



UNIVERZITET U
KRAJUJEVCU
AGRONOMSKI FAKULTET U
ČAČKU



UNIVERSITY OF
KRAJUJEVAC
FACULTY OF
AGRONOMY
ČAČAK

XXV SAVETOVANJE O BIOTEHNOLOGIJI

sa međunarodnim učešćem

- ZBORNİK RADOVA 2 -



Čačak, 13 - 14. mart 2020. godine

XXV SAVETOVANJE O BIOTEHNOLOGIJI

sa međunarodnim učešćem

- Zbornik radova 2 -

ORGANIZATOR I IZDAVAČ

Univerzitet u Kragujevcu,
Agronomski fakultet u Čačku

Organizacioni odbor

Prof. dr Gordana Šekularac, predsednik;
dr Pavle Mašković, vanr. prof., sekretar;
dr Dalibor Tomić, docent; mast. inž. polj. Radmila Nikolić, asistent;
dipl. inž. Jelena Pantović, asistent; Miloš Petrović, istraživač pripravnik;
dipl. inž. Dušan Marković, asistent

Programski odbor

Dr Vladimir Kurćubić, vanredni profesor, predsednik;
prof. dr Tomo Milošević, dekan; prof. dr Leka Mandić;
prof. dr Vladeta Stevović; prof. dr Snežana Bogosavljević-Bošković;
prof. dr Radojica Đoković; prof. dr Milomirka Madić;
prof. dr Aleksandar Paunović; prof. dr Milena Đurić;
prof. dr Lenka Ribić-Zelenović; prof. dr Mlađan Garić;
dr Goran Marković, vanredni profesor; dr Gorica Paunović, vanredni profesor;
dr Tomislav Trišović, vanredni profesor; dr Milan Lukić, viši naučni saradnik;
dr Snežana Tanasković, vanredni profesor

Tehnički urednici

Dr Pavle Mašković, vanr. prof.; Miloš Petrović, istraživač pripravnik;
dipl. inž. Dušan Marković, asistent

Tiraž: 150 primeraka

Štampa

JP SLUŽBENI GLASNIK, Jovana Ristića 1, Beograd
Godina izdavanja, 2020

IN VITRO ANTIGENOTOKSIČNA AKTIVNOST ETANOLSKIH EKSTRAKATA KORENA BILJKE *Salvia verticillata* L. DOBIJENIH RAZLIČITIM METODAMA EKSTRAKCIJE

Nikola Srečković¹, Vladimir Mihailović¹, Jelena S. Katanić Stanković²,
Sanja Matić², Snežana Stanić³

Izvod: U cilju evaluacije DNK protektivnog potencijala etanolskih ekstrakata korena biljke *S. verticillata* dobijenih različitim metodama ekstrakcije od oštećenja koja su indukovana hidroksil i peroksil radikalima primenjena su dva *in vitro* testa. Za ekstrakciju korena biljke sa etanolom kao rastvaračem primenjene su tri različite metode: etnofarmakološka, ekstrakcija maceracijom i ultrazvučna ekstrakcija. Ekstrakti su pokazali efikasno smanjenje DNK oštećenja zavisno od koncentracije, gde sa porastom koncentracije ekstrakata opada zaštitni efekat. Uočene su neznatne razlike u DNK protektivnom potencijalu ekstrakata u zavisnosti od postupka ekstrakcije biljnog materijala.

Ključne reči: antigenotoksična aktivnost, *Salvia verticillata* L., hidroksil radikal, peroksil radikal

Uvod

Biljke roda *Salvia*, porodice Lamiaceae, poznate su po svojim lekovitim svojstvima i širokom spektru *in vitro* i *in vivo* bioloških aktivnosti. U zavisnosti od biljnog materijala (deo biljke, lokalitet, sezona, itd) i načina ekstrakcije, postoje široke varijacije u biološkim aktivnostima biljaka ovog roda. U tradicionalnoj medicini ove biljke se koriste za tretmane različitih oboljenja. Same biljke, preparati ili bioaktivna jedinjenja izolovana iz ovih biljaka se koriste kod groznice, reumatskih bolesti, kod problema sa prekomernim znojenjem, poremećaja seksualne funkcije, hroničnog bronhitisa i različitih mentalnih bolesti (Kamatou i sar., 2005; Fu i sar., 2013).

Dosadašnja istraživanja su se uglavnom fokusirala na najrasprostranjenije biljne vrste iz roda *Salvia*. *S. verticillata* L., u narodu poznata pod nazivom "pršljenasta" ili "vretenasta žalfija", je jedna od vrsta iz roda *Salvia* koja ima obećavajući potencijal u farmakološke, kozmetičke i prehrabrene svrhe. U narodu je poznata i pod nazivom "sjeruša" zbog nekadašnje upotrebe u aromatizaciji sireva i produženja njegovog roka upotrebe. Nadzemni deo biljke se primenjuje u tradicionalnoj medicini u obliku čaja za iskašljavanje, dezinfekciju oralne šupljine i kao obloga za zarastanje rana (Jarić i sar., 2015).

¹Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno matematički fakultet, Institut za hemiju, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Srbija;

²Univerzitet u Kragujevcu, Institut za informacione tehnologije Kragujevac, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Srbija (sanjamatic@kg.ac.rs);

³Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno matematički fakultet, Institut za biologiju i ekologiju, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Srbija.

Nekoliko dosadašnjih studija proučavalo je fitohemijski sastav ekstrakata nadzemnog dela biljke *S. verticillata* i identifikovalo kafeinsku kiselinu i njene derivate kao kvantitativno najprisutnijom i biološki najaktivnijom ruzmarinskom kiselinom (Tepešević i sar., 2007; Öztürk i sar., 2011; Šulnūte i sar., 2017; Katanić Stanković i sar., 2020). Danas nije sprovedena nijedna studija o fitohemijskom sastavu i biološkim aktivnostima korena ove biljke. Međutim u narodu postoji verovanje da je etanolni ekstrakt korena sjeruše delotvoran u suzbijanju cista, menstrualnih poremećaja i drugih izraslina.

Imajući u vidu da ne postoje literaturni podaci o *in vitro* i/ili *in vivo* antigenotoksičnoj aktivnosti ove biljne vrste, cilj ove studije je bio da se utvrdi potencijalna *in vitro* DNK protektivna aktivnost ekstrakata korena biljke *S. verticillata* dobijenih različitim metodama ekstrakcije.

Materijal i metode rada

Biljni materijal

Biljka *S. verticillata* je sakupljana na teritoriji centralne Srbije (u selu Marčevićima blizini Kragujevca), u toku oktobra 2017. godine. Vrsta je identifikovana i sistematisana u Institutu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Kragujevcu.

Ekstrakcija biljnog materijala

Koren biljke *S. verticillata* je sušen na vazduhu u provetреноj i zamračenom prostoriји na sobnoj temperaturi. Primenjene su tri različite metode ekstrakcije: maceracijom, osušenoј i usitnjenog korena u etanolom kao rastvaračem.

Prva metoda je etnofarmakološka metoda ekstrakcije kod koje se osušenoј i usitnjenog korena prelije sa 250 mL etanola, na sobnoj temperaturi, povremeno mešanje u periodu od 20 dana.

Kod metode ekstrakcije maceracijom 100 g osušenoј i usitnjenog korena prelije sa 250 mL etanola. Nakon 24 h na sobnoj temperaturi i u mraku ekstrakt se proceden, a ostaci se preliju ponovo sa istom količinom etanola. Nakon 24 h postupak se ponavlja. Po isteku novih 24 h ekstrakt se procedi i svi filtrati se spajaju.

Kod metode ultrazvučne ekstrakcije 50 g osušenoј i usitnjenog korena prelije sa 250 mL etanola i postavlja se na ultrazvučno kupatilo na frekvenciji od 35 kHz 30 min. Ekstrakti dobijeni primenom navedenih metoda koncentrisani su pomoću rotacionog vakuum uparivača.

In vitro DNK zaštitna aktivnost ekstrakata biljke *S. verticillata* prema oštećenju indukovanom hidroksil radikalima

DNK zaštitna aktivnost ekstrakata biljke *S. verticillata* u različitim koncentracijama (25, 50, 100, 200 i 400 µg/mL) prema DNK oštećenju indukovanom hidroksil radikalima utvrđena je prema metodi Lin i sar. (2008). Eksp

izvedeni primenom DNK izolovane iz sperme lososa (CarlRoth, GmbH, Karlsruhe, Nemačka) kao negativne kontrole i ruzmarinske kiseline (100 μ M) kao standarda.

Ekstrakti su rastvoreni u metanolu (1 mg/mL), i različite koncentracije (25, 50, 100, 200 i 400 μ g/mL) odvojeno su uzete u eppendorf tube. Nakon isparavanja uzoraka do suva, dodato je 45 mL fosfatnog pufera (0.2 mol/L, pH 7.4), a zatim je u svaku tubu dodato 10 μ L rastvora DNK (10 mg/mL u NaCl), 0,9 mL 180 mmol/L FeSO_4 i 3,6 mL 600 mmol/L vodonik peroksida. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi 15 min, doda se po 10 μ L 1 mmol/L EDTA da se zaustavi reakcija. Po 10 μ L alikvota reakcione smeše nanese se na 1% agarozni gel koji sadrži etidijum bromid (10 mg/mL). Nakon elektroforeze u 1xTEA puferu pH 8.0 na sobnoj temperaturi, gelovi su vizuelizovani (UV transiluminator, Vilber Lourmat na 365 nm), fotografisani i intenzitet DNK traka kvantifikovan je korišćenjem ImageJ softvera (verzija 1.48 za Windows).

***In vitro* DNK zaštitna aktivnost ekstrakata biljke *S. verticillata* prema oštećenju indukovanom peroksil radikalima**

Antigenotoksični efekat ekstrakata biljke *S. verticillata* (25, 50, 100, 200 i 400 μ g/mL) prema oštećenju DNK koje je indukovano peroksil radikalima poreklom od 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidrohlorida (AAPH, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ispitan je prema metodi Zhang i sar. (2017) sa modifikacijama. DNK izolovana iz sperme lososa (10 mg/mL u NaCl) je pomešana sa različitim koncentracijama ekstrakata (25, 50, 100, 200 i 400 μ g/mL) i 10 μ L 200 mM AAPH u PBS (pH 7,4), i smeša je inkubirana 30 min na 37°C. Po 10 μ L reakcione smeše nanese se na 1% agarozni gel sa etidijum bromidom (10 mg/mL). Nakon elektroforeze (1xTEA puferu pH 8.0 na sobnoj temperaturi) gelovi su fotografisani i intenzitet traka je kvantifikovan primenom ImageJ softvera (verzija 1.48 za Windows).

Statističke analize

Rezultati su izraženi kao srednja vrednost \pm SEM, statistička analiza podataka je urađena primenom ANOVA testa korišćenjem SPSS statističkog softverskog paketa, verzija 13.0 za Windows. Nivo značajnosti je postavljen na $p < 0,05$.

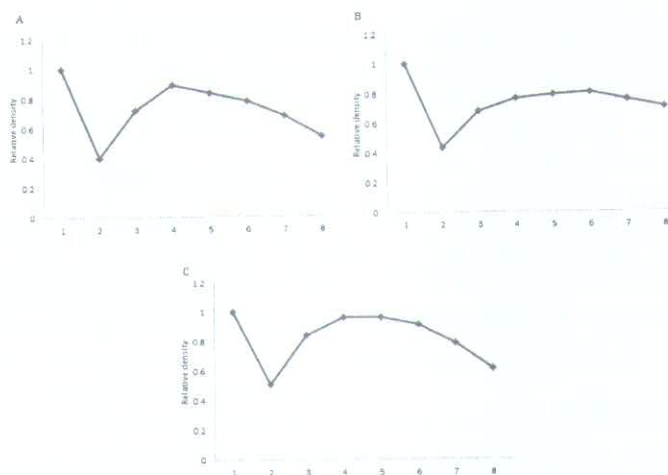
Rezultati istraživanja i diskusija

Procesi oksidacije odvijaju se kako u prehrambenim, farmaceutskim i kozmetičkim proizvodima koji sadrže lipide, tako i u biološkim sistemima. Slobodni radikali u organizmu slabe kontrolne mehanizme, što za posledicu ima niz negativnih promena u ćelijama, na lancu DNK, antioksidativnim enzimima, vitaminima, lipidima, šećerima, proteinima, što dalje dovodi do različitih fizioloških i patofizioloških procesa. Primena sintetičkih antioksidanata, pored toga što uspešno rešava problem oksidacije lipida u prehrambenim i kozmetičkim

proizvodima, može imati i kancerogeni efekat (Chen i sar., 1992). Iz navedenog razloga postoji sve veća težnja za proizvodnjom i primenom prirodnih antioksidanata koji ne pokazuju pomenutu aktivnosti, a imaju i širok spektar antioksidativnog dejstva u *in vitro* i *in vivo* uslovima (Esterbauer, 1995; Cuvelier i sar., 1996).

Efikasnost zaštite etanolskih ekstrakata korena biljke *S. verticillata* dobijenih različitim metodama ekstrakcije na oksidativno oštećenje DNK indukovano Fe^{2+} - H_2O_2 prikazana je na Grafikonu 1. Ekstrakti su pokazali efikasno smanjenje DNK oštećenja zavisno od koncentracije. Sa porastom koncentracije ekstrakata opada zaštitni efekat. Ekstrakti imaju veći DNK zaštitni efekat od oštećenja indukovana hidroksil radikalima u odnosu na standard, ruzmarinsku kiselinu.

Izraženije DNK protektivno delovanje ekstrakta dobijenih metodom ultrazvučne ekstrakcije (Graf. 1, C) i etnofarmakološkom metodom ekstrakcije (Graf. 1, A) najverovatnije je posledica efikasnije ekstrakcije fenolnih komponenti drugih prirodnih antioksidanata u odnosu na ekstrakciju maceracijom (Graf. 1, B)



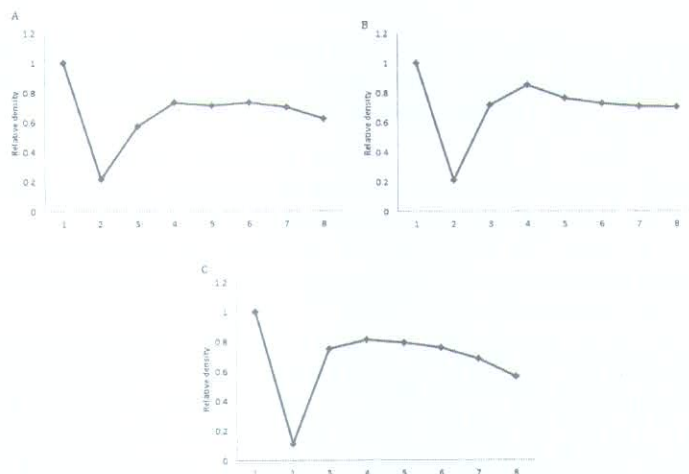
Graf. 1. Antigenotoksični efekat etanolskih ekstrakata korena biljke *S. verticillata* dobijenih A) etnofarmakološkom metodom ekstrakcije, B) metodom ekstrakcije maceracijom i C) metodom ultrazvučne ekstrakcije prema oštećenjima izazvanim hidroksil radikalima. 1: Negativna kontrola; 2: pozitivna kontrola; 3: standard, ruzmarinska kiselina (100 μ M); 4–8: ekstrakti u koncentracijama 25, 50, 100, 200 i 400 μ g/mL.

Graph. 1. Antigenotoxic effect of ethanolic extracts of *S. verticillata* roots obtained by A) ethnopharmacological extraction method, B) maceration extraction method and C) ultrasonic extraction method against hydroxyl radical induced DNA damage. 1: Negative control; 2: positive control; 3: standard, rosmarinic acid (100 μ M); 4–8: extracts at concentrations of 25, 50, 100, 200 and 400 μ g/mL.

Da bi se dodatno procenila sposobnost zaštite DNK od oštećenja, izvršeno je ispitivanje DNK protektivnog efekta od oksidativnog oštećenja indukovanog peroksil radikalima poreklom od AAPH (Grafikon 2).

Kao i kod prethodne metode, DNK zaštita od oštećenja peroksil radikalima zavisi od doze, smanjuje se sa porastom koncentracije. Rezultati su pokazali da ekstrakti poseduju veći protektivni potencijal u odnosu na primenjeni standard.

Za razliku od prethodne metode DNK protektivni potencijal ekstrakata dobijenih metodom maceracije (Graf. 2, B) i etnofarmakološkom metodom ekstrakcije (Graf. 2, A) je neznatno izraženiji u odnosu na metodu ultrazvučne ekstrakcije (Graf. 2, C).



Graf. 2. Antigenotoksični efekat etanolskih ekstrakata korena biljke *S. verticillata* dobijenih A) etnofarmakološkom metodom ekstrakcije, B) metodom ekstrakcije maceracijom i C) metodom ultrazvučne ekstrakcije prema oštećenjima izazvanih peroksil radikalima. 1: Negativna kontrola; 2: pozitivna kontrola; 3: standard ruzmarinska kiselina (100 μ M); 4–8: ekstrakti u koncentracijama 25, 50, 100, 200 i 400 μ g/mL.

Graph. 2. Antigenotoxic effect of ethanolic extracts of *S. verticillata* roots obtained by A) ethnopharmacological extraction method, B) maceration extraction method and C) ultrasonic extraction method against peroxyl radical induced DNA damage. 1: Negative control; 2: positive control; 3: standard, rosmarinic acid (100 μ M); 4-8: extracts at concentrations of 25, 50, 100, 200 and 400 μ g/mL.

Zaključak

Rezultati istraživanja *in vitro* antigenotoksične aktivnosti etanolskih ekstrakata korena biljke *S. verticillata* dobijenih različitim metodama ekstrakcije pokazali su da ekstrakti poseduju znatan DNK protektivni potencijal sa neznatnim razlikama u pogledu procesa ekstrakcije. Dobijeni rezultati daju osnovu i smer daljim istraživanjima, koja će se fokusirati na ispitivanju polifenolnog sastava, antioksidativne i antimikrobne aktivnosti ekstrakata, kao i njihove eventualne mogućnosti primene u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji.

Literatura

- Chen Q., Shi H., Ho C.T. (1992). Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 69: 999-1002.
- Cuvelier M.E., Richard H., Berset C. (1996). Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73: 645-652.
- Esterbauer H. (1995). The Chemistry of oxidation of lipoproteins in oxidative stress, lipoproteins and cardiovascular dysfunction. Rice-Evans C., Bruckdorfer K.R. (eds.), 55, London: Portland Press.
- Fu Z., Wang H., Hu X., Sun Z., Han C. (2013). The pharmacological properties of *Salvia* essential oils. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 3(7): 122-127.
- Jarić S., Mačukanović-Jocić M., Đurđević L., Mitrović M., Kostić O., Karadžić B., Pavlović P. (2015). An ethnobotanical survey of traditionally used plants on Suva planina mountain (south-eastern Serbia). *Journal of Ethnopharmacology* 175: 93-108.
- Kamatou G.P., Viljoen A.M., Gono-Bwalya A.B., van Zyl R.L., van Vuuren S.F., Lourens A.C., Başer K.H., Demirci B., Lindsey K.L., van Staden J., Steenkamp P. (2005). The *in vitro* pharmacological activities and a chemical investigation of three South African *Salvia* species. *Journal of Ethnopharmacology* 102(3): 382-390.
- Katanić Stanković J.S., Srećković N., Mišić D., Gašić U., Imbimbo P., Monti D.M., Mihailović V. (2020). Bioactivity, biocompatibility and phytochemical assessment of lilac sage, *Salvia verticillata* L. (Lamiaceae) - A plant rich in rosmarinic acid. *Industrial Crops and Products* 143: 111932.
- Lin Y.W., Wang Y.T., Chang H.M., Wu J.S.B. (2008). DNA protection and antitumor effect of water extract from residue of jelly fig (*Ficus awkeotsang* Makino) achenes. *Journal of Food and Drug Analysis* 16: 63-69.
- Öztürk N., Tunçel M., Uysal U.D., Oncu-Kaya E.M., Koyuncu O. (2011). Determination of rosmarinic acid by high-performance liquid chromatography and its application to certain *Salvia* species and rosemary. *Food Analytical Methods* 4: 300-306
- Šulniūtė V., Pukalskas A., Pukalskas A., Venskutonis R. (2017). Phytochemical composition of fractions isolated from ten *Salvia* species by supercritical

- carbon dioxide and pressurized liquid extraction methods. Food Chemistry 224: 37-47.
- Tepe B., Eminagaoglu O., Akpulat H.A., Aydin E. (2007). Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. Food Chemistry 100 (3): 985-989.
- Zhang L.L., Zhang L.F., Xu J.G., Hu Q.P. (2017). Comparison study on antioxidant, DNA damage protective and antibacterial activities of eugenol and isoeugenol against several foodborne pathogens. Food and Nutrition Research 61 (1): 1353356.

IN VITRO ANTIGENOTOXIC ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACTS OF THE *Salvia verticillata* L. ROOT OBTAINED BY DIFFERENT EXTRACTION METHODS

Nikola Srećković¹, Vladimir Mihailović¹, Jelena S. Katanić Stanković², Sanja Matic², Snežana Stanić³

Abstract

In order to evaluate the DNA protective potential of ethanolic extracts of the root of *S. verticillata*, prepared by different extraction methods, from damage induced by the hydroxyl and peroxy radicals two *in vitro* tests were used. For the extraction of the roots with ethanol as a solvent, three different methods were applied: ethnopharmacological, maceration and ultrasonic extraction. The extracts showed an effective concentration-dependent reduction of DNA damage, with increasing concentration of the extracts the protective effect decreases. Depending on the extraction process of the plant material, slight differences in DNA protective potential of extracts were noticed.

Key words: antigenotoxic activity, *Salvia verticillata* L., hydroxyl radical, peroxy radical

¹University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

² University of Kragujevac , Institute for Information Technologies Kragujevac, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Serbia (sanjamatic@kg.ac.rs)

³University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Biology and Ecology, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia

CIP - Каталогизација у публикацији
Народна библиотека Србије, Београд

63(082)
606:63(082)

**САВЕТОВАЊЕ о биотехнологији са међународним учешћем (25 ;
2020 ; Чачак)**

Zbornik radova. 2 / XXV savetovanje o biotehnologiji sa međunarodnim
učešćem, Čačak, 13-14. mart 2020. godine ; [organizator] Univerzitet u
Kragujevcu, Agronomski fakultet u Čačku ; [urednik Tomo Milošević]. -
Čačak : Univerzitet u Kragujevcu, Agronomski fakultet, 2020 (Beograd :
Službeni glasnik). - Str. 331-616 : ilustr. ; 25 cm

Na vrhu nasl. str.: University of Kragujevac, Faculty of Agronomy Cacak. -
Radovi na srp. i engl. jeziku. - Tiraž 150. - Bibliografija uz svaki rad.

ISBN 978-86-87611-74-0
ISBN 978-86-87611-75-7 (niz)

а) Пољопривреда -- Зборници б) Биотехнологија -- Зборници

COBISS.SR-ID 283507212