

IN VIVO PROTEKTIVNI EFEKAT EKSTRAKATA BILJKE *Lysimachia vulgaris* NA DNK OŠTEĆENJA INDUKOVANA ETIL METANSULFONATOM

Sanja Lj. Matić¹, Nikola Srećković², Jelena S. Katanić Stanković¹, Vladimir Mihailović²

Izvod: *In vivo* genotoksična aktivnost metanolnih ekstrakata nadzemnog dela i korena biljke *Lysimachia vulgaris* L. i potencijalna sposobnost zaštite DNK od oštećenja indukovana etil metansulfonatom ispitane su primenom komet testa na *Drosophila melanogaster*. Dobijeni rezultati nisu otkrili značajne razlike u indeksu genetičkog oštećenja između tretiranih grupa (20, 40, 80 mg mL⁻¹ hrane za *Drosophila*) i negativne kontrole, ukazujući na negenotoksični efekat ekstrakata. Kombinovani tretmani ekstrakata i etil metansulfonata pokazali su statistički značajno smanjenje oštećenja DNK sa procentom redukcije iznad 80%. Rezultati sugerišu da bi metanolni ekstrakti biljke *L. vulgaris* mogli da se koriste kao prirodni agensi u prevenciji bolesti povezanih sa oštećenjem DNK.

Ključne reči: *Lysimachia vulgaris* L., komet test, DNK oštećenje, ekstrakti

Uvod

Lysimachia vulgaris L., u narodu poznata kao protivak i trava od metilja, je višegodišnja biljka tradicionalno iz porodice Primulaceae, koja je na osnovu nedavnih molekularno-filogenetskih analiza klasifikovana u porodicu Myrsinaceae (Podolak i sar., 2013a). Mnoge vrste iz roda *Lysimachia* se zahvaljujuću svojim farmakološkim osobinama koriste u tradicionalnoj medicine kao analgetici, antihelmintici i za lečenje holecistitisa (Baytop, 1999). Vrsta *L. nummularia* se u medicini koristi od davnina za lečenje bolesti poput dijareje, groznice, artritisa, tuberkuloze i kožnih oboljenja (Podolak i sar., 2013b), dok se *L. christinae* koristi u lečenju kamena u žuči i bubregu. Vrsta *L. vulgaris* blagotvorno deluje na gastrointestinalna oboljenja (Dalar i sar., 2018; Winston, 2021). Koristi se u lečenju groznice, čira, dijareje, dizenterije, kao antiseptik, analgetik, ekspektorant i za zarastanje rana (Turker i Guner, 2013).

Nekoliko dosadašnjih studija proučavalo je antitumorska, antibakterijska, antifungalna, citotoksična i antioksidativna svojstva biljke *L. vulgaris* (Podolak i sar., 1998; Toth i sar., 2014; Yildirim i sar., 2017). Do danas nije sprovedena nijedna studija o uticaju nadzemnog dela i korena ove biljke na DNK. Imajući u vidu da na osnovu pregleda dostupne literature nisu pronađeni podaci o *in vitro* i/ili *in vivo* genotoksičnoj i potencijalnoj antigenotoksičnoj aktivnosti ove biljne vrste, cilj ove

¹Univerzitet u Kragujevcu, Institut za informacione tehnologije Kragujevac, Sektor za prirodno-matematičke nauke, Jovana Cvijića bb, Kragujevac, Srbija (sanjamatic@kg.ac.rs);

²Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno-matematički fakultet, Institut za hemiju, Radoja Domanovića 12, Kragujevac, Srbija.

studije je bio da se ispita *in vivo* genotoksična i potencijalna DNK protektivna sposobnost ekstrakata korena i nadzemnog dela biljke *L. vulgaris*.

Materijal i metode rada

Biljni materijal i priprema ekstrakata

Biljni materijal je sakupljen u period cvetanja u selu Veliko Krčmare, opština Rača, okolina Kragujevca, junu 2019. godine. Nakon sušenja na sobnoj temperaturi, nadzemni deo i koren su samleveni i ekstrahovani metanolom, a dobijeni ekstrakti su filtrirani i upareni do suva.

Tretman i postupak

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

Za utvrđivanje genotoksičnog i antigenotoksičnog efekta metanolskih ekstrakata korena i nadzemnog dela biljke *L. vulgaris* koristi se prednji deo zadnjeg creva larvi na trećem stupnju razvića laboratorijske linije "*Canton S*". Jedna grupa larvi (10 larvi po grupi) starosti 72±2 sata (24±1°C) prebacuje se samo na hranjivi supstrat i predstavlja negativnu kontrolnu grupu, druga grupa na supstrat sa etil metansulfonatom (EMS, 1 ml, 1 mM) i predstavlja pozitivnu kontrolnu grupu, treća, četvrta i peta grupa larvi se prebacuje na supstrat sa metanolskim ekstraktima korena ili nadzemnog dela biljke *L. vulgaris* (20, 40, 80 mg mL⁻¹ hrane za *Drosophila*) i šesta grupa na supstrat sa metanolskim ekstraktom korena ili nadzemnog dela biljke *L. vulgaris* (80 mg mL⁻¹ hrane za *Drosophila*) i etil metansulfonatom (1 ml, 1 mM).

Nakon 24 sata larve iz navedenih grupa se ispiraju sa 50 mM PSS (119.0 NaCl, 25 NaHCO₃, 11.1 glukoza, 4.7 KCl, 1.6 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, 1.2 KH₂PO₄, pH 7.4). Odstrani se prednji deo zadnjeg creva i prebaci u ependorf sa 50 mM PSS i pripremi se ćelijska suspenzija (Mukhopadhyay i sar., 2004). U 80 µl uzorka ćelijske suspenzije dodaje se 80 µl LMPA (eng. *low melting point agarose*) u PbS-u, a zatim se odpipetira 75 µl i nanosi se na prethodno pripremljene pločice. Nakon 2 sata na 4°C u puferu za lizu, pločice se prebacuju u pufer za elektroforezu (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH 13.0) 10 minuta pre horizontalne elektroforeze na 0.7 V/cm (300 mA/25 V, 15 minuta). Nakon neutralizacije sa 0.4 M Tris-HCl, pH 7.4, pločice se boje etidijum bromidom (75 µl). Primenom fluorescentnog mikroskopa Nikon (Ti-Eclipse) analiziraju se i slikaju ćelije, za svaki uzorak 3 merenja po 100 ćelija.

Stepen oštećenja DNK utvrđuje se pomoću kvalitativne metode distribucije oštećenja. "Komete" su vizualno analizirane i klasifikovane u pet kategorija (Collins, 2004), 0, 1, 2, 3 i 4, gde 0 ukazuje na odsustvo DNK oštećenja, a 4 na najviši stepen oštećenja. Na osnovu raspodele komet klasa za svaku grupu izračunat je indeks

genetičkog oštećenja (GDI, eng. *genetic damage index*) prema Azqueta i Collins (2011).

Statistička analiza

Rezultati ispitivanja genotoksične i antigenotoksične aktivnosti su izraženi kao srednja vrednost ± SEM. Statistička procena podataka je analizirana sa ANOVA testom korišćenjem SPSS statističkog softverskog paketa, verzija 13.0 za Windows. Nivo značajnosti je postavljen na $p < 0.05$.

Rezultati istraživanja i diskusija

Na osnovu pregledane dostupne literature, ovo su prvi rezultati ispitivanja *in vivo* genotoksične i potencijalne DNK protektivne sposobnosti ekstrakata nadzemnog dela i korena biljke *L. vulgaris*.

Tabela 1. Genotoksična i antigenotoksična aktivnost metanolskog ekstrakta nadzemnog dela biljke *Lysimachia vulgaris*
 Table 1. Genotoxic and antigenotoxic activity of aerial part methanol extracts of *Lysimachia vulgaris*

	Komet klase <i>Comet class</i>					Indeks genetičkog oštećenja ^a <i>Genetic damage index^a</i>	%R ^c
	0	1	2	3	4		
NK ^b	73.2±0.32	26.8±0.84	/	/	/	0.27±0.64†	/
EMS ^c	/	/	25.3±0.20	38.6±0.51	36.1±0.41	3.11±0.82*	/
20	76.5±0.33	17.6±0.24	5.9±0.32	/	/	0.29±0.64†	/
40	68.5±0.55	23.4±0.64	8.1±0.44	/	/	0.40±0.91†	/
80	61.2±0.51	20.1±0.55	18.7±0.23	/	/	0.58±0.54*†	/
80+EMS	59.1±0.54	15.9±0.47	12.5±0.62	9.2±0.22	3.3±0.17	0.82±0.64*†	80.6

^aRezultati predstavljaju srednja vrednost±SEM tri nezavisna eksperimenta; ^a*Values represented mean± SEM of three independent experiments*

^bNK; negativna kontrola; ^b*NC; negative control*

^cEMS; etil metansulfonat, 1 mM; ^c*EMS; ethyl methansulfonate, 1 mM*

^d%R; procenat redukcije; ^d*%R; percentage of reduction*

* $p < 0,05$ u odnosu na negativnu kontrolu; † $p < 0,05$ u odnosu na pozitivnu kontrolu. * $p < 0.05$ when compared with the negative control; † $p < 0.05$ when compared with the positive control.

U Tabeli 1 prikazana je genotoksična i antigenotoksična aktivnost ekstrakta nadzemnog dela biljke *L. vulgaris* na osnovu kvalitativne analize ćelija dobijenih izolovanjem prednjeg dela zadnjeg creva larvi vrste *D. melanogaster*. U odnosu na larve tretirane sa EMS-om koje pokazuju visok nivo genotoksičnosti sa

dominacijom klasa 2, 3 i 4, raspodela komet klasa kod larvi tretiranih sa ekstraktom nadzemnog dela je u okviru klasa 0, 1 i 2.

Statistički značajne razlike u indeksu genetičkog oštećenja u odnosu na pozitivnu kontrolnu grupu se mogu uočiti nakon tretmana sa ekstraktom. *In vivo* kombinovani tretman sa EMS-om i ekstraktom u koncentraciji od 80 mg mL⁻¹ uzrokovao je statistički značajne promene u odnosu na pozitivnu kontrolnu grupu sa procentom redukcije od 80.6%.

Raspodela komet klasa nakon pojedinačnog tretmana sa tri koncentracije (20, 40 i 80 mg mL⁻¹) ekstrakta korena biljke *L. vulgaris* i kombinovanog tretmana sa najvišom koncentracijom ekstrakta i EMS-om prikazana je u Tabeli 2.

Tabela 2. Genotoksična i antigenotoksična aktivnost metanolskog ekstrakta korena biljke *Lysimachia vulgaris*

Table 2. Genotoxic and antigenotoxic activity of root methanol extracts of *Lysimachia vulgaris*

	Komet klase <i>Comet class</i>					Indeks genetičkog oštećenja ^a <i>Genetic damage index^a</i>	%R ^d
	0	1	2	3	4		
NK ^b	73.2±0.32	26.8±0.84	/	/	/	0.27±0.64 [†]	/
EMS ^c	/	/	25.3±0.20	38.6±0.51	36.1±0.41	3.11±0.82 [*]	/
20	75.2±0.81	20.5±0.32	4.3±0.74	/	/	0.29±0.32 [†]	/
40	74.2±0.51	19.5±0.30	6.3±0.24	/	/	0.32±0.32 ^{*†}	/
80	69.1±0.81	15.6±0.62	15.3±0.22	/	/	0.46±0.22 ^{*†}	/
80+EMS	62.1±0.55	13.5±0.64	22.1±0.44	2.3±0.27	/	0.65±0.91 ^{*†}	86.6

^aRezultati predstavljaju srednja vrednost±SEM tri nezavisna eksperimenta; ^a*Values represented mean±SEM of three independent experiments*

^bNC; negativna kontrola; ^b*NC; negative control*

^cEMS; etil metanosulfonat, 1 mM; ^c*EMS; ethyl methanosulfonate, 1 mM*

^d%R; procenat redukcije; ^d*%R; percentage of reduction*

*p < 0,05 u odnosu na negativnu kontrolu; †p < 0,05 u odnosu na pozitivnu kontrolu; *p < 0.05 when compared with the negative control; †p < 0.05 when compared with the positive control.

U odnosu na pozitivnu kontrolnu grupu, ekstrakt korena u svim testiranim koncentracijama pokazuje statistički značajno manju vrednost indeksa genetičkog oštećenja. U kombinovanom tretmanu sa EMS-om ekstrakt je redukovao nivo DNK oštećenja za 86.6%.

Rezultati ove studije su pokazali da ekstrakti biljke *L. vulgaris* u testiranim koncentracijama ne ispoljavaju genotoksičnu aktivnost i da u kombinovanim tretmanima sa EMS-om poseduju DNK protektivni potencijal.

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ekstrakti biljke *L. vulgaris* ne indukuju DNK oštećenja, da posediju protektivni potencijal i da mogu biti osnova za dalja istraživanja za potencijalnu primenu u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

Napomena

Istraživanje u ovom radu podržano je od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Broj ovlašćenja: 451-03-9/2021-14/200378 i 451-03-9/2021-14/200122).

Literatura

- Azqueta A., Collins A.R. (2011). The comet assay: a sensitive and quantitative method for analysis of DNA damage. In: Encyclopedia of analytical chemistry. Wiley, Chichester.
- Baytop T. (1999). Therapy with medicinal plants in Turkey (past and present). Istanbul, Turkey: Nobel Medical Book house.
- Collins A.R. (2004). Comet assay for DNA damage and repair: principles applications and limitations. *Molecular Biotechnology* 26, 249-261.
- Dalar A., Mukemre M., Ünal M., Özgökçe F. (2018). Traditional medicinal plants of Ağrı Province, Turkey. *Journal of Ethnopharmacology* 226, 56-72.
- Mukhopadhyay I., Kar C.D., Bajpayee M., Dhawan A. (2004). Evaluation of *in vivo* genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 19, 85-90.
- Podolak I., Elas M., Cieszka K. (1998). *In vitro* antifungal and cytotoxic activity of triterpene saponosides and quinoid pigments from *Lysimachia vulgaris* L. *Phytotherapy Research* 12, S70-S73.
- Podolak I., Koczurkiewicz P., Michalik M., Galanty A., Zajdel P., Janeczko Z. (2013a). A new cytotoxic triterpene saponin from *Lysimachia nummularia* L. *Carbohydrate Research* 375, 16-20.
- Podolak I., Koczurkiewicz P., Galanty A., Michalik M. (2013b). Cytotoxic triterpene saponins from the underground parts of six *Lysimachia* species. *Biochemical Systematics and Ecology* 47, 116-120.
- Toth A., Toth G., Kery A. (2014). Polyphenol composition and antioxidant capacity of three *Lysimachia* species. *Natural Product Communications* 9, 1473-1478.
- Turker A., Guner B. (2013). Efficient plant regeneration of yellow loosestrife (*Lysimachia vulgaris* L.), a medicinal plant. *Acta Biologica Hungarica* 64, 218-230.
- Winston D. (2021). Herbal and Nutritional Treatment of Kidney Stones, (n.d.). www.americanherbalistsguild.com

Yildirim A.B., Guner B., Karakas F.P., Turker A.U. (2017). Evaluation of antibacterial, antitumor, antioxidant activities and phenolic constituents of field-grown and *in vitro*-grown *Lysimachia vulgaris* L. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 14, 177–187.

IN VIVO PROTECTIVE EFFECT OF *Lysimachia vulgaris* EXTRACTS ON ETHYL METHANESULFONATE-INDUCED DNA DAMAGE

Sanja Lj. Matic¹, Nikola Srećković², Jelena S. Katanić Stanković¹, Vladimir Mihailović²

Abstract

The *in vivo* genotoxic activity of the aerial part and root methanol extracts of *Lysimachia vulgaris* L. and ability to protect DNA from ethyl methanesulfonate-induced DNA damage was studied using comet assays in *Drosophila melanogaster*. Results revealed no significant differences in mean genetic damage index between exposure groups (20, 40, 80 mg mL⁻¹ of *Drosophila* food) and negative control, indicating a non-genotoxic effect. Combined treatment of extracts and ethyl methanesulfonate showed a significant reduction in DNA damage with a percentage of reduction above 80. These findings suggest that the methanolic extract of *L. vulgaris* could be used as a natural agent in the prevention of diseases associated with DNA damage.

Key words: *Lysimachia vulgaris* L., comet assays, DNA damage, extract

¹University of Kragujevac, Institute for Information Technologies Kragujevac, Department of Science, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia (sanjamatic@kg.ac.rs)

²University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia