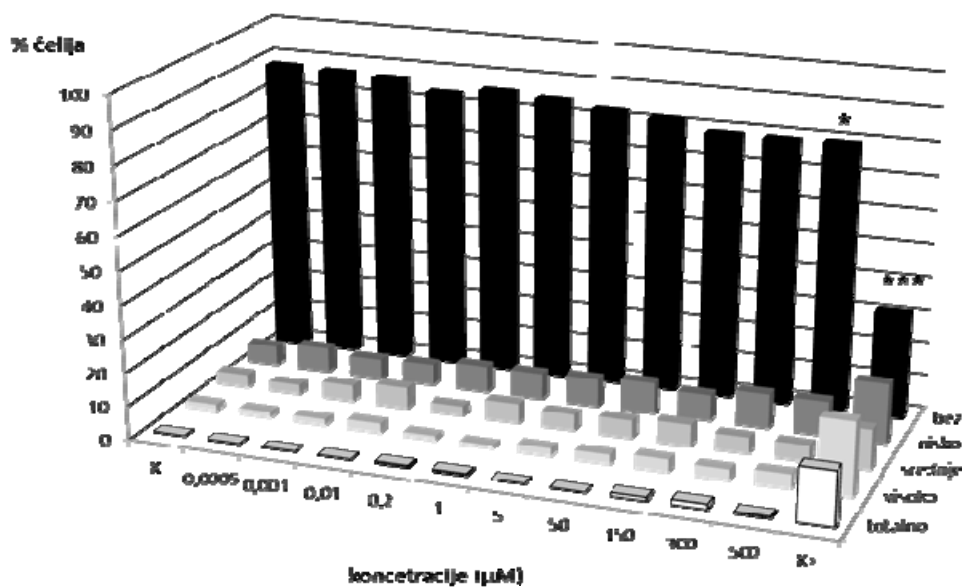
*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs. negativna kontrola

Grafikon 17. Efekat efedrina na DNK oštećenje u limfocitima čoveka nakon 15 minuta.



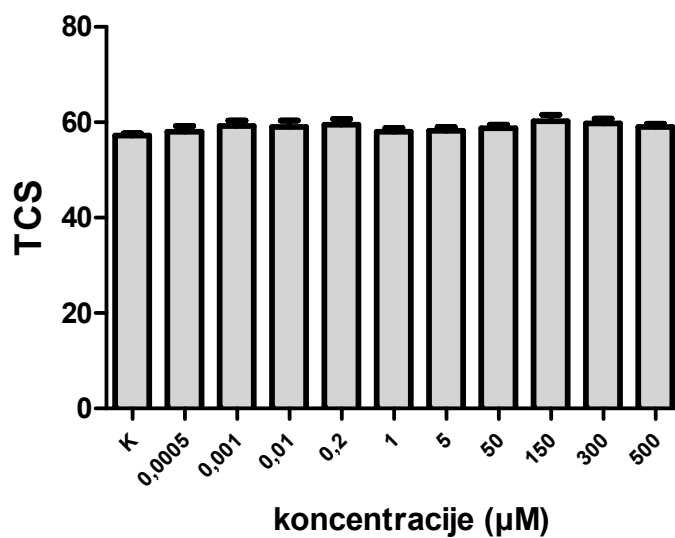
K – negativna kontrola
 $p^* < 0.05$ vs. negativna kontrola

Grafikon 18. Distribucija klasa kometa nakon 15 minuta izlaganja efedrinom.



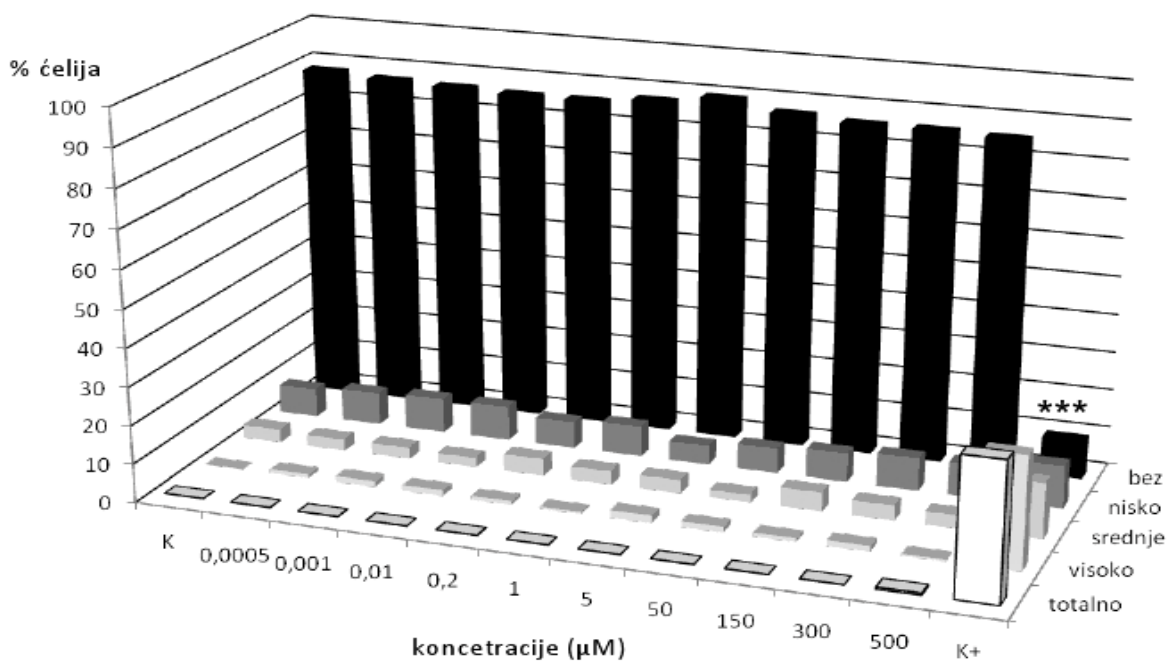
K – negativna kontrola, K+ - pozitivna kontrola
 $p^* < 0.05$, $***p < 0.001$ vs. negativna kontrola

Grafikon 19. Efekat efedrina na DNK oštećenje u limfocitima čoveka nakon 60 minuta.



K – negativna kontrola

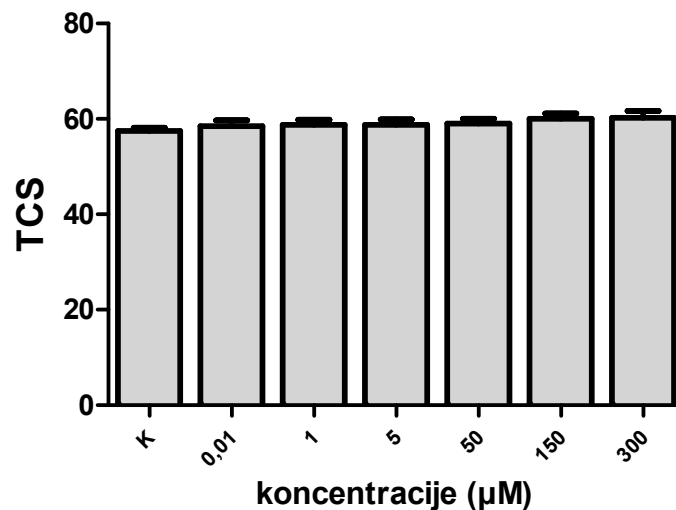
Grafikon 20. Distribucija klasa kometa nakon 60 minuta izlaganja efedrinom.



K – negativna kontrola, K+ - pozitivna kontrola

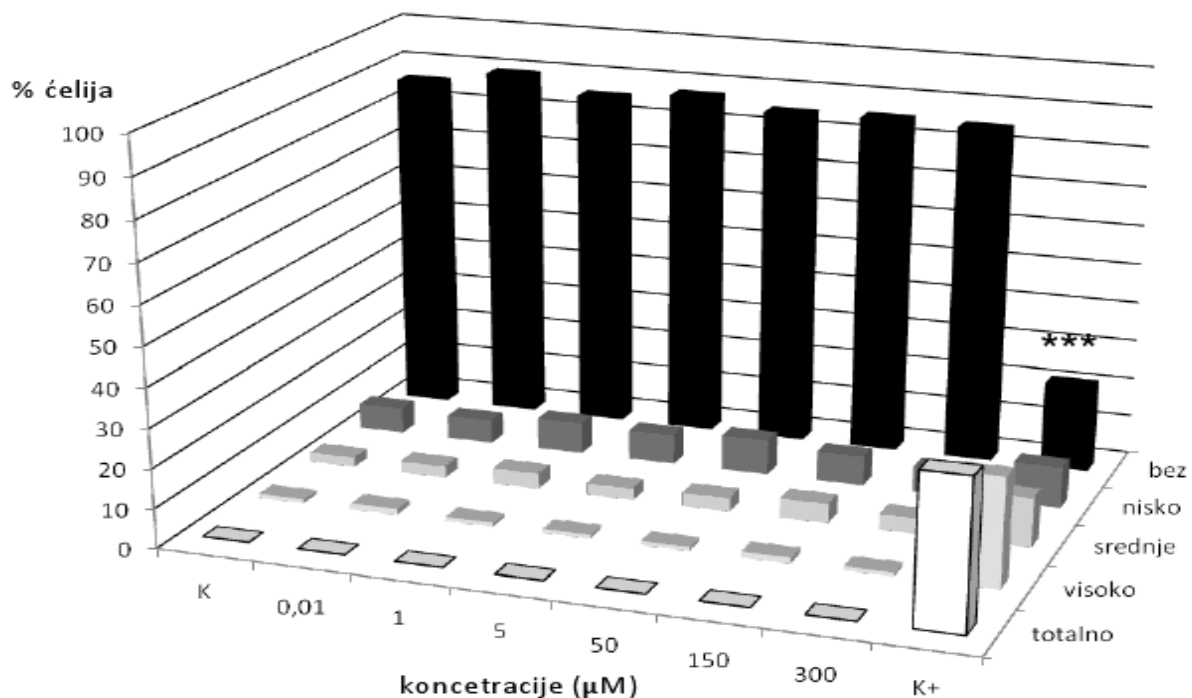
***p < 0.001 vs. negativna kontrola

Grafikon 21. Efekat efedrina na DNK oštećenje u limfocitima čoveka nakon 120 minuta.



K – negativna kontrola

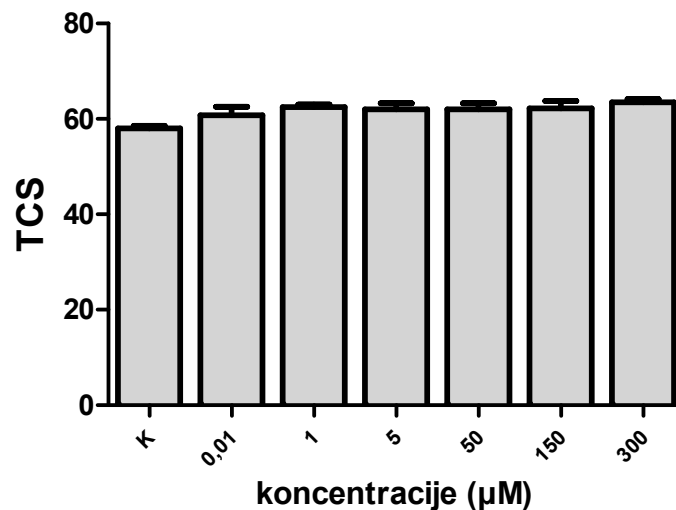
Grafikon 22. Distribucija klasa kometa nakon 120 minuta izlaganja efedrinom.



K – negativna kontrola, K+ - pozitivna kontrola

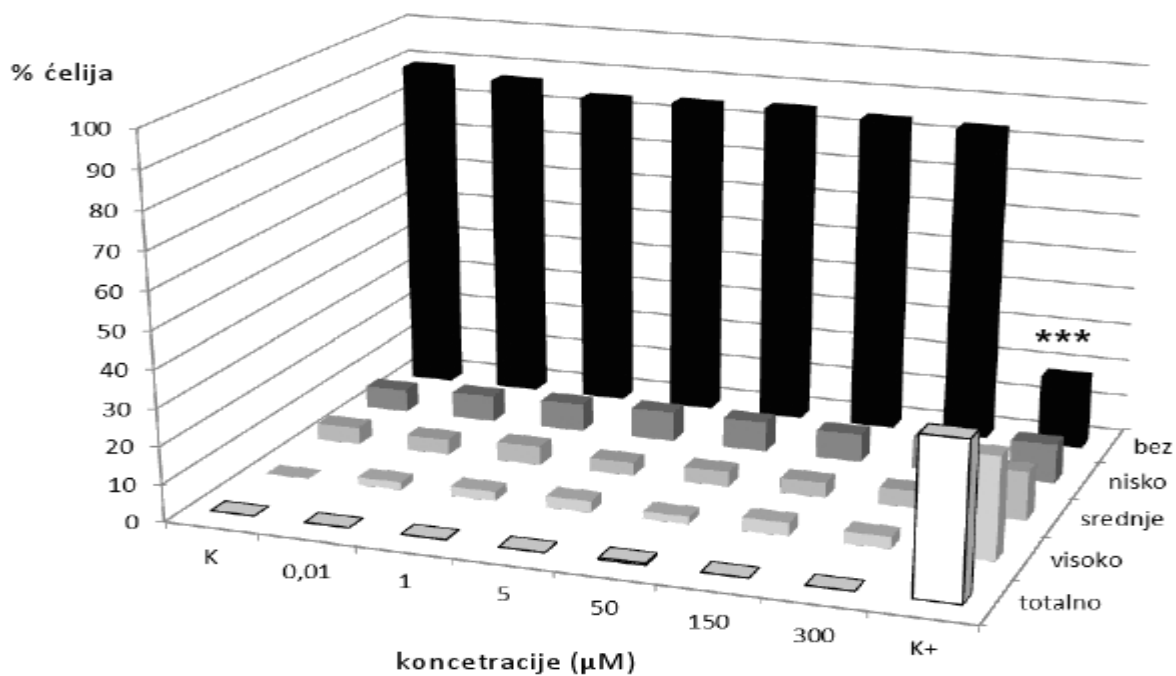
***p < 0.001 vs. negativna kontrola

Grafikon 23. Efekat efedrina na DNK oštećenje u limfocitima čoveka nakon 240 minuta.



K – negativna kontrola

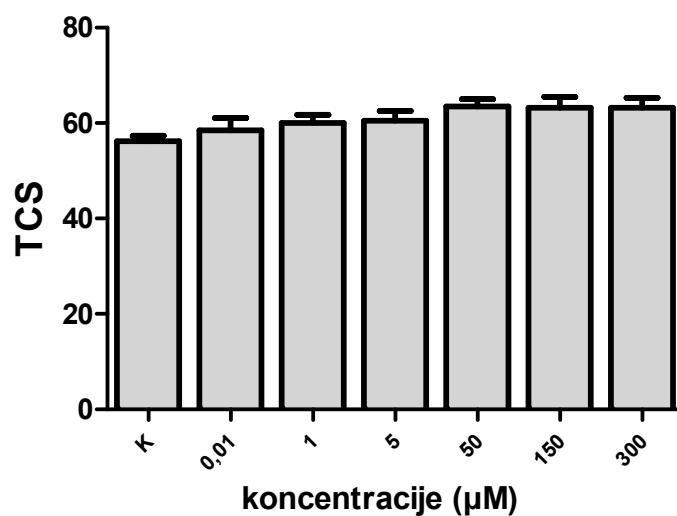
Grafikon 24. Distribucija klasa kometa nakon 240 minuta izlaganja efedrinom.



K – negativna kontrola, K+ - pozitivna kontrola

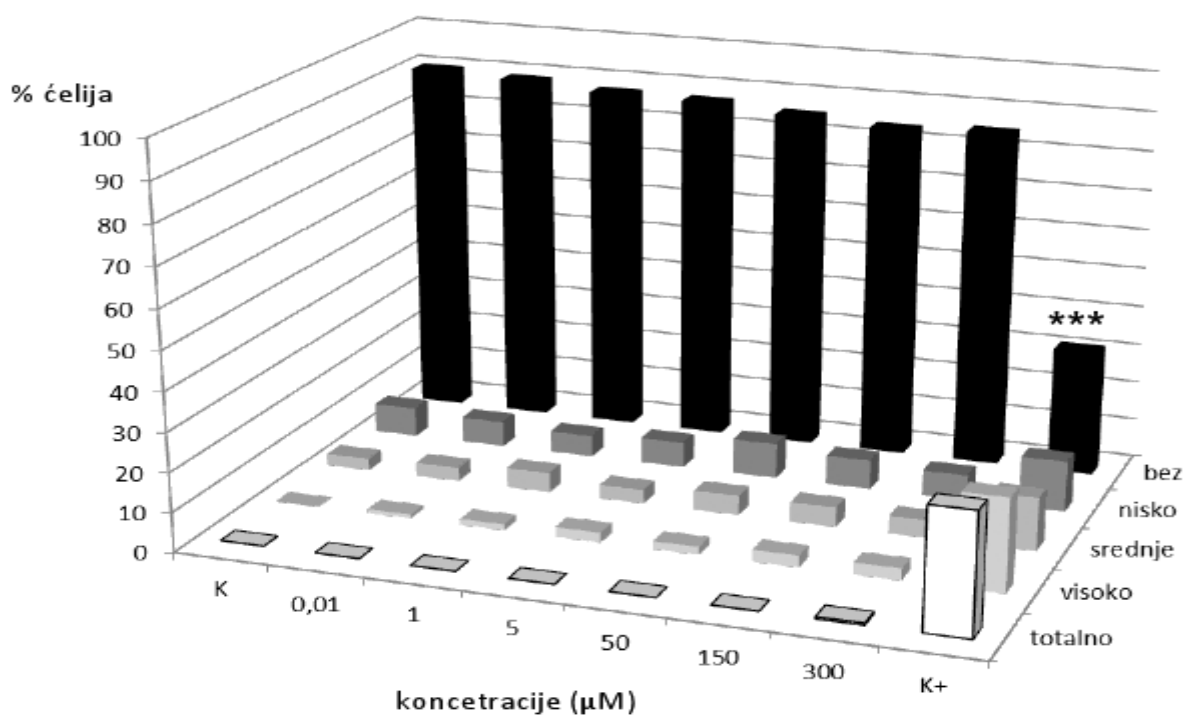
***p < 0.001 vs. negativna kontrola

Grafikon 24. Efekat efedrina na DNK oštećenje u limfocitima čoveka nakon 24 sata.



K – negativna kontrola

Grafikon 26. Distribucija klasa kometa nakon 24 sata izlaganja efedrinom.



K – negativna kontrola, K+ - pozitivna kontrola

***p < 0.001 vs. negativna kontrola

5.4. Efekti inhibitora reparacije na oštećenja DNK u prisustvu efedrina

Rezultati efekata inhibitora reparacije (AraC i HU) na humanim limfocitima u prisustvu efedrina nakon 15 min. predstavljeni su tabeli 7 i grafikonima 27 i 29. Sam efedrin (1, 50, i 300 μM) nije indukovao značajno povećanje oštećenja DNK u humanim limfocitima ($p > 0.05$). Procenat ćelija bez oštećenja je bio u opsegu od 79% do 85%. Pozitivna kontrola (vodoni peroksid) je indukovala najveći stepen oštećenja DNK ($p < 0.001$), 74% ćelija pretrpelo je oštećenje DNK.

Rezultati efekata inhibitora reparacije (AraC i HU) na humanim limfocitima u prisustvu efedrina predstavljeni su tabeli 7 grafikonu 27 i 29. Statističkom analizom utvrđeno je da istovremeni tretman efedrinom (1, 50, i 300 μM) sa inhibitorima reparacije indukuju povećanje oštećenja DNK u odnosu na netretirane ćelije. U tretmanu inhibitora reparacije (20 μM AraC i HU 2000 μM) i efedrina viših koncentracija (50 i 300 μM) znatno je povećano oštećenje DNK ($p < 0.01$) što je rezultovalo u smanjenju broja ćelija bez oštećenja za 25 i 27% uslovalo povećanje procenata oštećenih ćelija paralelno u svim kategorijama (B-E). Dok su AraC i HU (20 μM i 2000 μM) ispoljili slabiji efekat (19%) u kotretmanu sa efedrinom niske koncentracije (1 μM) u poređenju sa netretiranim ćelijama ($p < 0.01$). Nivo oštećenja DNK u ćelijama tretiranih efedrinom nisu se značajno razlikovala u odnosu na oštećenja ćelija tretiranih efedrinom i AraC i HU (20 μM i 2000 μM). Međutim, uočena je statistički značajna razlika u stepenu DNK oštećenja između negativne kontrole sa i bez prisustva inhibitora reparacije ($p < 0.05$). Kod limfocita tretiranih inhibitorima reparacije došlo je do povećanja procenta ćelija naročito u kategorija B i C.

Sličan efekat su ispoljili AraC i HU većih koncentracija (40 μM i 4000 μM). Analiza DNK oštećenje efedrina sa i bez prisustva inhibitora reparacije prikazan je u tabeli 7 i na grafikonima 28 i 30. AraC i HU (40 μM i 4000 μM) u prisustvu efedrina indukovali su statistički značajno povećanje migracije DNK u odnosu na negativnu kontrolu ($p < 0.01$). U tretmanu AraC i HU (40 μM i 4000 μM) i efedrina (300 μM) procenat neoštećenih ćelija je redukovano za 29% odnosno za 25 i 14% u tretmanu sa

efedrinom nižih koncentracija (1 i 50 μM) u odnosu na netretirane ćelije. Uočava se da je kotretman negativne kontrole sa AraC (40 μM) i HU (4000 μM) doveo do statističkog značajnog povećanja DNK oštećenja u odnosu na negativnu kontrolu ($p < 0.05$)

Rezultati efekata inhibitora reparacije nižih koncentracija (20 μM AraC i 2000 μM HU) na limfocitima čoveka u prisustvu efedrina nakon 60 min. su predstavljeni u tabeli 8 i grafikonima 31 i 33. Limfociti čoveka izloženi efedrinu nisu ispoljili značajno povećanje oštećenja DNK u odnosu na netretirane ćelije ($p > 0.05$). Procenat ćelija koje nisu pretrpele oštećenje bile su u opsegu od 83-87%. Najveći stepen oštećenja DNK indukovala je pozitivna kontrola odnosno vodonik peroksid ($p < 0.001$), pri čemu je 79% ćelija je pretrpelo oštećenje DNK.

Rezultati ukazuju da tretmani efedrina sa inhibitorima reparacije indukuju (20 μM AraC i 2000 HU μM) značajno povećanje DNK oštećenja u odnosu na ćelije koje nisu tretirane datim alkaloidom i inhibitorima ($p < 0.001$). Tretman sa 300 μM efedrina u prisustvu AraC i HU dovodi do smanjenja broja neoštećenih ćelija za 20% i povećanja procenata ćelija sa većim stepenom oštećenja. S druge strane tretmani efedrina nižim koncentracijama (1 μM i 50 μM) uticali na smanjenje broja neoštećenih ćelija za 16 %.

Za razliku od kraćeg tretmana, nakon 60 min. uočava da su AraC i Hu (20 μM i 2000 HU) u tretmanu sa efedrinom ispoljili značajno povećanje ($p < 0.001$) oštećenja DNK u odnosu na efekat samog efedrina. Limfociti koji su izloženi efedrinu (300 μM) pretrpeli su povećano oštećenje DNK u prisustvu AraC i HU - broj neoštećenih ćelija sa smanjio za 12% u odnosu na tretman sa samim efedrinom. Sličan efekat su ispoljili AraC i HU sa efedrinom nižih koncentracija (1 μM i 50 μM), smanjenjem broja neoštećenih ćelija za 11% odnosno 14 %. Uz to, kotretman negativne kontrole sa AraC i HU doveo je do statističkog značajnog povećanja DNK oštećenja ($p < 0.001$) u odnosu na kontrolu.

Efekti inhibitora reparacije viših koncentracija (40 μM AraC i 4000 μM HU) na limfocitima čoveka u prisustvu efedrina predstavljeni su u tabeli 8, grafikonu 32 i 34. Kotretmani efedrina sa AraC i HU viših koncentracija (40 μM AraC i 4000 μM HU) takođe indukuju značajno povećanje oštećenja DNK ($p < 0.001$) u odnosu na netretirane ćelije. Uočava se da sa povećanjem koncentracije AraC i HU broj neoštećenih ćelija smanjuje. Najveći efekat je ispoljio tretmana efedrina (300 μM) sa AraC i HU jer je broj neoštećenih ćelija opao za 22%. Tretmani efedrina nižih koncentracija (1 μM i 50 μM) sa

AraC i HU uticali su na smanjenje broja ćelija neoštećenih ćelija za 16 % tj. 18 % u odnosu na netretirane ćelije.

Takođe, postoje značajne razlike ($p < 0.001$) u nivou DNK oštećenja između tretmana efedrina (1, 50, i 300 μM) sa i bez prisustva AraC i HU. AraC i Hu (40 μM i 4000 HU) u tretmanu sa efedrinom (300 μM) indukovali su povećanje oštećenja DNK, povećan je procenat ćelija u svim klasama (B-E) što se odrazilo i na smanjenje broja neoštećenih ćelija za 18%. Nešto slabije, ali takođe značajan efekat su ispoljili i tretmani AraC i Hu i efedrina nižih koncentracija. Procenat neoštećenih ćelija je u tretmanu sa AraC i Hu smanjen za 15 odnosno 16% u odnosu na efekat tretmana bez prisustva AraC i Hu. Na kraju, kotretman negativne kontrole sa AraC i HU indukovao značajnu migraciju DNK ($p < 0.001$) u odnosu na kontrolu.

Tabela 7. Analiza DNK oštećenje na limfocitima čoveka nakon 15 minuta tretmana efedrina i DNK inhibitora reparacije (citozin arabinoza i hidrokisiurea)

TRETMAN	X ± SE	S.D.
Negativna kontrola (K)	66.33±0.802	1.966
K + AraC (20µM) i HU (2000 µM)	71.17±2.583 [*]	6.338
K + AraC (40µM) i HU (4000 µM)	72.33±0.988 [*]	2.422
Efedrin 1µM (EF 1)	69.50±1.708	2.383
EF1 + AraC (20µM) i HU (2000 µM)	73.83±0.654 [*]	3.545
EF1 + AraC (40µM) i HU (4000 µM)	75.50±0.806 ^{**}	1.975
Efedrin 50µM (EF 50)	70.00±1.862	4.561
EF50 + AraC (20µM) i HU (2000 µM)	74.50±0.652 ^{**}	1.378
EF50 + AraC (40µM) i HU (4000 µM)	75.33±2.142 ^{**}	5.203
Efedrin 300µM (EF 300)	70.33±1.687	2,098
EF300 + AraC (20µM) i HU (2000µM)	74.83±0.473 ^{**}	1,169
EF300 + AraC (40µM) i HU (4000µM)	76.33±0.404 ^{**}	0,983
Pozitivna kontrola H₂O₂	175.00±3.376 ^{***}	8,270

AraC – citozin arabinoza, HU- hidrokisiurea

*p<0.05, **p<0.01 , ***p<0.001 vs. negativna kontrola

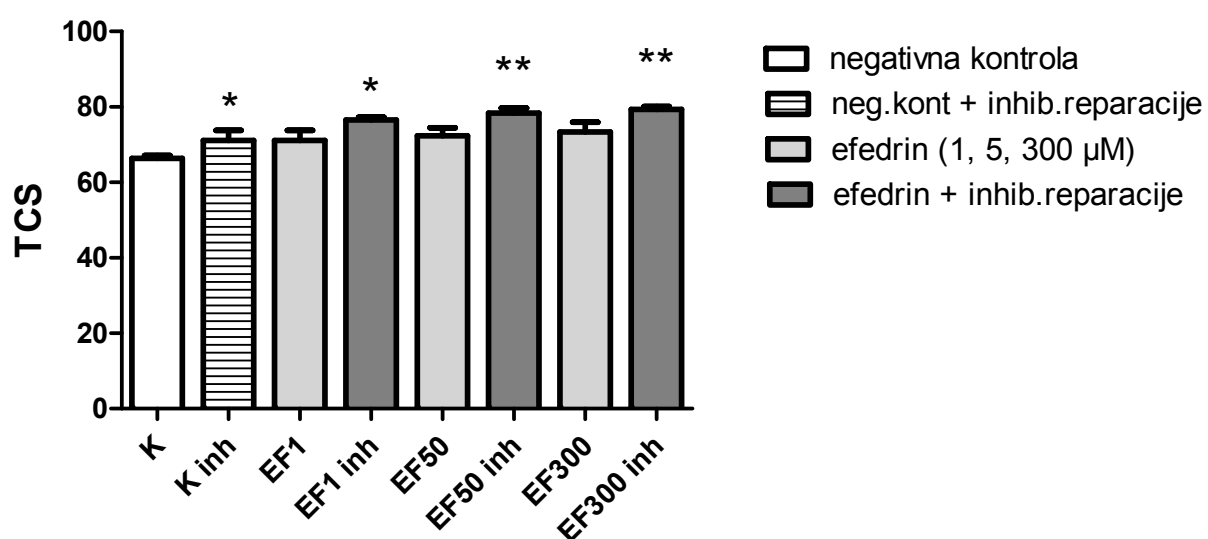
Tabela 8. Analiza DNK oštećenje na limfocitima čoveka nakon 60 minuta tretmana efedrina i DNK inhibitora reparacije (citozin arabinoza i hidrokisiurea)

TRETMAN	X ± SE	S.D.
Negativnakontrola (K)	58.50±0.500	1.000
K + AraC (20µM) i HU (2000 µM)	68.75±0.853 ^{***}	1.708
K + AraC (40µM) i HU (4000 µM)	69.75±0.853 ^{***}	1.708
Efedrin 1µM (EF 1)	59.75±0.750	1.500
EF1 + AraC (20µM) i HU (2000 µM)	73.25±0.478 ^{***}	0.957
EF1 + AraC (40µM) i HU (4000 µM)	73.50±0.288 ^{***}	0.577
Efedrin 50µM (EF 50)	61.75±0.478	0.957
EF50 + AraC (20µM) i HU (2000 µM)	75.25±1.031 ^{***}	2.062
EF50 + AraC (40µM) i HU (4000 µM)	74.75±2.136 ^{***}	4.272
Efedrin 300µM (EF 300)	62.50±1.041	2.082
EF300 + AraC (20µM) i HU (2000 µM)	76.25±1.250 ^{***}	2.500
EF300 + AraC (40µM) i HU (4000 µM)	76.50±0.652 ^{***}	2.065
Pozitivna kontrola H₂O₂	179.30±2.323 ^{**}	4.646

AraC – citozin arabinoza, HU- hidrokisiurea

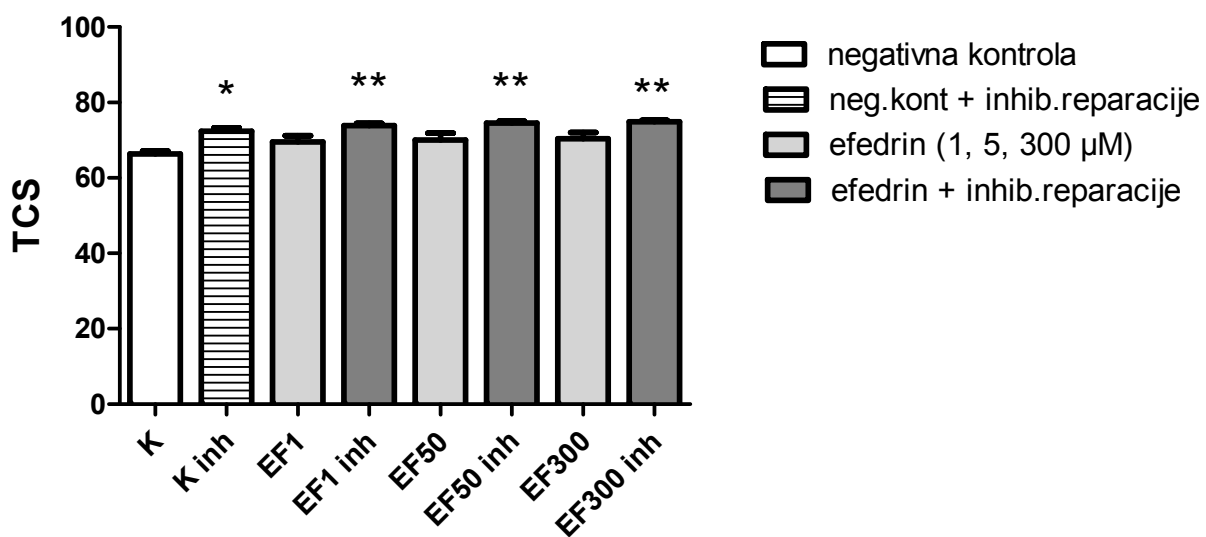
*** p<0.001 vs. negativna kontrola

Grafikon 27. Efekat citozin arabinoze (20 μM) i hidrokisiuree (2000 μM) u tretmanu sa efedrinom nakon 15 minuta



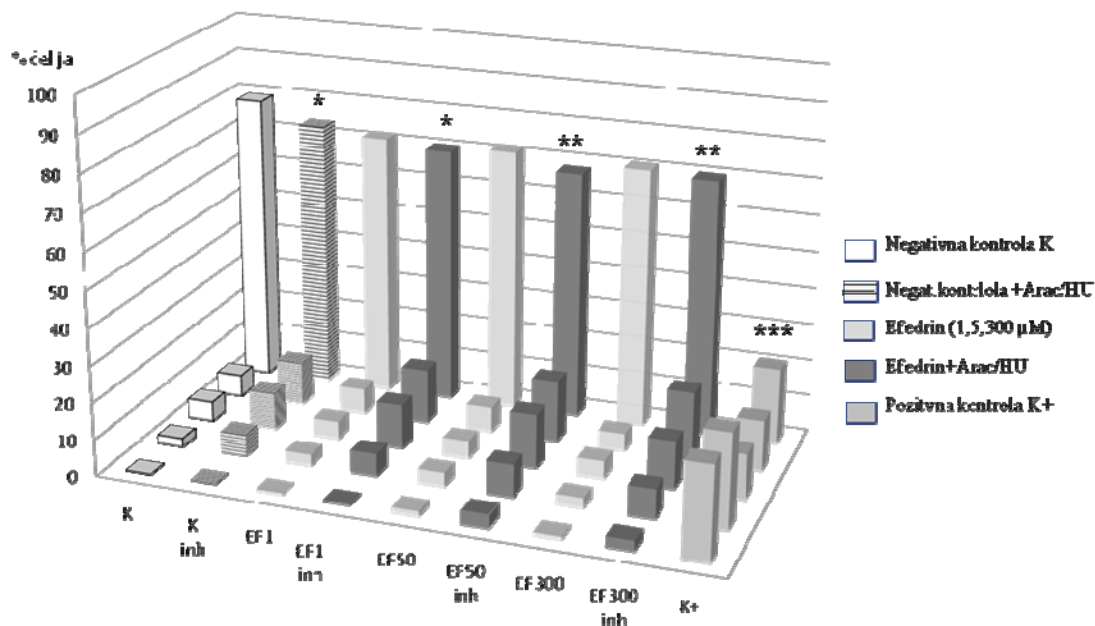
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. negativna kontrola

Grafikon 28. Efekat citozin arabinoze (40 μM) i hidrokisiuree (4000 μM) u tretmanu sa efedrinom nakon 15 minuta



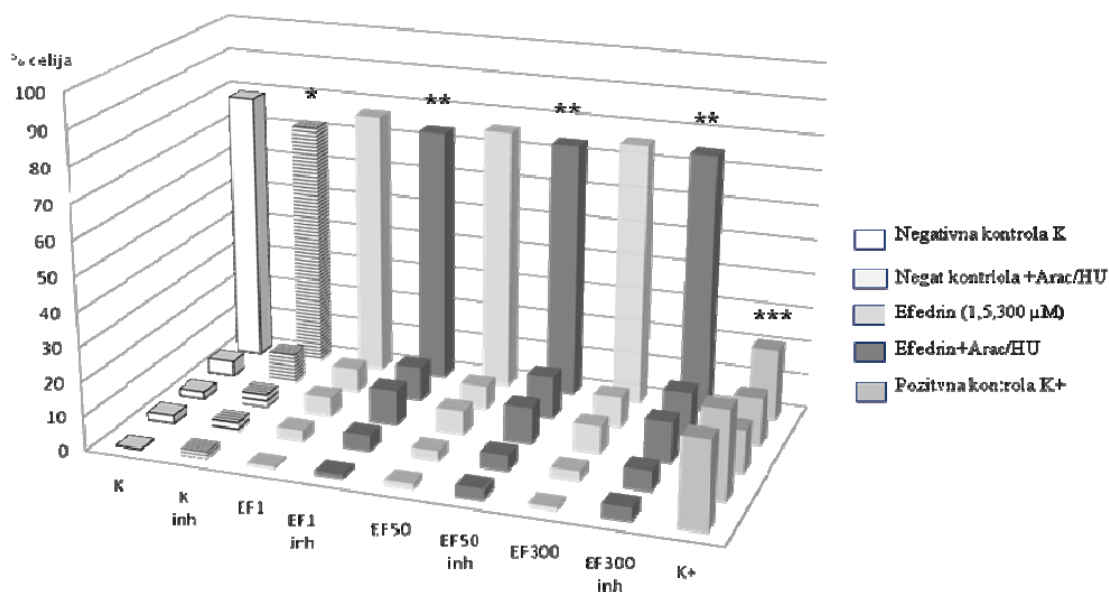
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Grafikon 29. Nivo DNK oštećenja efedrina nakon 15 minuta u limfocitima čoveka sa i bez prisustva inhibitorima reparacije (Arac 20 μ M i HU 2000 μ M)



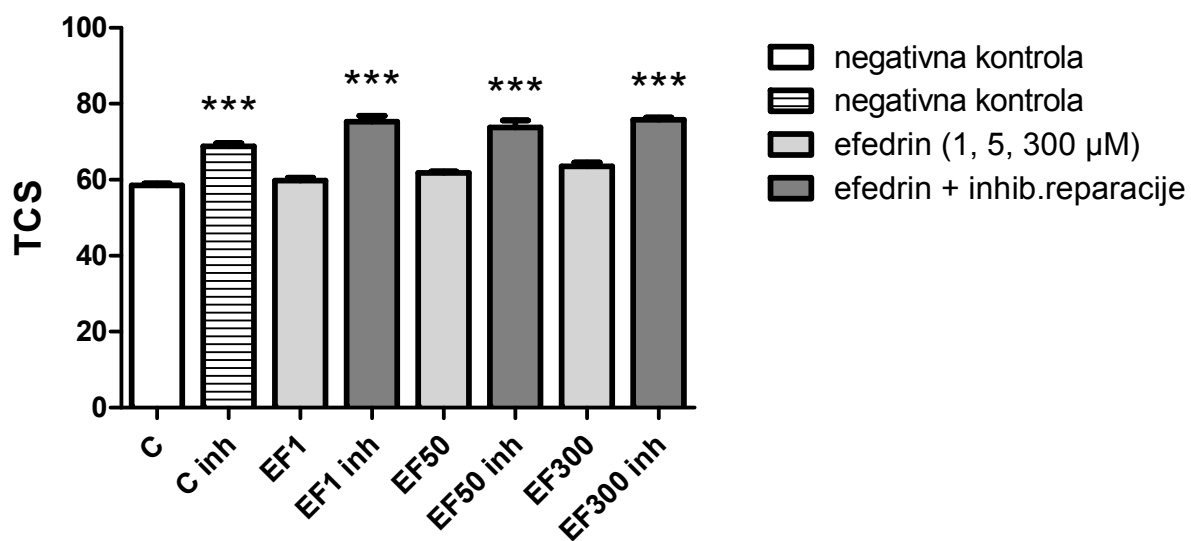
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. negativna kontrola

Grafikon 30. Nivo DNK oštećenja efedrina nakon 15 minuta u humanim limfocitima sa i bez prisustva inhibitorima reparacije (Arac 40 μ M i HU 4000 μ M)



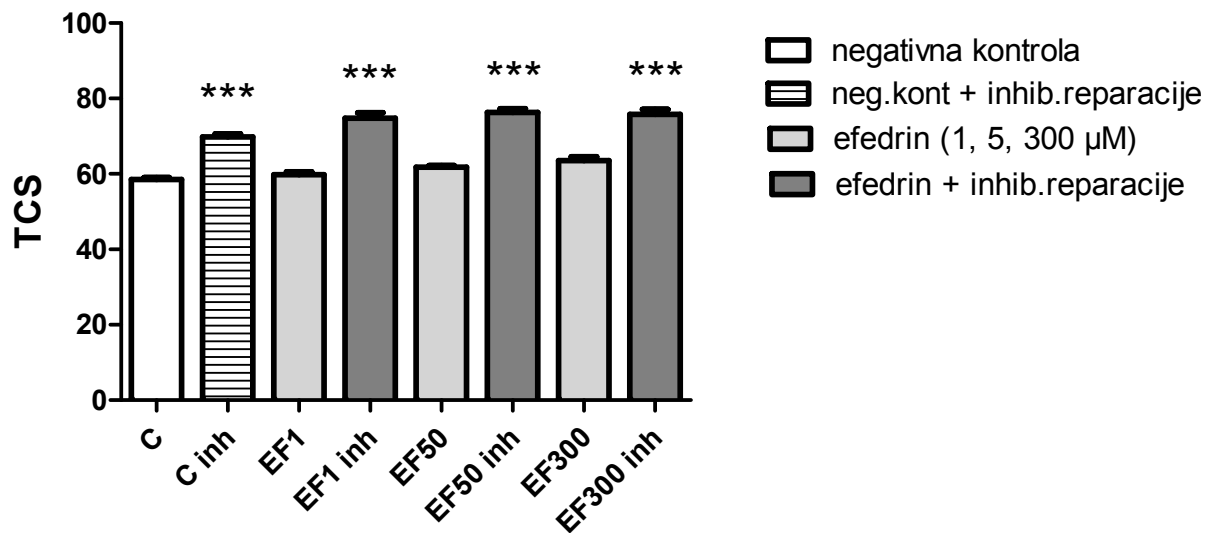
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. negativna kontrola

Grafikon 31. Efekat citozin arabinoze (20 μM) i hidrokisiuree (2000 μM) u tretmanu sa efedrinom nakon 60 minuta



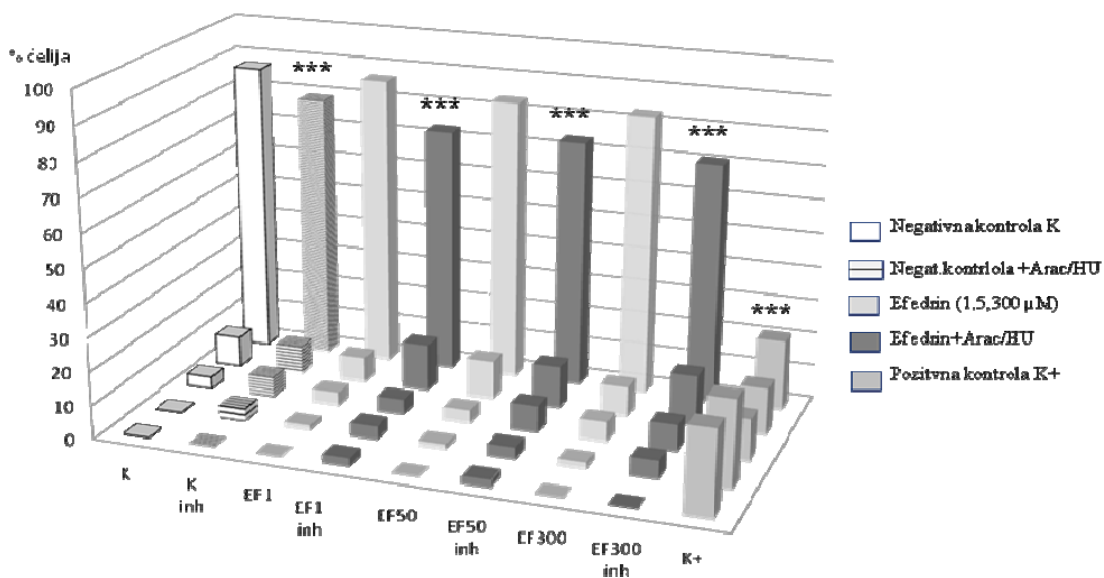
*** $p < 0.001$ vs. negativna kontrola

Grafikon 32. Efekat citozin arabinoze (40 μ M) i hidrokisiuree (4000 μ M) u tretmanu sa efedrinom nakon 60 minuta



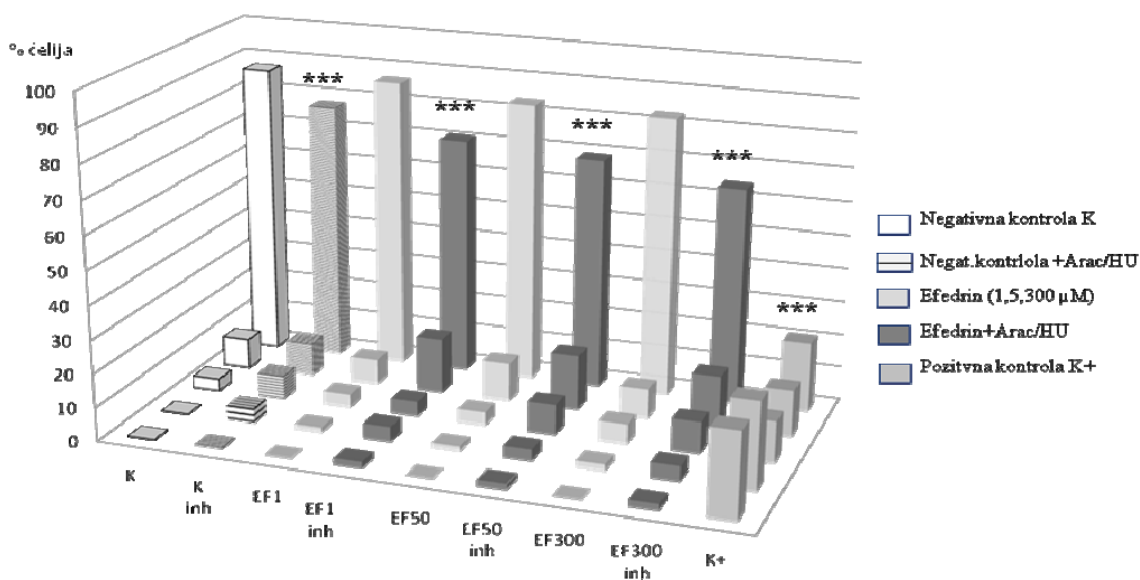
*** $p < 0.001$ vs. negativna kontrola

Grafikon 33. Nivo DNK oštećenja efedrina nakon 60 minuta u limfocitima čoveka sa i bez prisustva inhibitorima reparacije (Arac 20 μ M i HU 2000 μ M)



***p<0.001 vs. negativna kontrola

Grafikon 34. Nivo DNK oštećenja efedrina nakon 60 minuta u humanim limfocitima sa i bez prisustva inhibitorima reparacije (Arac 40 μ M i HU 4000 μ M)



***p<0.001 vs. negativna kontrola

6. DISKUSIJA

Cilj ove doktorske teze bio je da utvrdimo stepen primarnih oštećenja DNK u humanim limfocitima pod dejstvom adrenalina i efedrina. Evaluacija potencijalnog DNK oštećujućeg efekta adrenalina i efedrina obavljena je primenom Komet testa, veoma senzitivne metode u detekciji genotoksičnosti potencijalnih mutagena ili genotoksičnih kancerogena na nivou ćelija (Sasaki i sar., 2000). Kako bismo preciznije utvrdili mehanizme potencijalnog genotoksičnog dejstva adrenalina i efedrina, u Komet test smo uveli antioksidanse (katalaza i kvercetin) i inhibitore reparacije (citozin arabinozu i hudruksiureu).

6.1. Ispitivanja Komet testom

U našem eksperimentu kulture humanih limfocita podvrgnute širokom spektru koncentracija adrenalina ($0.0005\mu\text{M}$ - $500\mu\text{M}$) pokazale su značajan porast TCS vrednosti u odnosu na kontrolu, ukazujući na povećano oštećenje DNK sa porastom koncentracije datog kateholamina. Ovi rezultati ukazuju da adrenalin indukuje DNK oštećenja u humanim limfocitima merenim Komet testom što je u saglasnosti sa istraživanjima Flint i sar. (2007) koji su ispitivali efekat stres hormona (adrenalina, noradrenalina i kortizola) na stepen oštećenja DNK u prekanceroznim 3T3 ćelijama u Komet testu. Adrenalin je u koncentraciji koja odgovara fiziološkom povećanju ovog hormona tokom akutnog stresa (10^{-7} M) značajno indukovao DNK oštećenje već nakon 10 minuta. Dok je u našem istraživanju takođe u veoma kratkom vremenskom periodu (15 min.) sto puta manja koncentracija adrenalina (10^{-9} M) ispoljila genotoksičan efekat, što je značajan podatak s obzirom da smo izvršili testiranje na humanim limfocitima. Isti autori su ispitivali efekte 24-časovnog izlaganja adrenalina i noradrenalina u 3T3 ćelijama pacova u Komet testu.

Zabeleženo je značajno povećanje DNK oštećenja što je takođe u skladu sa našim rezultatima (Flin i sar., 2012).

Na potencijalni genotoksičan efekat adrenalina ukazali su i drugi autori. U testu fluorescentne analize neodmotane DNK adrenalin je indukovao jednolančane prekide DNK u humanim leukocitima (Crespo i Bicho, 1995). Slično tome, rezultati Miura i sar. (2000) ukazali su da adrenalin i noradrenalin indukuju jednolančane prekide u plazmidnoj DNK u prisustvu ADP-Fe³⁺. Genotoksičan efekat adrenalina ispitivan je i u bakterijskim test sistemima u kojima je adrenalin indukovao mutageni efekat (Murakami i sar., 1979; Yamaguchi, 1991).

Međutim, postoje radovi koji ukazuju da nije došlo do ispoljavanja mutagenog efekta adrenalina. Adrenalin nije ispoljio genotoksični efekat analizom hromozoma u kulturi humanih limfocita (Djelić i sar., 2003). Negativan rezultat je verovatno posledica toga što je eksperiment izveden u kulturi, a ne na prečišćenim limfocitima. Naime, u krvi postoje antioksidativni enzimi katalaza i glutation peroksidaza koji eliminišu slobodne radikale kiseonika.

Radi sagledavanja vremenske kinetike pojave oštećenja DNK pratili smo dejstvo adrenalina na humane limfocite tretirane 15, 60, 120, 240 min i 24 sata. Na osnovu trenda distribucije DNK oštećenja u humanim limfocitima indukcija DNK oštećenja adrenalina opada sa vremenom. Efekat adrenalina na stepen oštećenja DNK je opadao s vremenom. Humani limfociti tretirani adrenalinom nakon 15 min su pretrpeli značajno oštećenje DNK u svim koncentracijama, jedino fiziološka koncentracija od 0,0005 μM nije indukovala značajno oštećenje DNK. Posebno su koncentracije adrenalina od 5, 50, 150 i 300 μM imale značajnog udela u oštećenju DNK jer su dale pozitivan odgovor u svim vremeskim intervalima sem kod jednodnevnevnog tretmana gde je ispoljen najslabiji efekat, tj. jedino su koncentracije od 150 i 300 μM indukovale značajno oštećenje DNK. Ispoljeno DNK oštećenje verovatno je posledica ograničenog kapaciteta enzimske popravke u humanim limfocitima. Limfociti poseduju slab kapacitet popravke zbog niske aktivnosti enzima odgovornih za reparacione procese (Scudiero i sar., 1976). U našem eksperimentu u većini tretmana (15, 60, 120, 240 min.) limfociti su se nalazili u G₀ fazi ćelijskog ciklusa, dok veći DNK reparacion kapacitet postoji ulaskom ćelije u G₁ fazu nakon 20 sati što je moglo da doprinese slabijem DNK oštećujućem efektu adrenalina nakon 24 sata.

Za razliku od adrenalina, tretmani efedrinom (u opsegu od 0.0005 μM do 500 μM) nisu ispoljili povećano DNK oštećenje u Komet testu. Samo je koncentracija efedrina od 500 μM ispoljila slabo, ali statistički značajno ($p < 0.05$) povećanje oštećenja DNK u humanim limfocitima nakon 15 minuta tretmana. Efedrin kao i kateholamini poseduje direktnu adrenergičku aktivnost vezivanjem za odgovarajuće receptore. Postoje dokazi koji ukazuju da adrenalin i noradrenalin indukuju oštećenja DNK transdukcionim signalnim putem, s obzirom da je antagonist β -adrenergičkog receptora propranolol blokirao efekte adrenalina i noradrenalina (Flint i sar., 2007). Pretpostavljamo da je efedrin na sličan način indukovao povećano oštećenje DNK.

Odsustvo genotoksičnog efekta efedrina dobijeno u ovom proučavanju je u saglasnosti sa rezultatima genotoksikoloških istraživanja efedrina i ekstrakata efedre. Efedrin nije ispoljio genotoksičan efekat u bakterijskim test sistemima (Brambila i Martelli, 2009; Morimoto i sar., 1982) Takođe, u kulturama ovarijalnih ćelija kineskog hrčka, efedrin nije indukovao razmene sestrinskih hromatida (SCE) i hromozomske aberacije (NTP, 1986; Hillard i sar., 1998).

Iako efedrin nije ispoljio genotoksičan efekat u različitim test sistemima, potencijalna citotoksična aktivnost efedrina je zabeležena u ćelijskim linijama neuroblastoma miševa i humanih hepatoblastoma (Lee i sar., 2000; Fukushima, 2004). S druge strane, Attard i Vella (2009) zabeležili su da efedrin alkaloidi poseduju stimulatornu efekat, pre nego citotoksičan efekat na humanim limfocitima. Smatra se da je β -hidroksilni prsten posebno važan za β -adrenergičnu aktivnost (Ruffolo i sar. 2005) koja deluje inhibitorno na ćelije uključujući limfocite. Pošto efedrin ne poseduje hidroksilnu grupu u svojoj strukturi smatra se da efedrin aktivira limfocite putem α -adrenergične aktivnosti koja nema inhibitorni efekat na ćelije. Ovaj podatak može biti posebno značajan u imunologiji tumora (Zvetkova i sar., 1979).

6.2. Uticaj antioksidanasa na genotoksični efekat adrenalina

Uvidom u literaturne podatke o značaju ROS u oštećenju DNK pod uticajem kateholamina, verujemo da slobodni radikali mogu da igraju bitnu ulogu u ispoljavanju genotoksičnih efekata adrenalina. Kako bismo potvrdili našu hipotezu tj. ispitali mehanizam i identifikovali učešće ROS u DNK oštećenju posredovanom adrenalinom upotrebili smo antioksidanasa katalazu i kvercetin.

Rezultati dobijeni Komet testom primenom antioksidanasa ukazuju da adrenalin može dovesti do stvaranja ROS koji oštećuju DNK, s obzirom da su katalaza i kvercetin umanjili štetne efekte adrenalina. Katalaza je pokazala jasan doзно-zavistan protektivan efekat na humanim limfocitima što ukazuje na učešće ROS u DNK oštećenju. Kvercetin kao jedan od uspešnih hvatača OH^{\bullet} je takođe značajno redukovao DNK oštećenje izazvano adrenalinom, ali je nakon dužeg tretmana sa adrenalinom, aktivnost kvercetina opala. Verovatno da se tokom produženog vremena inkubacije kvercetin metabolisao u manje efektivnu formu putem citohrom P450 oksidacionog sistema (Sousa i sar., 1985; Obermeier i sar., 1995) što se odrazilo u manjem broju neoštećenih ćelija.

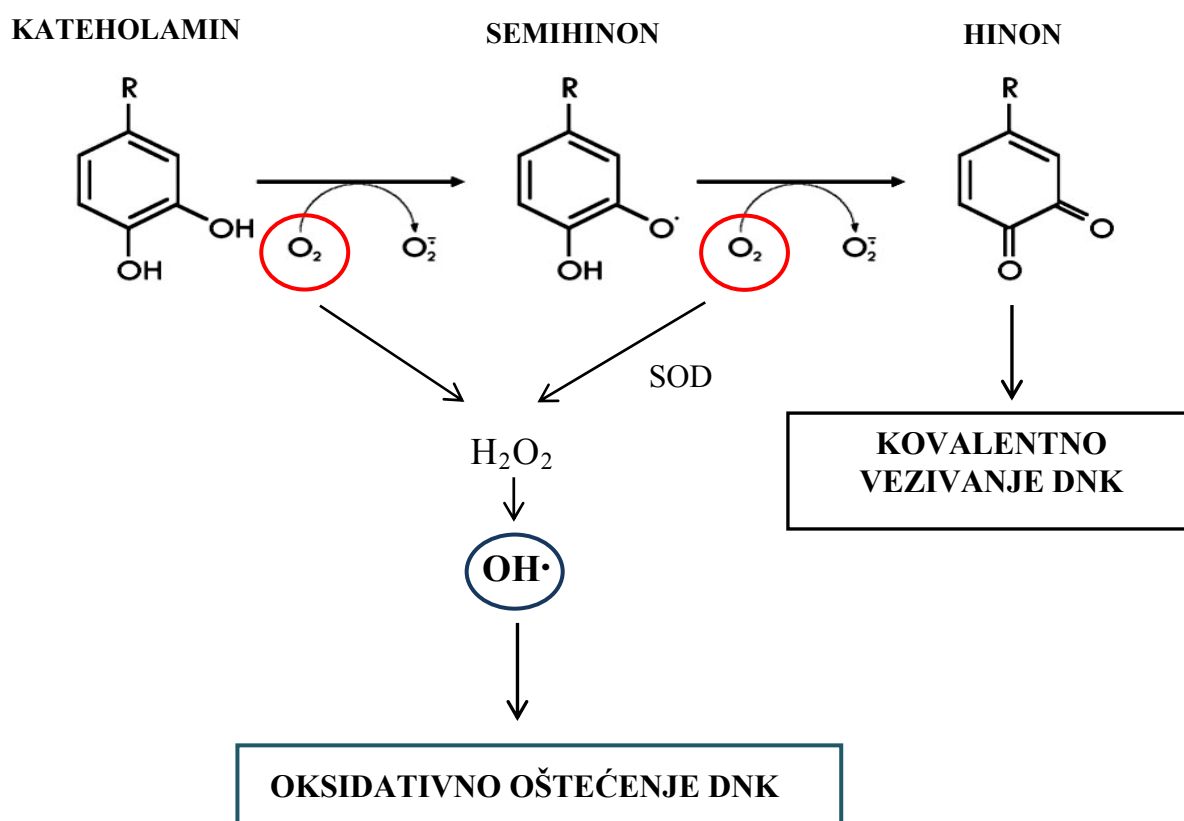
Naši rezultati su saglasni sa rezultatima Crespo i Bicho (1995) u kome su katalaza i superoksid dismutaza smanjili nivo oštećenja DNK pod uticajem adrenalina u humanim leukocitima. Takođe, rezultati Miura i sar. (2000) u kojima je katalaza ispoljila zaštitni efekat protiv genotoksičnog dejstva adrenalina i noradrenalina potvrđuju značajan doprinos ROS u ispoljavanju genotoksičnih efekata kateholamina.

Na osnovu naših rezultata i dostupnih podataka možemo zaključiti da bitnu ulogu u ispoljavanju genotoksičnosti adrenalina mogu imati reaktivni derivati kiseonika. Očigledno je da hemijska struktura kateholamina čini ova jedinjenja idealnim za uključivanje u redoks cikluse. Adrenalin u svojoj strukturi poseduje kateholni prsten koji zbog nestabilne prirode može lako da oksiduje do semihinona i hinona pri čemu nastaju ROS koji mogu oštetiti DNK (slika 10).

McGregor i sar. (1988) su ispitivanjem mutagenih efekata kateholamina istakli značaj prisustva kateholne grupe u ispoljavanju štetnih efekata kateholamina. Autori

smatraju da fenolne grupe nisu mutagene, ali je dodatak druge hidroksilne grupe koja stvara katehol, dovoljan za ispoljavanje mutagenog efekta.

Da kateholna grupa može biti važna u ispoljavanju biološke aktivnosti ukazuju nam i eksperimentalni podaci ispitivanja genotoksičnog efekta efedrina koji su sprovedeni u našem istraživanju. Iako efedrin poseduje sličnu hemijsku strukturu kao adrenalin, ispitani alkaloid nije ispoljio značajan genotoksičan efekat. Razloge možemo tražiti u odsustvu kateholne grupe za koju se smatra da je odgovorna u ispoljavanju genotoksičnih efekata kateholamina.



Slika 10. Predloženi put nastanka oksidativnog oštećenja DNK

Naši rezultati sugerišu da značajnu ulogu u nastanku oštećenja DNK igra stvaranje vodonik peroksida, s obzirom da katalaza značajno umanjuje štetne efekte adrenalina zapažene u ovim istraživanjima. DNK oštećenje je verovatno uzrokovano nastankom visoko reaktivnog hidroksil radikala (OH^{\cdot}) iz vodonik peroksida u Fenton ili Haber-Weiss-ovoj reakciji ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\cdot}$; $O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^- + OH^{\cdot}$). OH^{\cdot} u reakciji sa bazama i šećernom komponentom DNK može da dovede do oksidacije baza ili prekida DNK koja se eksprimira u Komet testu u vidu komete sa

repom (DNK koja je migrirala). Superoksidni anion ($O_2^{\bullet -}$) koji takođe nastaje pri oksidativnom metabolizmu u reakciji sa vodonik peroksidom može biti konvertovan u OH^{\bullet} i određenim uslovima može stimulisati dalju oksidaciju kateholamina. Međutim i sami semihinoni i hinoni takođe mogu oštetiti DNK i doprineti stvaranju ROS (Cavalieri i sar., 2002).

Treba naglasiti da se pod normalnim okolnostima nivo ROS održava pod kontrolom zahvaljujući aktivnosti antioksidativnih enzima kao što su katalaza, superoksid dismutaza i glutation peroksidaza. Usled narušene ravnoteže između nastanka ROS i antioksidativnog zaštitnog sistema dolazi do stanja koji se naziva oksidativni stres. Oksidativni stres doprinosi oštećenju ćelijskih komponenti kao što su lipidi, proteini i DNK.

Postavlja se pitanje pod kakvim okolnostima nastaje oksidativni stres koji vodi oštećenju DNK u odgovoru na kateholamine?

Fiziološki nivo adrenalina u plazmi je u nanomolarnom opsegu. Međutim, visoke koncentracije se mogu javiti kod hipoglikemije, fizičke aktivnosti, hemoragijske hipotenzije kao i kod patoloških stanja kao što su infarkt miokarda i cirkulatori šok u kojima se nivo adrenalina može povećati i do 100 puta (Goldstein i ar., 2003; Kjaer, 1998; Grossman, 1998;)

U normalnim uslovima katabolizam kateholamina uključuje oksidativnu deaminaciju, O-metilaciju i konjugaciju. Kada je visok nivo kateholamina prisutan u cirkulaciji enzimi katabolizma gube na efikasnosti i pokreće se proces autooksidacije koji predstavlja inicijalni događaj u seriji slobodno radikalskih reakcija vodeći do povećanja reaktivnih intermedijera i nastanku oksidativnog stresa. Pretpostavka je da su primenjene koncentracije adrenalina uslovile povećanje oksidativnog metabolizma i nastanka veće količine ROS čije povećane vrednosti nisu eliminisane zbog nedovoljnog antioksidativnog kapaciteta.

Postoje mnogobrojni nalazi koji ističu značaj ROS u patogenezi bolesti ukazujući da stvorene reaktivne kiseonične vrste mogu uticati na razvoj bolesti, odnosno da je jedan od faktora u etiologiji oksidativni stres. Produkti redoks ciklusa adrenalina su zabeleženi u srcu, skeletnim mišićima, jetri i krvi (Dhalla i sar., 2001). U vezi s tim, osobe koje imaju visoko koncentracije adrenalina kao što su srčani bolesnici gde su zabeležene

vrednosti od 20-58 nM (Raymondos i sar., 2000) ili osobe koji boluju od feohromocitoma (11 nM) (Hegedus, 2000) mogu biti skloniji povećanom oštećenju DNK na osnovu naših dobijenih rezultata gde je adrenalin indukovao oštećenje pri koncentracijama od 1nM do 5×10^5 nM. S obzirom da ROS imaju sposobnost da uzrokuju oštećenje DNK i promene ekspresiju gena stvara se mogućnost da budu uključeni u sve korake kancerogeneze (Burcham 1998). Oksidovane DNK baze imaju sposobnost da indukuju mutacije koje aktiviraju protoonkogene čime dolazi do ćelijske transformacije (Behrend i sar., 2003; Wu i sar., 2004).

Iako većina navedenih radova ističe značajan uticaj oksidativnog metabolizma u ispoljavanju genotoksičnih efekata kateholamina, rezultati dobijeni u našem istraživanju pokazuju da katalaza u kotretmanu sa adrenalinom nije redukovala nivo DNK oštećenja do nivoa negativne kontrole što ukazuje da postoje drugi mehanizmi kojim adrenalin indukuje DNK oštećenje

Flint i sar., (2007) smatraju da hormoni stresa (adrenalin, noradrenlin i kortizol) indukuju oštećenje DNK vezivanjem za receptore što vodi aktivaciji određenih gena koji su uključeni u ispoljavanje mutagenih efekata. Naime, hormoni stresa indukuju DNK oštećenje na molekularnom nivou, sprečavajući ulazak ćelije u apoptozu kao i zaustavljanje ćelijskog ciklusa što doprinosi transformaciji ćelija. Međutim, tačan mehanizam kojim se DNK oštećenja javljaju u odgovoru na stres je nepoznat. Hara i sar. (2011) pretpostavljaju da adrenalin signalnim putem preko β adrenoreceptora deluju na Gs-PKA kompleks i β arestin, aktivira DNK oštećenje i suprimira nivo p53 gena i time sinergistički dovodi do akumulacije DNK oštećenja. Ovi nalazi navode na zaključak da je adrenalin značajan medijator stresa koji utiče na genomsku nestabilnost i osetljivost za nastanak tumora.

Pored genotoksičnog efekta adrenalin može mehanizmom transdukcije signalnih puteva da podstakne kancerogenezu s obzirom da mnoge ćelije kancera na svojoj površini poseduju adrenergičke receptore. Nađeno je da adrenalin utiče na invazivni potencijal tumorskih ćelija jajnika putem β -adrenergične regulacije MMP proteina (Waldum i sar., 1998). Takođe, putem β - adrenergične aktivacije adrenalin stimuliše proliferaciju kanceroznih skvamoznih ćelija jednjaka (Liu i sar., 2008). Kod ćelija kancera dojke i debelog creva adrenalin je indukovao hemorezistenciju preko α -adrenergičkih receptora (Su i sar., 2005; Yao i sar., 2009).

Naše *in vitro* istraživanje ukazuje da je adrenalin uticao na povećanje stepana oštećenja DNK u humanim limfocitima. Međutim, kako bismo dobili što potpuniju sliku o uticaju adrenalina na pojavu oštećenja DNK neophodno je izvršiti evaluaciju na različitim tipovima ćelija zbog razlike u proliferacionim statusu i metabičkom kapacitetu među ćelijama, što utiče na njihovu sposobnosti reparacije, a time i na krajnji efekat adrenalina.

Iako ovo istraživanje ukazuje da adrenalin indukuje DNK oštećenja koja su dobrim delom oksidativne prirode, zbog pozitivnog odgovora antioksidanasa, na osnovu dobijenog rezultata ne možemo tačno definisati mehanizam delovanja adrenalina zbog čega su neophodna dalja ispitivanja koje bi omogućila bolje sagledavanje mehanizma delovanja adrenalina.

6.3. Uticaj inhibitora reparacije u prisustvu efedrina

Kako bismo ispitali da li efedrin dovodi do oštećenja DNK u humanim limfocitima koja mogu da se poprave mehanizmima popravke DNK, u Komet test smo uveli inhibitore reparacije (citozin arabinozid i hidroksiureu). AraC deluje inhibiranjem DNK sinteze i koraka ligacije dok HU inhibira ribonukleotid reduktazu u popravci DNK (Martin i sar., 1999).

U našem eksperimentu upotreba AraC i HU bez prisustva efedrina nakon 15 minuta rezultovalo je u značajnom povećanju oštećenja DNK, sugerišući na prisustvo endogenog DNK oštećenja u ćelijama što su zabeležili Ori i sar., 2005 i Guerci i sar., 2009. Postojanje povećanog DNK oštećenja u humanim limfocitima tretiranih inhibitorima reparacije verovatno je rezultat nepopravljenog DNK oštećenja. Međutim, značajna migracija DNK nije uočena kod limfocita tretiranih različitim koncentracijama efedrina.

Dodatkom inhibitora reparacije DNK u kulturi humanih limfocita izloženih efedrinom (1, 50 i 300 μM) dovelo je do značajnog povećanja oštećenja DNK nakon 15 minuta. Postojanje reparacionih procesa u humanim limfocitima je očigledno zato što je tretman efedrinom (1, 50 i 300 μM) i inhibitorima reparacije (AraC i HU) rezultovalo u povećanju prekida DNK tj. inhibiciji DNK popravke što se manifestovalo povećanom

vrednosti TCS-a u odnosu na netretirane ćelije. Viši nivo DNK oštećenja zabeležen je prilikom tretmana efedrina i viših koncentracijam inhibitora (40 μ M AraC+ 4000 μ M HU), a naročito je izražena razlika između tretmana efedrina (1 μ M) i viših koncentracija inhibitora u odnosu na isti tretman sa nižim koncentracijam AraC i HU. Nesumnjivo je da su procesi popravke aktivirani što je rezultovalo u enzimskoj aktivnosti koja pri nižim koncentracijama inhibitora nije inhibirana.

Nakon produženog vremena inkubacije (60 min.) takođe se uočava prisustvo endogenog oštećenja jer je kontrola sa inhibitorima reparacije DNK pri nižim (20 μ M AraC+ 2000 μ M HU) i višim koncentracijama (40 μ M AraC + 4000 μ M HU) značajno indukovala migraciju DNK.

Efedrin (1, 50 i 300 μ M) nije značajno uticao na povećanje DNK oštećenja, ali je dodatkom AraC i HU došlo do akumulacije prekida što je rezultovalo u povećanju TCS vrednosti koje je bilo značajno u kotretmanu efedrina i inhibitora reparacije nakon produženog tretmana. AraC i HU su pokazali efekat zavistan od doze tj. više koncentracije inhibitora (40 μ M AraC + 4000 μ M HU) indukovale su veći stepen oštećenja u odnosu na niže koncentracije AraC i HU u tremanu sa efedrinom.

Uočava se da su limfociti tretirani efedrinom i inhbitorim reparacije nakon 60 minuta pretrpeli veće oštećenje DNK u odnosu na isti tretman nakon kraćeg vremena inkubacije Zabeleženo je da se najviši nivo DNK prekida uočava nakon 30-60 min. inkubacije (Tuck i sar., 2000; Holmberg, 1989). Pretpostavlja se da to vreme predstavlja balans između dva procesa popravke tj. ekscizije i ligacije. Dodatkom inhibitora reparacije (AraC i HU) uzrokovalo je disbalans između dva navedena procesa što se manifestovalo u većem nivo DNK prekida odnosno većem broju ćelija sa oštećenjem DNK.

Pretpostavljamo da je prisutno endogeno oštećenje aktiviralo mehanizme popravke koji su inhibirani sa AraC i Hu i doveli do još većeg oštećenja DNK što nas navodi na zaključak da je povećenje oštećenja DNK posledica prisutnog endogenog oštećenja pre nego dejstva samog efedrina. Naime, tokom procesa popravke stvaraju se prekidi u vidu intremedijera koji su odgovorni za povećavanje stope migracije DNK što se može detektovati Komet testom (Tuck i sar., 2000).

Poznato je da inicijalna primarna DNK oštećenja kao što su stopa i efikasnost DNK popravke takođe utiču na mutageni potencijal hemikalije. Treba imati na umu da su u našem eksperimentu upotrebljeni humani limfociti, koji imaju ograničen kapacitet popravke i da je detektovano endogeno oštećenje zabeleženo i u drugim istraživanjima (Ori i sar., 2005; Guerci i sar., 2009; McKelvey-Martini sar., 1993). U limfocitima čoveka uočena akumulacija prekida nastalih procesom popravke je posledica slabe snabdevenosti nukleotidima (Collins, 2004). S druge strane odgovor genotoksičnih tretmana može biti zavisn od tipa ćelije (Little i sar., 1989).

Stoga, efikasnost enzima popravke u tretmanu sa efedrinom nam ipak ne dozvoljava da zaključimo da je efedrin genotoksični agens, imajući u vidu prethodne rezultate, ali postoje indicije efedrin može uticati na procese popravke jer je u zajedničkom tretmanu sa inhibitorima reparacije došlo je do povećanog DNK oštećenja. Flint i sar. (2007) su ukazali da adrenalin i noradrenalin osim što indukuju oštećenja DNK utiču i na popravku DNK oštećenja mehanizmima transdukcionih signalnih puteva što nas navodi na pretpostavku da efedrin kao adrenergički agonist mogao dovesti do zastoja u popravci DNK oštećenja.

Na kraju, postavlja se pitanje u kojoj meri povećana migracija DNK u Komet testu predstavlja rezultat endogenih oštećenja DNK ili je nastala direktnim delovanjem oštećujućeg agensa?

Dobijeni rezultati nas navode da izvršimo evaluaciju efekata efedrinsa sa i bez prisustva inhibitora reparacije u *in vivo* uslovima i uz primenu drugih tipova ćelija. U živim sistemima, genotoksičan napad povlači širok stepen ćeljskih odgovora uključujući promenu genske ekspresije, odlaganje ćeljskog ciklusa kao i stimulaciju DNK popravke. Uz to eventualna akumulacija ovakvog oštećenja može aktivirati programiranu ćeljsku smrt.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu eksperimentalnih rezultata testiranja uticaja adrenalina i efedrina na pojavu primarnih oštećenja DNK u humanim limfocitima primenom Komet testa, možemo izvesti sledeće zaključke:

- adrenalin je ispoljio značajno povećanje oštećenja DNK u humanim limfocitima u svim ispitanim koncentracijama (0,001-500 μM) sem kod najniže koncentracije (0,0005 μM)
- postoji razlika u kinetici ispoljavanja oštećenja DNK pod uticajem adrenalina u funkciji vremena. Najizraženiji efekat (0,001-500 μM) adrenalin ispoljo je u najkraćem vremenskom periodu (15 min.) dok je naslabiji efekat (150-300 μM) postignut nakon jednodnevnog tretmana
- antioksidanti (katalaza i kvercetin) su značajno smanjili stepen oštećenja DNK u istovremenom tretmanu sa adrenalinom na osnovu čega se može zaključiti da adrenalin ispoljava genotoksičan efekat putem reaktivnih kiseoničnih vrsta
- efedrin nije ispoljio značajno povećanje oštećenja DNK u humanim limfocitima u ispitanim koncentracijama. Jedino je tretman efedrinom visoke koncentracije (500 μM) indukavao slabo ali statistički značajno oštećenje DNK u humanim limfocitima nakon 15 minuta
- inhibitori reparacije (arabinoza i hidroksiurea) u tretmanu sa efedrinom su značajno povećali stepen oštećenje DNK u humanim limfocitima što ukazuje na prisustvo endogenog oštećenja u humanim limfocitima s obzirom da su inhibitori povećali stepen oštećenja DNK u kotrermanu sa negativnom kontrolom.

8. LITERATURA

- Abourashed, E.A., El-Alfy, A.T., Khan, I.A., Walker, L. (2003) Ephedra in perspective – a current review. *Phytother Res.*, 17: 703-712.
- Adameova, A., Abdellatif, Y., Dhalla, N.S. (2009) Role of the excessive amounts of circulating catecholamines and glucocorticoids in stress-induced heart disease. *Can J Physiol Pharmacol.*, 87: 493–514.
- Aherne, S.A., O'Brien, N.M. (2000) Lack of effect of the flavonoids, myricetin, quercetin, and rutin, on repair of H₂O₂-induced DNA single-strand breaks in Caco-2, Hep G2, and V79 cells. *Nutr Cancer*, 38 (1): 106-115.
- Ahmad, M.E., Shadab, G.G.H.A., Hoda, A., Afzal, M. (2000) Genotoxic effects of estradiol-17 on human lymphocyte chromosomes. *Mutat Res.*, 466: 109–115.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A. (2000) IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutat Res.*, 463(2): 111-72.
- Anderson, D., Dobrzynska, M.M., Basaran, N., (1997) Effect of various genotoxins and reproductive toxins in human lymphocytes and sperm in the Comet assay. *Teratog Carcinog Mutagen.*, 17: 29–43.
- Andersson, M., Agurell, E., Vaghef, H., Bolcsfoldi, G., Hellman, B. (2003) Extended-term cultures of human T-lymphocytes and the comet assay: a useful combination when testing for genotoxicity in vitro? *Mutat Res.*, 540(1): 43-55.
- Attard, E., Vella, K. (2009) The Effects of Ephedrine and Ephedra fragilis Crude Extracts on Human Peripheral Lymphocytes. *Phcog Res.*, 1(2): 38-42.
- Baez, S., Segura-Aguilar, J., Widersten, M., Johansson, A.S., Mannervik, B. (1997) Glutathione transferases catalyse the detoxication of oxidized metabolites (O-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular processes. *Biochem J.*, 324: 25-28.
- Beaulieu, É-É, Kelly, P.A. (1990) Hormones: from molecules to disease, Hermann, 697.
- Behonick, G.S., Novak, M.J., Nealley, E.W., Baskin, S.I. (2001) Toxicology update: the cardiotoxicity of the oxidative stress metabolites of catecholamines (aminochromes). *J Appl Toxicol.*, 21 Suppl 1:S15-22.
- Behrend, L., Henderson, G., Zwacka, R.M. (2003) Reactive oxygen species in oncogenic transformation. *Biochem Soc Trans.*, 31: 1441-1444.

- Bentley, P. J. (2011) *Endocrine Pharmacology: Physiological Basis and Therapeutic Applications*. Cambridge University Press; Reissue edition
- Bindoli, A., Rigobello, M.P., Galzigna, L. (1989) Toxicity of aminochromes. *Toxicol Lett.*, 48: 3–20.
- Bindoli, A., Deeble, D.J., Rigobello, M.P., Galzigna, L. (1990) Direct and respiratory chain-mediated redox cycling of adrenochrome. *Biochim Biophys Acta.*, 1016(3): 349-356.
- Bindoli, A., Rigobello, M.P., Deeble, D.J. (1992) Biochemical and toxicological properties of the oxidation products of catecholamines. *Free Radic Biol Med.*, 13: 391–405.
- Bishun, N.P., Williams D.C. (1977) Stilbestrol and human cancer. *Clin Oncol.*, 3: 75-80.
- Boerrigter M.E., Vijg, J. (1992) Single-strand Break Disappearance in Quiescent and Phytohaemagglutinin-stimulated Human Peripheral Blood Lymphocytes Exposed to a Single Low Dose of γ -radiation. *Int J Radiat Biol.*, 61(1): 95-101.
- Bolton, J.L., Trush, M.A., Penning, T.M., Dryhurst, G., Monks, T.J. (2000) Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol.*, 13:135–160.
- Brambilla, G., Martelli, A., (2009) Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals. *Mutat Res.*, 681: 209-229.
- Brash, D.E., Rudolph, J.A., Simon, J.A., Lin, A., McKenna, G.J., Baden, H.P., Halperin, A.J., Ponten, J. (1991) A role for sunlight in skin cancer : UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 10124-10128.
- Bruno, A., Nolte, K., Chapin, J. (1993) Stroke associated with ephedrine use. *Neurology*, 43: 1313-1316.
- Burcham, P.C. (1998) Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts. *Mutagenesis*, 13:287-305.
- Buxton, G.V., Greenstock, C.L., Helman, W.P., Ross, A.B. (1988).Critical review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxylradicals. *Phys Chem Ref Data*, 17: 513-517.
- CANTOX (2000). *Safety Assessment and Determination of a Tolerable Upper Limit for Ephedra* (Ontario, Canada, CANTOX Health Sciences International).
- Cavalieri, E.L, Li, K.M, Balu, N., Saeed, M., Devanesan, P., Higginbotham, S., Zhao, J., Gross, M.L., Rogan, E.G. (2002) Catechol ortho-quinones: the electrophilic compounds that form depurinating DNA adducts and could initiate cancer and other diseases. *Carcinogenesis*, 23: 1071-1077.
- Cemeli, E., Wagner, E.D., Anderson, D., Richardson, S.D., Plewa, M.J. (2006) Modulation of the cytotoxicity and genotoxicity of the drinking water disinfection

- byproduct Iodoacetic acid by suppressors of oxidative stress. *Environ Sci Technol.*, 40: 1878–1883.
- Chen, Y., McMillan-Ward, E., Kong, J., Israels, S.J., Gibson, S.B. (2008) Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ.*, 15: 171–182.
- Cipollini, M., He, J., Rossi, P., Baronti, F., Micheli, A., Rossi, A.M., Barale, R. (2006) Can individual repair kinetics of UVC-induced DNA damage in human lymphocytes be assessed through the comet assay? *Mutat. Res.*, 601: 150–161.
- Collins, A., Harrington, V. (2002) Repair of oxidative DNA damage: assessing its contribution to cancer prevention. *Mutagenesis* 17(6): 489-493.
- Collins, A.R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molec Biotechnol.*, 26: 249–261.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J. (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*, 17: 1195 –1214.
- Cooper, J.R., Bloom, F.E., Roth, R.H. (1982) The biochemical basis of neuropharmacology, 4th ed. New York: Oxford University Press, pp. 80-128.
- Costa, V.M., Silva, R., Ferreira, L.M., Branco, P.S., Carvalho, F., Bastos, M.L., Carvalho, R.A., Carvalho, M., Remião F. (2007) Oxidation process of adrenaline in freshly isolated rat cardiomyocytes: formation of adrenochrome, quinoproteins, and GSH adduct. *Chem Res Toxicol.*, 20(8):1183-1191.
- Cotelle, S., Ferard, J.F. (1999) Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environ Mol Mutagen.*, 34(4): 246-255.
- Crespo M.E., Bicho, M.P. (1995) Membrane-Mediated Effects of Catecholamines on the DNA of Human Leukocytes: The Role of Reactive Oxygen Species abstract. *Biol. Signals*, 4: 78-85.
- Dhalla, K.S., Ganguly, P.K., Rupp, H., Beamish, R.E., Dhalla, N.S. (1989) Measurement of adrenolutin as an oxidation product of catecholamines in plasma. *Mol Cell Biochem.*, 87: 85–92.
- Dhalla, N.S., Sasaki, H., Mochizuki, S., Dhalla, K.S., Liu, X., Elimban, V. (2001) Catecholamine-induced cardiomyopathy. In: *Cardiovascular Toxicity*, Acosta D (ed.). Raven Press: New York, 269–318.
- Dhalla, N.S., Adameova, A., Kaur, M. (2010) Role of catecholamine oxidation in sudden cardiac death. *Fundam Clin Pharmacol.*, 24(5): 539-546.
- Dhillon, V.S., Singh, J.R., Singh, H., Kler R.S. (1994) In vitro and in vivo genotoxicity evaluation of hormonal drugs V. Mestranol, *Mutation Res.*, 322, 173–183.

- Dhillon, V.S., Dhillon, I.K. (1995) Genotoxicity evaluation of estradiol. *Mutat Res.*, 345: 87–95.
- Dhillon, V.S., Singh, J., Singh, H., Kler, R.S. (1995) In vitro and in vivo genotoxicity of hormonal drugs. VI. Fluoxymesterone. *Mutat Res.*, 342: 103–111.
- Diaz-Llera, S., Gonzalez-Hernandez, Y., Prieto-Gonzalez, E.A., Azoy, A. (2002) Genotoxic effect of ozone in human peripheral blood leukocytes, *Mutat Res.*, 517: 13–20.
- Djelic N. Cytogenetic effects of estradiol, thyroxine, insulin and epinephrine on human lymphocytes *in vitro* (1997) Belgrade, Serbia, Yugoslavia: Faculty of Biology, University of Belgrade (PhD thesis).
- Djelic, N. (2001) Analysis of sister-chromatid exchanges and micronuclei in cultured human lymphocytes treated with insulin. *Folia Biol (Praha)*, 47(1): 28-31.
- Djelic, N., Djelic, D., Spremo-Potparevic, B., Markovic, B., Zivkovic, L. (2003) Cytogenetic analysis of the effects of epinephrine on cultured human lymphocytes. *Acta Veterinaria*, 53: 113-120.
- Djelic, N., Anderson, D. (2003) The effect of the antioxidant catalase on oestrogens, triiodothyronine and noradrenaline in the Comet assay, *Teratog Carcinog Mutagen.*, 23: 69–81.
- Djelic, N., Spremo-Potparevic, B., Bajic, V., Djelic, D. (2006) Sister chromatid exchange and micronuclei in human peripheral blood lymphocytes treated with thyroxine *in vitro*. *Mutat Res.*, 604: 1-7.
- Djelic, N., Djelic, D., Spremo-Potparevic, B., Zivkovic L., Markovic, B., Lozance, O., Blagojevic, M. (2007) Lack of clastogenic effects of L-thyroxine in whole-blood cultured human lymphocytes. *Genet Mol Biol.*, 30(4): 1415-4757.
- Dorbzyska, M.M., Baumgartner, A., Anderson, D. (2004) Antioxidants modulate thyroid hormone and noradrenaline induced DNA damage in human sperm. *Mutagenesis*, 19: 325-330.
- Doyle, H., Kargin, M. (1996) Herbal stimulant containing ephedrine has also caused psychosis. *BMJ*, 313: 756
- Dunnick, J.K., Kissling, G., Gerken, D.K., Vallant, M.A., Nyska, A. (2007) Cardiotoxicity of MaHuang/caffeine or ephedrine/caffeine in a rodent model system. *Toxicol Pathol.*, 35(5): 657-664.
- Eisenhofer, G., Kopin, I.J., Goldstein, D.S. (2004) Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol Rev.*, 56(3):331-349.

- Emerit, I., Kec, M., Levy, A., Feingold, J., Michelson, A.M. (1982) Activated oxygen species as the origin of chromosome breakage and sister-chromatide changes. *Mutat Res.*, 103: 165-172.
- Fazeli G, Oli RG, Schupp N, Stopper H. (2011) The role of the dopamine transporter in dopamine-induced DNA damage. *Brain Pathol.*, 21(3): 237-248.
- Fitzpatrick, F.A. (2001) Inflammation, carcinogenesis and cancer. *Int Immunopharmacol.*, 1:(9-10) 1651-1667.
- Flint, M.S., Baum, A., Chambers, W.H., Jenkins, F.J. (2007) Induction of DNA damage, alteration of DNA repair and transcriptional activation by stress hormones. *Psychoneuroendocrinology*, 32(5): 470-479.
- Flint, M.S., Baum, A., Episcopo, B., Knickelbein, K.Z., Liegey, A.J., Chambers, W.H., Jenkins, F.J. (2012) Chronic exposure to stress hormones promotes transformation and tumorigenicity of 3T3 mouse fibroblasts. *Stress*. PMID 22506837
- Folkman, J. (1971) Transplacental carcinogenesis by stilbestrol. *N Eng J Med.*, 285(7): 404-405.
- Food and Drug Administration (2000) Assessment of Public Health Risks Associated with the use of ephedrine alkaloid-containing dietary supplements.
- Foppoli, C., Coccia, R., Cini, C., Rosei, M.A. (1997) Catecholamines oxidation by xanthine oxidase. *Biochim Biophys Acta.*, 1334: 200–206.
- Franzotti, E.M., Santos, C.V., Rodrigues, H.M., Mourão, R.H., Andrade, M.R., Antonioli, A.R. (2000) Anti-inflammatory, analgesic activity and acute toxicity of *Sida cordifolia* L. (Malva-branca). *J Ethnopharmacol.*, 72: 273–278.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C., Siede, W. (1995) DNA Repair and Mutagenesis. Washington, DC:ASM Press,
- Fukushima, Kazuko (2004) Bioactivity of Ephedra: Integrating Cytotoxicity Assessment with Real-Time Biosensing thesis
- Genova, M.L., Abd-Elsalam, N.M., Mahdy el, S.M., Bernacchia, A., Lucarini, M., Pedulli, G.F., Lenaz, G. (2006) Redox cycling of adrenaline and adrenochrome catalysed by mitochondrial Complex I. *Arch Biochem Biophys.*, 447(2): 167-173.
- Gerlo, E., Sevens, C. (1994) Urinary and plasma catecholamines and urinary catecholamine metabolites in pheochromocytoma: Diagnostic value in 19 cases. *Clin Chem.*, 40: 250–256.
- Glatt, H. (1990) Endogenous mutagens derived from amino acids. *Mutat Res.*, 238: 235-243.

- Glatt, H.R., Metzler, M., Oesch, F. (1979) Diethylstilbestrol and 11 derivatives: a mutagenicity study with *Salmonella typhimurium* *Mutat Res.*, 67: 113-121
- Goldstein, D.S., Eisenhofer, G., Kopin, I.J. (2003) Sources and significance of plasma levels of catechols and their metabolites in humans. *J Pharmacol Exp Ther.*, 305: 800–811.
- Graham, D.G. (1978) Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Mol Pharmacol.*, 14(4): 633-643.
- Griffith RK and Johnson EA (1995) Adrenergic drugs, in *Principles of Medicinal chemistry* (Foye WO, Lemke TL and Williams DA eds) pp 345–365, Williams & Wilkins, Baltimore.
- Grossman, A. (1998). *Clinical Endocrinology*. Maiden, Mass, Blackwell Science, 2nd ed. 1184 pp.
- Güerci, A., Liviác, D., Marcos, R. (2009) Detection of excision repaired DNA damage in the comet assay by using Ara-C and hydroxyurea in three different cell types. *Cell Biol Toxicol.*, 25(1): 73-80.
- Gupta, K., Krishnaswamy, G., Karnad, A., Peiris, A.N. (2002) Insulin: a novel factor in carcinogenesis. *Am J Med Sci.*, 323(3): 140-145.
- Guyton, K.Z., Kensler, T.W. (1993) Oxidative mechanisms in carcinogenesis, *Br Med Bull.*, 49: 523–544.
- Haller, C.A, Duan, M., Benowitz, N.L., Jacob, P.I. (2004) Concentrations of ephedra alkaloids and caffeine in commercial dietary supplements. *J Anal Toxicol.* 28: 145–151.
- Haller, C.A., Jacob, P. 3rd, Benowitz, N.L. (2002) Pharmacology of ephedra alkaloids and caffeine after single-dose dietary supplement use. *Clin Pharmacol Ther.*, 71(6): 421-432.
- Haller, C.A., Benowitz, N.L. (2000) Adverse cardiovascular and central nervous system events associated with dietary supplements containing ephedra alkaloids. *N Engl J Med.*, 343: 1833-1838.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, 186: 1-85.
- Hara, M.R., Kovacs, J.J., Whalen, E.J., Rajagopal, S., Strachan, R.T., Grant, W., Towers, A.J., Williams, B., Lam, C.M., Xiao, K., Shenoy, S.K., Gregory, S.G., Ahn, S., Duckett, D.R., Lefkowitz, R.J.(2011) A stress response pathway regulates DNA damage through β 2-adrenoreceptors and β -arrestin-1. *Nature*, 477(7364):349-353.
- Harman, D. (1956). Aging—a theory based on free-radical and radiation-chemistry. *J Geront.*, 11: 298–300.

- Harris, C.C., Hollstein, M. (1993) Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med.*, 329: 1318-1327.
- Hegedus, Z.L. (2000) The probable involvement of soluble and deposited melanins, their intermediates and the reactive oxygen side-products in human diseases and aging. *Toxicology*, 145: 85–101.
- Henderson, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bourner, C., Windebank, S. (1998) The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*, 13:89–94.
- Herson, P.S., Lee, K., Pinnock, R.D., Hughes, J., Ashford, M.L. (1999) Hydrogen Peroxide induces intracellular calcium overload by activation of a non-selective cation channel in an insulin-secreting cell line. *J Biol Chem.*, 274(2): 833-841.
- Higaki Y., Mikami T., Fujii N., Hirshman M.F., Koyama K., Seino T., Tanaka K., Goodyear, L.J. (2008) Oxidative stress stimulates skeletal muscle glucose uptake through a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 294: 889–897.
- Hill, A., and Wolff, S. (1982) Increased induction of sister chromatid exchange by diethylstilbestrol in lymphocytes from pregnant and premenopausal women. *Cancer Res.*, 42: 893-896.
- Hilliard, C.A, Armstrong, M.J., Bradt, C.I., Hill, R.B., Greenwood, S.K., Galloway, S.M. (1998) Chromosome aberrations in vitro related to cytotoxicity of nonmutagenic chemicals and metabolic poisons. *Environ Mol Mutagen.* 31(4):316-326.
- Holmberg, M. (1989) The effect of deoxynucleosides on repair of DNA breaks in UVC irradiated human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 218: 33–39.
- Horikawa, K., Mohri, T., Tanaka, Y., Tokiwa, H. (1994) Moderate inhibition of mutagenicity and carcinogenicity of benzo[a]pyrene, 1,6-dinitropyrene and 3,9-dinitrofluoranthene by Chinese medicinal herbs. *Mutagenesis*, 9(6): 523-526.
- Horváthová, K., Chalupa, I., Sebová, L., Tóthová, D., Vachálková, A. (2005) Protective effect of quercetin and luteolin in human melanoma HMB-2 cells. *Mutat Res.*, 565(2):105-112.
- Hundal, B.S., Dhillon, V.S., Sidhu, I.S. (1997) Genotoxic potential of estrogens. *Mutat Res.*, 389: 173-181.
- Husain, S., Hadi, S.M. (1998) DNA breakage by L-DOPA and Cu(II): breakage by melanin and bacteriophage inactivation. *Mutat Res.*, 397: 161-168.
- Jezdimirović, B.M. (2005) *Veterinarska Farmakologija*, III prerađeno i dopunjeno izdanje A. D. štamparija “KULTURA”, Bački Petrovac, 189-190.

- Guyton, K.Z., Kensler, T.W. (1993) Oxidative mechanisms in carcinogenesis, *Br. Med. Bull.* 49 523–544.
- Kavelaars, A. (2002) Regulate dexpression of alpha-1adrenergic receptors the immune system. *Brain Behav Immun.*, 16: 799–807.
- Kernan, W.N., Viscoli, C.M., Brass, L.M. et al (2000) Phenylpropanolamine and the risk of hemorrhagic stroke. *N Engl J Med.*, 343: 1826-1832.
- Kjaer, M. (1998) Adrenal medulla and exercise training. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.*, 77:195–199.
- Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M. (2004). The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 44: 239-267.
- Klein, J.A., Ackerman, S.L. (2003) Oxidative stress, cell cycle, and neurodeneneration. *J Clin Invest.*, 111: 785-793.
- Kuznetsova, N.N., Khashimova, Z.S., Sadikov, A.A. (2004) Effect of Ephedrine and Its Derivatives in KML Cell Culture and on Tumor Strains of Animals. *Chem Nat Comp* 40: (3) 258-260.
- Lameris, T.W., Zeeuw, S., Alberts, G., Boomsma, F., Duncker, D.J., Verdouw, P.D., Man in't Veld, A.J., vanden Meiracker, A.H. (2000) Time course and mechanism of myocardial catecholamine release during transient ischemia in vivo. *Circulation.*, 101: 2645–2650.
- Laughton, M.J., Halliwell, B., Evans, P.J., Hoult, J.R.S. (1989) Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin, effect on lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin dependent damage to DNA, *Biochem Pharmacol.*, 38: 2859–2865.
- Lee, M.K., Cheng, B.W., Che, C.T., Hsieh, D.P. (2000) Cytotoxicity Assessment of ma-huang (Ephedra) under different conditions of preparation. *Toxicol Sci.* 56: 424-430.
- Leung, A.Y., Foster, S. (1996) *Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs, and cosmetics*, 2nd ed. edn (New York, Wiley).
- Levay, G., Bodell, W.J. (1993) Detection of dopamine DNA adducts : potential role in Parkinson's disease. *Carcinogenesis* 14(6): 1241-1245.
- Levay, G., Ye, Q., Bodell, W.J. (1997) Formation of DNA adducts and oxidative base damage by copper-mediated oxidation of dopamine and 6-hydroxydopamine. *Exp Neurol.*, 146: 570–574.
- Liehr, J.G. (2001) Genetoxicity of the steroidal estrogens oestrone and oestradiol: posible mechanism of uterine and mammary cancer development, *Human Reprod Update*, 7: 273-281.

- Liles J.T., Dabisch, P.A., Hude, K.E., Pradhan, L., Varner, K.J., Porter, J.R., Hicks, A.R., Corll, C., Baber, S.R., Kadowitz, P.J. (2006) Pressor responses to ephedrine are mediated by a direct mechanism in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.*, 316: 95–105.
- Little, J.B., Ueno, A.M., Dahlberg, W.K. (1989) Differential response of human and rodent cell lines to chemical inhibition of the repair of potentially lethal damage. *Radiat Environ Biophys.*, 28: 193–202.
- Liu, X., Wu, W.K., Yu, L., Sung, J.J, Srivastava, G., Zhang, S.T., Cho, C.H. (2008) Epinephrine stimulates esophageal squamous-cell carcinoma cell proliferation via beta adrenoceptor-dependent transactivation of extracellular signal-regulated kinase /cyclooxygenase-2 pathway. *J Cell Biochem.*, 105(1): 53-60.
- Loft, S., Poulsen, H. (1996) Cancer risk and oxidative DNA damage in men. *J Mol Med.*, 74: 297- 312.
- Lundoquist, I., Ericson, L.E. (1978) 8-Adrenergic insulin release and adrenergic innervation of mouse pancreatic islets. *Cell Tissue Res.*, 193: 73-85.
- Martin, F.L., Cole, K.J., Orme, M.H., Grover, P.L., Phillips D.H., Venitt, S. (1999) The DNA repair inhibitors hydroxyurea and cytosine arabinoside enhance the sensitivity of the alkaline single-cell gel electrophoresis ('comet') assay in metabolically-competent MCL-5 cells. *Mutat Res.* 445(1): 21-43.
- Manfred Metzler (2002) Endocrine Disruptors – Part II The Handbook of Environmental Chemistry, Genotoxic Potential of Natural and Synthetic Endocrine Active Compounds Volume 3M, 492-493
- Marcon, F., Andreoli, C., Rossi, S., Verdina, A., Galati, R. Crebelli, R. (2003) Assessment of individual sensitivity to ionizing radiation and DNA repair efficiency in a healthy Mutat Res 541(1-2): 1-8.
- Masserano, J. M., Baker, I., Venable, D., Gong, L., Zullo, S.J., Merril, C.R., Wyatt, R.J. (2000) Dopamine induces cell death, lipid peroxidation and DNA base damage in a catecholaminergic cell line derived from the central nervous system. *Neurotox Res.*, 1:171–179.
- McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B.N. (1975) Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella*/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc Nat J Acad Sei U. S. A.*, 72: 5135-5139.
- McGregor, D.B., Raich, C.G., Brown, A., Edwards, I., Reynolds, D., West K., Willington S. (1988) Reactivity of catecholamines and related substances in mouse lymphoma L5178Y Cell assay for mutagens. *Environ Mol Mutagen*, 11: 523-544.
- McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H., Schmezer, P., Pool-Zobel, B L., De Meo, M.P., Collins, A. (1993) The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat Res.*, 288(1): 47- 63.

- Miller, D.M., Buettner, G.R., Aust, S.D. 1990 Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med.*, 8(1): 95-108.
- Minneman, K.P. (1988) α_1 -adrenergic receptor subtypes, inositol phosphates and sources of cell calcium. *Pharmacol Rev.*, 40: 87-119.
- Miura T., Muraoka S., Fujimoto Y., Zhao K. (2000) DNA damage induced by catechol derivatives. *Chem Biol Interact.*, 126: 125-136.
- Miyazaki, I., Asanuma, M. (2008) Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. *Acta Med Okayama*, 62: 141–150.
- Moldeus, P., Nordenskjold, M., Bolcsfoldi, G., Eiche, A., Haglund, U., Lambert, B. (1983) Genetic toxicity of dopamine. *Mutat Res.*, 124: 9-24.
- Molina P.E. (2004) Endocrine physiology. The McGraw-Hill Companies Inc, 298.
- Moller, P. (2005) Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, 96 Suppl 1: 1-42.
- Monks, T.J., Lau, S.S. (1992) Toxicology of quinone-thioethers. *Crit Rev Toxicol.*, 22: 243–270.
- Morimoto, I., Watanabe, F., Osawa, T., Okitsu, T., Kada, T. (1982) Mutagenicity screening of crude drugs with *Bacillus subtilis* rec-assay and *Salmonella*/microsome reversion assay. *Mutat Res.* 97: 81-102.
- Morita, T., Asano, N., Awogi, T., Sasaki, Y.F., Sato, S., Shimada, H., Sutou, S., Suzuki, T., Wakata, A., Sofuni, T., Hayashi, M. (1997) Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (groups 1, 2A and 2B). The summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS MMS. Collaborative Study of the Micronucleus Group Test. Mammalian Mutagenicity Study Group. *Mutat Res.*, 389: 3–122.
- Murakami, H., Shirahata, S., Hori, C., Yoshii, H., Yamada, K., Shinohara, K., Omura, H. (1979) DNA breaking reaction with catecholamines. *Agric Biol Chem.*, 43: 1619-1624.
- Musatov, S.A., Anisimov, V.N., André, V., Vigreux, C., Godard, T, Sichel, F. (1999) Effects of melatonin on N-nitroso-N-methylurea-induced carcinogenesis in rats and mutagenesis in vitro (Ames test and COMET assay). *Cancer Lett.* 138(1-2): 37-44.
- Nam, N.H., Lee, C.W., Hong, D.H., Kim, H.M., Bae, K.H., Ahn, B.Z. (2003) Antiinvasive, antiangiogenic and antitumour activity of *Ephedra sinica* extract. *Phytother Res.* 17(1):70-76.
- National Toxicology Program (NTP) (1986). Toxicology and Carcinogenesis Studies of Ephedrine Sulfate (CAS No. 134-72-5) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). Natl Toxicol Program Tech Rep Ser 307, 1-186.

- National Toxicology Program (NTP) (1990). Toxicology and Carcinogenesis Studies of l-Epinephrine hydrochloride (CAS No. 55-31-2) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice
- Obermeier, M.T., White, R.E., Yang, C.S. (1995) Effects of bioflavonoids on hepatic P450 activities. *Xenobiotica* 25: 575–584.
- Okamoto H (1985) The molecular basis of experimental diabetes. Degeneration, oncogenesis and regeneration of pancreatic β -cells of the islets of Langerhans. *Bioessays*, 2: 15–21
- Okamoto T., Adachi K., Muraishi A., Seki Y., Hidaka T.H. (1996) Induction of DNA breaks in cardiac myoblast cells by norepinephrine. *Biochem Mol Biol Int.*, 38: 821–827.
- Ori, Y., Herman, M., Weinstein, T., Chagnac, A., Zevin, D., Milo, G. (2005) Spontaneous DNA repair in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 320:578–586.
- Pederson, K.J., Kuntz, D.H., Garbe, G.J. (2001) Acute myocardial ischemia associated with ingestion of bupropion and pseudoephedrine in a 21-year-old man. *Can J Cardiol.*, 17: 599-601.
- Philips, B.J, James, T.B., Anderson, D. (1982) Genetic damage in CHO cells exposed to enzymically generated active oxygen species. *Mutat Res.*, 126: 265-271.
- Pinto, M.R. (1986) Possible effects of hormonal contraceptives on human mitotic chromosomes, *Mutat Res.*, 69, 149–157.
- Radakovic, M., Djelic, N., Stanimirovic, Z., Plecas-Solarovic, B., Spremo-Potparevic, B., Zivkovic Lada, Bajic, V. (2011). Evaluation of the effects of ephedrine on human lymphocytes in the comet assay. *Acta Vet.*, 61: 363-371.
- Raymond, J.R., Hnatowich, M., Lefkowitz, R.J., Caron, M.G. (1990) Adrenergic receptors. Models for regulation of signal transduction processes. *Hypertension*, 15:119-131.
- Raymondos, K., Panning, B., Leuwer, M., Brechelt, G., Korte, T., Niehaus, M., Tebbenjohanns, J., Piepenbrock S. (2000) Absorption and hemodynamic effects of airway administration of adrenaline in patients with severe cardiac disease. *Ann Intern Med*, 132: 800–803.
- Remião, F., Carvalho, M., Carmo, H., Carvalho, F., Bastos, M.L. (2001) Copper enhances isoproterenol toxicity in isolated rat cardiomyocytes: effects on oxidative stress. *Cardiovasc Toxicol.*, 1: 195–204.
- Remião, F., Rettori, D., Han, D., Carvalho, F., Bastos, M.L., Cadenas, E. (2004) Leucoisoprenochrome-o-semiquinone formation in freshly isolated adult rat cardiomyocytes. *Chem Res Toxicol.*, 17: 1584–1590.

- Retel, J., Hoebee, B., Braun, J.E., Lutgerink, J.T., Van den Akker E., Wanamarta, A.H, Joenje, H., Lafleur, M.V. (1993) Mutational specificity of oxidative DNA damage. *Mutat Res*, 299: 165-182.
- Richold, M. (1988) The genotoxicity of trenbolone, a synthetic steroid. *Arch Toxicol.*, 61: 249–258.
- Rietjens, I.M., Martena, M.J., Boersma, M.G., Spiegelberg, W., Alink, G.M. (2005) Molecular mechanisms of toxicity of important food-borne phytotoxins. *Mol Nutr Food Res.*,49(2):131-158.
- Roberts, A., Bar-Or, D., Winkler, J.V., Rael, L.T. (2003) Copper-induced oxidation of epinephrine: protective effect of D-DAHK, a synthetic analogue of the high affinity copper binding site of human albumin. *Biochem Biophys Res Commun.*, 304(4):755-757.
- Rojas, E., Lopez, M.C., Valverde, M. (1999) Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.*, 722(1-2): 225-254.
- Roman, M.C. (2004) Determination of ephedrine alkaloids in botanicals and dietary supplements by HPLC-UV: collaborative study. *J AOAC Int.*, 87(1):1-14.
- Rudiger, H.W., Haenisch, F., Metzler, M., Oesch, F., Glatt, H. R. (1979) Metabolites of diethylstilbestrol induce sister chromatid exchange In human cultured fibroblasts. *Nature (Lond.)*, 287: 392-394.
- Ruffolo, R.R., Bondinell, W., Hieble, J.P. (1995) α - and β - Adrenoceptors, From the gene to the Clinic. 2. Structure activity relationships and therapeutic applications. *J Med Chem.*, 38: 3681-3716
- Rump, A.F., Klaus, W. (1994) Cardiotoxicity of adrenochrome in isolated rabbit hearts assessed by epicardial NADH fluorescence. *Arch Toxicol.*, 68(9): 571-575.
- Samenuk, D., Link, M S., Hormoud, M. K., Caonteras, R., Theoharides, T.C., Wang, P. J., Estes, N.A I. (2002). Adverse cardiovascular events temporally associated with Ma Huang, a herbal source of ephedrine. *Mayo Clin Proc.*, 77: 12–16.
- Sanders, V.M., Kasprovicz, D.J., Kohm, A.P., Swanson, M.A. (2001) Neurotransmitter receptors on lymphocytes and other lymphoid cells. In: Ader, V.M., Cohen, Felten (Eds.), *Psychoneuroimmunology*, 3rd ed R Academic Press, San Diego.
- Sanders, V.M., Kohm, A.P. (2002) Sympathetic nervous system interaction with the immune system. *Int Rev Neurobiol.*, 52: 17-41.
- Sasaki, Y.F., Sekihashi, K., Izumiyama, F., Nishidate, E., Saga, A., Ishida, K. Tsuda, S. (2000) The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database. *Crit Rev Toxicol.*, 30, 629–799.

- Sato, Y., Sakakibara, Y., Oda, T., Aizu-Yokota, E., Ichinoseki, K. (1992) Effect of estradiol and ethinylestradiol on microtubule distribution in Chinese hamster V79 cells. *Chem Pharm Bull.*, 40: 182–184.
- Scandalios, J.G. (2002) The rise of ROS. *TIBS*, 27: 483-486.
- Schaneberg, B.T., Crockett, S., Bedir, E., Khan, I.A. (2003) The role of chemical fingerprinting: application to Ephedra. *Phytochemistry*, 62(6): 911-918.
- Schuler, M., Hasegawa, L., Parks, R., Metzler, M., Eastmond, D.A. (1998) Dose-response studies of the induction of hyperdiploidy and polyploidy by diethylstilbestrol and 17 β -estradiol in cultured human lymphocytes using multicolor fluorescence in situ hybridization. *Environ Mol Mutagen.*, 31: 263–273.
- Scudiero, D., Norin, A., Karran, P., Strauss, B. (1976) DNA excision-repair deficiency of human peripheral blood lymphocytes treated with chemical carcinogens. *Cancer Res.*, 36(4): 1397-1403.
- Seifter, J. Ratner, A., Sloane, D. (2005) *Concepts in Medical Physiology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Serova J.A., Kerkis Y.Y. (1974) Cytogenetic effect of some steroid hormones and change in the activity of lysosomal enzymes in vitro. *Sov Genet.*, 10: 387–392.
- Sever, P.S., Dring, L.G., Williams, R.T. (1975) The metabolism of (–)-ephedrine in man. *Eur J Clin Pharm.*, 9: 193–198.
- Shadab, G.G.H.A., Ahmad, M.E, Afzal, M. (1999) Effect of hydrocortisone on human lymphocyte chromosomes in vitro. *Indian Biologist.*, 31:1-10.
- Shekelle, P.G., Hardy, M.L. , Morton, S.C. , Maglione, M., Mojica, W.A., Suttorp, M.J., Rhodes, S.L. , Jungvig, L., Gagne, J. (2003) Efficacy and safety of ephedra and ephedrine for weight loss and athletic performance. *J Am Med Assoc.*, 289(12): 1537–1545.
- Shen, H.-M., Ong, C.N. (2000) Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with sperm function and male infertility. *Free Rad Biol Med.*, 28:529–536.
- Sherwood, L. (2009) *Human Physiology: From Cells to Systems*. Thomson Brooks/Cole. English 7th Revised ed. 928.
- Sheu, S.J. (1997) Identification by chemical analysis of botanical sources of commercial samples of Chinese herbal drugs. *J Food Drug Anal.*, 5: 285–294.
- Singal, P.K., Dhalla, A.K., Hill, M., Thomas, T.P. (1993) Endogenous antioxidant changes in the myocardium in response to acute and chronic stress conditions. *Mol Cell Biochem.*, 129: 179-186.

- Singh, N.P, Mc Coy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.*, 175: 184-191
- Singh, H., Singh, J.R., Dhillon, V.S., Bali, D., Paul, H. (1994) *In vitro* and *in vivo* genotoxicity evaluation of hormonal drugs II. Dexamethasone. *Mutat Res.*, 308: 89–97.
- Smythies, J., Iuliis, A.D., Zanatta, L., Galzigna, L. (2002) The biochemical basis of Parkinson's disease: the role of catecholamine *o*-quinones: a review-discussion. *Neuro Res.*, 4: 77–81.
- Snyder, R.D., Friedman, M.B. (1998) Enhancement of cytotoxicity and clastogenicity of l- DOPA and dopamine by manganese and copper. *Mutat Res.*, 405(1): 1-8.
- Sousa, R.L., Marletta, M.A. (1985) Inhibition of cytochrome P450 activity in rat liver microsomes by the naturally occurring flavonoid, quercetin. *Arch Biochem Biophys.*, 240: 345–357.
- Speit, G., Hartmann, A. (1995) The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay), *Mutagenesis* 10: 555–559.
- Spencer, J.P., Jenner, A., Aruoma, O.I., Evans, P.J., Kaur, H., Dexter, D.T., Jenner, P., Lees, A.J., Marsden, D.C., Halliwell, B. (1994) Intense oxidative DNA damage promoted by L-dopa and its metabolites: implications for neurodegenerative disease. *FEBS Lett.*, 353: 246–250.
- Spencer, J.P.E., Jenner, P., Daniel, S.E., Lees, A.J., Marsden, D.C., Halliwell, B. (1998) Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. *J Neurochem.*, 71: 2112–2122.
- Stanimirović, Z., Stevanovic, J., Jovanovic S., Andjelkovic, M. (2005) Evaluation of genotoxic effects of fumagillin by cytogenetic tests *in vivo*. *Mutat Res.*, 628(1): 1-10.
- Stanimirović, Z., Stevanovic, J., Bajic V., Radovic, I. (2007) Evaluation of genotoxic effects of Apitol (cymiazole hydrochloride) *in vitro* by measurement of sister chromatid exchange. *Mutat Res.*, 588(2): 152-157.
- Spencer, W.A., Jeyabalan, J., Kichambre, S., Gupta, R.C. (2011) Oxidatively generated DNA damage after Cu(II) catalysis of dopamine and related catecholamine neurotransmitters and neurotoxins: Role of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.*, 50(1):139-147.
- Stokes, A.H., Hastings, T.G., Vrana K.E. (1999) Cytotoxic and genotoxic potential of dopamine. *J Neurosci Res.* 55(6): 659-65.

- Stopper, H., Schupp, N., Fazeli, G., Dietel, B., Queisser, N., Walitza, S., Gerlach, M. (2009) Genotoxicity of the neurotransmitter dopamine in vitro. *Toxicol In Vitro* 23(4): 640-646.
- Su, F., Ouyang, N., Zhu, P., Ouyang, N., Jia, W., Gong, C., Ma, X., Xu, H., Song, E. (2005) Psychological stress induces chemoresistance in breast cancer by upregulating *mdr1*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 329(3): 888-897
- Szeto, Y.T., Collins, A.R., Benzie, I.F.F. (2002) Effects of dietary antioxidants on DNA damage in lysed cells using a modified comet assay procedure *Mutat Res.*, 500: 31–38.
- Tice R. R. (1995) The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoresis technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. Phillips D. H. Venitt S. eds. *Environ Mutagen*, 315-339, Bios Scientific Publishers Oxford, United Kingdom.
- Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J., Hiai, H. (1995) Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.*, 358: 1-3
- Tsujimoto, G., Tsujimoto, A., Suzuki, E., Hashimoto, K. (1989) Glycogen phosphorilase activation by two different $\alpha 1$ -adrenergic receptor subtypes: metoxamine selectivity stimulates a putative $\alpha 1$ -adrenergic receptor subtypes ($\alpha 1$) that couples with Ca^{2+} influx. *Mol Pharmacol.*, 36: 166-176.
- Tsutsui, T., Tamura, Y., Hagiwara, M., Miyachi, T., Hikiba, H., Kubo, C., Barrett, J.C. (2000) Induction of mammalian cell transformation and genotoxicity by 2-methoxyestradiol, an endogenous metabolite of estrogen. *Carcinogenesis*, 21:735–740.
- Tuck, A., Smith, S., Larcom, L. (2000) Chronic lymphocytic leukemia lymphocytes lack the capacity to repair UVC-induced lesions, *Mutat Res.*, 459: 73–80.
- Ulfelder, H. (1976) DES transplacental teratogen and possibly also carcinogen. *Teratol Cancer Res.*, 40: 102-103.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J. (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Mol Cell Biochem.*, 266: 37–56.
- Vansal, S.S., Feller, D.R. (1999). Direct effects of ephedrine isomers on human beta-adrenergic receptor subtypes. *Biochem Pharmacol.*, 58: 807–810.
- Varagic, V.M., Milošević, M.P. (2003) *Farmakologija* (18.izd.), Beograd, Elit-Medica, 250-252.
- Vijayalaxmi, Reiter, R.J., Leal, B. Z. Meltz, M.L. (1996) Effect of melatonin on mitotic and proliferation indices, and sister chromatid exchange in human peripheral blood lymphocytes. *Mutat Res.*, 357: 187-192.

- Waldum, H. L., Brenna, E., Sandvik, A. K., Syversen, U., Falkmer, S. (1998) Hormones and carcinogenesis. *Endocrine-Related Cancer* 5(1): 45-48
- Weinberg, R. A. (1996) How cancer arises. *Scientific American*, 62-70.
- Wheeler, W.J., Cherry, L.M., Downs, T., Hsu, T.C. (1986) Mitotic occurring and aneuploidy induction by naturally occurring and synthetic estrogens in Chinese hamster cells in vitro. *Mutat Res.*, 171: 31-41.
- Wilkinson, G., Beckett, A., (1968) Absorption metabolism and excretion of the ephedrine in man: II. Pharmacokinetics. *J Pharm Sci.*, 57: 1933-1938.
- Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. (2004) Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit Rev Food Sci Nutr.*, 44(4): 275-95.
- Willner, C. (2004) An overview of the pathophysiology of neurodegenerative disorders. *Altern Ther Health Med*, 10: 26-34.
- Wiseman, H., Halliwell, B. (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J.* 313:17-29.
- World Health Organization (1999) *Herba Ephedrae*. In WHO monographs on selected medicinal plants (Geneva, Switzerland, World Health Organization), pp. 145-153.
- Wu, L.L., Chiou, C.C., Chang, P.Y., Wu, J.T. (2004) Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta*, 339: 1-9.
- Yamaguchi, T. (1981). Mutagenicity of low molecular substances in various generating systems. *Agric Biol Chem.*, 45: 327-330.
- Yao, H., Duan, Z., Wang, M., Awonuga, A.O., Rappolee, D., Xie, Y. (2009) Adrenaline induces chemoresistance in HT-29 colon adenocarcinoma cells. *Cancer Genet Cytogenet.*, 190(2): 81-87.
- Yared, E., McMillan, T.J., Martin, F.L. (2002) Genotoxic effects of oestrogens in breast cells detected by the micronucleus assay and the Comet assay. *Mutagenesis*, 17: 345-352.
- Zhong, J.-q., Dorian, P. (2005) Epinephrine and vasopressin during Cardio pulmonary resuscitation. *Resuscitation*, 66: 263-269.
- Zvetkova, E., Koshucharoff S., Hadjioloff, A.I. (1979) Cytochemistry of nucleoproteins (RNP and DNP) and some cationic proteins in the peripheral blood leucocytes of patients with lung cancer. *Folia Haematol.* 106:205-223

<http://www.worldofmolecules.com/emotions/Epinephrine.png>

<http://themedicalbiochemistrypage.org/images/catecholaminesynthesis.jpg>

<http://www.epharmacognosy.com/2012/07/phenylalanine-derived-alkaloids.html>

Biografija

Milena Radaković je rođena 11.03.1983. godine u Beogradu. Srednju školu je završila u Beogradu u Medicinskoj školi Zvezdara. Na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu diplomirala je jula 2007. godine. Iste godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Genetika. U periodu od 2008-2010. godine je bila stipendista ministarstva za Nauku i tehnološki razvoj. Od 2011. zaposlena je kao istraživač saradnik na Katedri za biologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu.

Milena Radaković je do sada publikovala 5 naučnih radova sa SCI liste (3 rada kategorije M21 i 2 rada kategorije M23). Učestvovala je sa 9 saopštenja na međunarodnim naučnim skupovima i jednim saopštenjem na skupu od nacionalnog značaja. Učestvovala je na tri Nacionalna projekta finansirana od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Član je Srpskog biološkog društva, Društva genetičara Srbije i sekcije za mutagenezu Društva genetičara Srbije. Ima aktivno znanje engleskog i služi se francuskim jezikom.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Милена Радаковић _____

број индекса _____ ГО 070001 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај адреналина и ефедрина на појаву примарних оштећења ДНК у

лимфоцитима човека *in vitro*

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанта

У Београду, _____ 18.01.2013. _____

Радаковић Милена

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милена Радаковић

Број индекса ГО 070001

Студијски програм Генетика

Наслов рада Утицај адреналина и ефедрина на појаву примарних оштећења ДНК
у лимфоцитима човека *in vitro*

Ментор академик Марко Анђелковић и проф. др Нинослав Ђелић

Потписани/а Милена Радаковић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанта

У Београду, 18.01.2013.

Радаковић Милена

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Утицај адреналина и ефедрина на појаву примарних оштећења ДНК у

лимфоцитима човека *in vitro*

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанта

У Београду, 18.01.2013.

Раданко Милошевић

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.