



UNIVERZITET U
KRAGUJEVCU
AGRONOMSKI FAKULTET U
ČAČKU



UNIVERSITY OF
KRAGUJEVAC
FACULTY OF
AGRONOMY
CACAK

XXV SAVETOVANJE O BIOTEHNOLOGIJI

sa međunarodnim učešćem

- ZBORNIK 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 Kurčubić, 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

PROTEKTIVNI EFEKAT EKSTRAKATA BILJKE *Pulmonaria officinalis* L. NA OKSIDATIVNO OŠTEĆENJE DNK U IN VITRO USLOVIMA

Nikola Srećković¹, Vladimir Mihailović¹, Sanja Matić², Nevena Mihailović¹,
Jelena S. Katanić Stanković², Milan S. Stanković³, Snežana Stanić³

Izvod: Cilj ovog rada je bio određivanje ukupne količine različitih grupa fenolnih jedinjenja u metanolskim ekstraktima nadzemnog dela i korena biljke *Pulmonaria officinalis* L., kao i procena njihove protektivne aktivnosti od oštećenja DNA izazvanog hidroksil i peroksil radikalima u *in vitro* uslovima. Sadržaj fenolnih jedinjenja u oba ekstrakta je bio visok, naročito sadržaj fenolnih kiselina, pri čemu je na osnovu HPLC analize potvrđeno prisustvo ruzmarinske kiseline kao dominantnog jedinjenja u oba ekstrakta. Ekstrakti su pokazali efikasno smanjenje DNA oštećenja indukovanih hidroksil i peroksil radikalima, bez značajnije promene zaštitnog efekta sa porastom koncentracije ekstrakata.

Ključne reči: antigenotoksična aktivnost, *Pulmonaria officinalis* L., ruzmarinska kiselina, hidroksil radikal, peroksil radikal

Uvod

Pulmonaria officinalis L. je zeljasta, višegodišnja, rizomska biljka iz roda medunica (*Pulmonaria*), koja pripada porodici Boraginaceae. U narodu je poznata pod nazivom plućnjak ili medunika. Biljka je od davnina poznata Evropskim narodima, a zbog njene upotrebe u lečenju respiratornih bolesti dobila je ime „plućnjak“ (Gligić, 1953). Pored upotrebe kod iskašljavanja, bronhitisa, laringitisa i tuberkuloze, plućnjak se koristi i kod čira na želucu i dvanaestopalačnom crevu, kao i kod nekih bubrežnih oboljenja (Dumitru i Răducanu, 1992). Drugi etnomedicinski izvori ukazuju da infuzi ili dekokti *P. officinalis* imaju adstringentno, antikoagulaciono, antimikrobnو и antiupalno delovanje, a primenjuju se i kao lek za urinarne probleme i ciste (Akram M. i Rashid A. 2017).

Postoji mali broj istraživanja hemijskog sastava biljaka ovog roda, međutim postoje podaci da biljke iz roda *Pulmonaria*, pored bogatog polifenolnog sadržaja, poseduju i manju količinu nezasaćenih pirolizidinskih alkaloida, pa se ne preporučuje dugotrajna konzumacija (Lüthy i sar., 1984). Poznato je da *P. officinalis* sadrži 6-10% tanina i druga fenolna jedinjenja (Kuštrak, 2005), a potvrđeno je da ekstrakt nadzemnog dela sadrži rutin, hiperozid, kafeinsku, ruzmarinsku i hlorogensku kiselinu

¹Univerzitet u Kragujevcu, Prirodno matematički fakultet, Institut za hemiju, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Srbija (nikola.sreckovic@pmf.kg.ac.rs);

²Univerzitet u Kragujevcu, Institut za informacione tehnologije, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Srbija

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

(Neagu i sar., 2018), kao i derivate salvionolične kiseline i slobodnu danšensu kiselinu (Krzyzanowska-Kowalczyk i sar., 2018).

Zbog nedostatka literturnih podataka i naučne potvrde o biološkim aktivnostima i potencijalnoj primeni ove biljke, potrebno je sprovesti brojna ispitivanja. U tom smislu, cilj ovog rada je da se ispita fenolni sastav metanolskih ekstrakata nadzemnog dela i korena biljke *P. officinalis* i proceni njihova sposobnost zaštite DNK od oštećenja indukovanih hidroksilnim i peroksilnim radikalima, a sve to u cilju ispitivanja mogućnosti primene ove biljke kao dijetetskog suplementa koji može umanjiti neželjene efekte povećanog oksidativnog stresa.

Materijal i metode rada

Biljni materijal i priprema ekstrakata

Biljni materijal je sakupljen početkom aprila 2018. godine u fazi cvetanja u selu Veliko Krčmare, okolina Kragujevca. Nadzemni deo biljke i koren su odvojeni i osušeni na sobnoj temperaturi u tami. Osušen i usitnjeni nadzemni deo biljke (60 g) i koren (90,78 g) je ekstrahovan metanolom postupkom maceracije, i dobijeni ekstrakti su profiltrirani i upareni vakuum uparivačem.

Određivanje sadržaja fenolnih jedinjenja

Sadržaji različitih grupa fenolnih jedinjenja određeni su spektrofotometrijskim metodama ranije opisanim postupcima (Mihailović i sar., 2015). Količine ukupnih fenolnih jedinjenja i kondenzovanih tanina u ekstraktima izražene su u ekvivalentima galne kiseline (mg GK/g ekstrakta), sadržaj ukupnih flavonoida izražen je u ekvivalentima kvercetina (mg KV/g ekstrakta), dok je količina ukupnih fenolnih kiselina izražena u ekvivalentima kafeinske kiseline (mg KK/g ekstrakta).

HPLC analiza

Preliminarna identifikacija i kvantifikacija fenolnih jedinjenja prisutnih u ekstraktima održana je korišćenjem Shimadzu prominence HPLC aparata (Kyoto, Japan) sa PDA detektorom i C18 kolone Luna (Phenomenex, Torrance, CA, USA) veličine 250×4.6 mm i veličine čestica 5 µm. Mobilnu fazu su činili voda (A) i acetonitril (B) uz dodatak 0,1% trifluorsirčetne kiseline. Gradijent eluiranja bio je sledeći: 0-1 min 5% B, 1-5 min 5-10% B, 5-25 min 10-80% B, 25-27 min 100% B i 27-30 min 5% B.

DNK protektivna aktivnost ekstrakta biljke *P. officinalis* prema oštećenju indukovanim hidroksil i peroksil radikalima

DNK zaštitna aktivnost ekstrakata biljke *P. officinalis* (25, 50, 100, 200 i 400 µg/mL) prema DNK oštećenju izazvanom hidroksil radikalima utvrđena je prema

metodi Lin i sar. (2008). DNK izolovana iz sperme lososa (CarlRoth, GmbH, Karlsruhe, Nemačka) je korišćena kao negativna kontrola, dok su ruzmarinska kiselina (100 µM) i katehin (100 µM) korišćeni kao standardna jedinjenja.

Protektivna aktivnost ekstrakata biljke *P. officinalis* (25, 50, 100, 200 i 400 µg/mL) prema oštećenju DNK koje je indukovano peroksil radikalima poreklom od 2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidrochlorida (AAPH, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) ispitana je prema metodi Zhang i sar. (2017).

Rezultati istraživanja i diskusija

Količina ukupnih fenola, flavonoida, fenolnih kiselina i tanina metanolskih ekstrakata nadzemnog dela i korena biljke *P. officinalis* predstavljena je u Tabeli 1. Metanolski ekstrakt korena biljke *P. officinalis* sadržao je neznatno veću količinu ukupnih fenolnih jedinjenja (90,37 GK/g) u odnosu na nadzemni deo (81,22 mg GK/g). Međutim, sadržaj flavonoida u ekstraktu nadzemnog dela je bio 8,70 mg KV/g, dok u ekstraktu korena flavonoidi nisu kvantifikovani primjenom metodom. Oba ekstrakta poseduju značajnu količinu fenolnih kiselina, dok ekstrakt korena sadrži nešto veću količinu kondenzovanih tanina.

Tabela 1. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida, fenolnih kiselina i kondenzovanih tanina

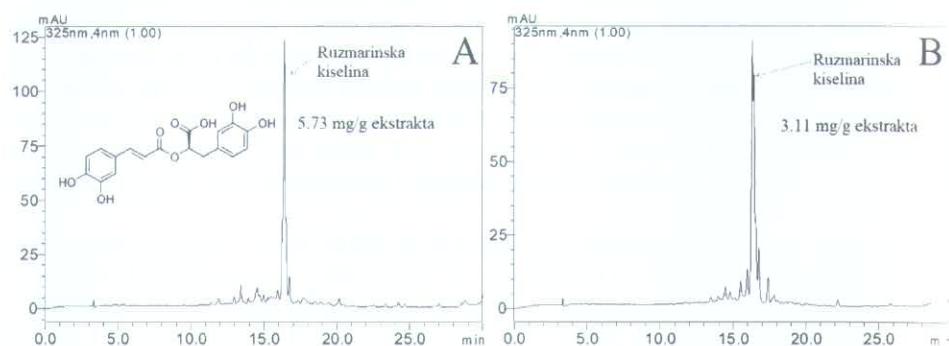
Table 1. The content of total phenols, flavonoids, phenolic acids and condensed tannins

	Ukupna fenolna jedinjenja (mg GK/g ekstrakta)	Ukupni flavonoidi (mg KV/g ekstrakta)	Ukupne fenolne kiseline (mg KK/g ekstrakta)	Ukupni sadržaj kondenzovanih tanina (mg GK/g ekstrakta)
	Total phenolic content (mg GA/g extract)	Total flavonoid (mg QU/g extract)	Total phenolic acid (mg CA/g extract)	Condensed tannins (mg GA/g extract)
nadzemni deo aerial part	81,22±2,45 ^a	8,70±0,73	57,47±0,57	44,25±1,21
koren root	90,37±2,94	- ^b	52,57±1,05	59,42±3,38

^a srednja vrednost ± SD; ^b nije kvantifikovano

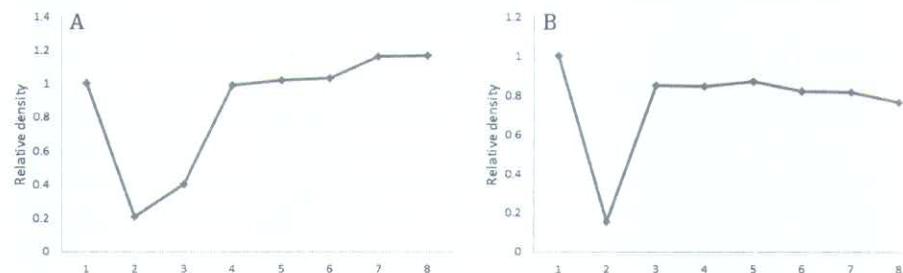
Na Slici 1 prikazani su HPLC-PDA hromatogrami ekstrakata nadzemnog dela i korena biljke *P. officinalis*, pri čemu je na osnovu poređenja retencionih vremena i UV spektara standarda i jedinjenja prisutnih u ekstraktima identifikovana ruzmarinska kiselina u oba ispitivana ekstrakta. HPLC analiza je pokazala da je ruzmarinska kiselina dominantno jedinjenje u oba ekstrakta i da je nadzemni deo biljke (5,73 mg/g ekstrakta) bogatiji u sadržaju ovog jedinjenja u odnosu na koren (3,11 mg/g ekstrakta), što je u skladu sa postojećim literaturnim podacima za ovu

biljku ili biljke ovog roda (Krzyzanowska-Kowalczyk i sar., 2018; Dresler i sar.. 2017).



Slika 1. HPLC-PDA hromatogrami metanolnih ekstrakata nadzemnog dela (A) i korena (B) biljke *P. officinalis*

Figure 1. HPLC-PDA chromatograms of *P. officinalis* methanolic extracts of aerial part (A) and root (B)



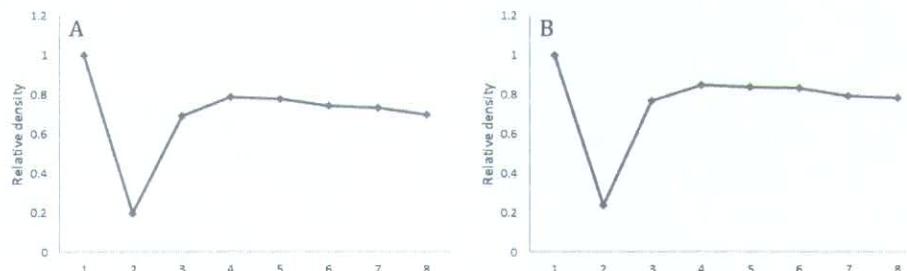
Graf. 1. Antigenotoksična aktivnost ekstrakata nadzemnog dela A) i korena B) biljke *P. officinalis* prema DNK oštećenjima izazvani hidroksil radikalima. 1: negativna kontrola; 2: pozitivna kontrola; 3: standardi (ruzmarinska kiselina kod A i katehin kod B, 100 µM); 4-8: ekstrakti u koncentracijama 25, 50, 100, 200 i 400 µg/mL.

Graph. 1. Antigenotoxic activity of extracts of the aerial part A) and root B) of *P. officinalis* against DNA damage induced by hydroxyl radicals. 1: negative control; 2: positive control; 3: standards (rosmarinic acid at A and catechin at B, 100 µM); 4-8: extracts at concentrations of 25, 50, 100, 200 and 400 µg/mL.

Zaštitni efekat ekstrakata biljke *P. officinalis* od oštećenja DNK izazvanih hidroksil i peroksil radikalima ispitana je primenom DNK izolovane iz sperme lososa. Ekstrakt nadzemnog dela biljke (koncentracije 25-400 µg/mL) ispoljio je efikasno dozno-zavisno smanjenje hidroksil radikal-indukovanog DNK oštećenja

(Grafikon 1A), čak u većem stepenu od ruzmarinske kiseline (100 mM). Ekstrakt korena biljke je ispoljio nešto niži efekat zaštite DNK od oksidativnog dejstva hidroksil radikalala u odnosu na ekstrakt nadzemnog dela, ali je u rangu sa aktivnošću katechina kao standarda (Graf. 1, B).

U slučaju DNK zaštite od oštećenja peroksil radikalima, nije primećena dozno-zavisna aktivnost ekstrakata (Grafikoni 2A i 2B), sve primjenjene koncentracije ekstrakata su gotovo u identičnom stepenu srećile DNK oštećenje. Dobijeni rezultati ukazuju da ekstrakt korena svoj maksimalni efekat zaštite DNK od dejstva peroksil radikalala ispoljava već pri koncentraciji od 25 µg/mL. Oba ekstrakta poseduju veći DNK protektivni potencijal u odnosu na primjenjene standarde.



Graf. 2. Antigenotoksična aktivnost ekstrakata nadzemnog dela A) i korena B) biljke *P. officinalis* prema DNK oštećenjima izazvanih peroksil radikalima. 1: negativna kontrola; 2: pozitivna kontrola; 3: standardi (ruzmarinska kiselina kod A i katehin kod B, 100 mM); 4–8: ekstrakti u koncentracijama 25, 50, 100, 200 i 400 µg/mL.

Graph. 2. Antigenotoxic activity of extracts of the aerial part A) and root B) of *P. officinalis* against DNA damage induced by peroxy radicals. 1: negative control; 2: positive control; 3: standards (rosmarinic acid at A and catechin at B, 100 µM); 4–8: extracts at concentrations of 25, 50, 100, 200 and 400 µg/mL.

Zaključak

Na osnovu dobijenih rezultata utvrđeno je da su metanolski ekstrakti nadzemnog dela i korena biljke *P. officinalis* bogati u sadržaju fenolnih jedinjenja, pri čemu se kao dominantno jedinjenje izdvaja ruzmarinska kiselina. Dva primjenjena *in vitro* testa su pokazala da ispitivani ekstrakti ispoljavaju izuzetan stepen DNK zaštite od reaktivnih radikalnih vrsta, hidroksil i peroksil radikalala. Predstavljeni rezultati pružaju mogućnost potencijalne primene biljke *P. officinalis* kao dijetetskog suplementa u tretmanu bolesti i stanja izazvanih povećanim oksidativnim stresom.

Literatura

- Akram M., Rashid A. (2017). Anti-coagulant activity of plants: Mini review. Journal of Thrombosis and Thrombolysis 44: 406–411.
- Dresler S., Szymczak G., Wójcik M. (2017). Comparison of some secondary metabolite content in the seventeen species of the Boraginaceae family. Pharmaceutical Biology 55: 691-695.
- Dumitru E., Răducanu D. (1992). Terapie naturistă. Ed. Stiintifică, Bucuresti.
- Gligić V. (1953). Etimološki botanički rečnik, Sarajevo: "Veselin Masleša"
- Krzyzanowska-Kowalczyk J., Pocio Ł., Mołdoch J., Ludwiczuk A., Kowalczyk, M. (2018). Novel penolic constituents of *Pulmonaria officinalis* L. LC-MS/MS comparison of spring and autumn metabolite profiles. Molecules 23(9): 2277.
- Kuštrak D. (2005). Farmakognozija – fitofarmacijia. Golden marketing. Tehnička knjiga. Zagreb.
- 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.
- Lüthy J., Brauchli J., Zweifel U., Schmid P., Schlatter C. (1984). Pyrrolizidine alkaloids in medicinal plants of Boraginaceal: *Borago officinalis* L. and *Pulmonaria officinalis* L. Pharmaceutica Acta Helveticae 59: 242-246.
- Mihailović V., Mišić D., Matić S., Mihailović M., Stanić S., Vrvić M.M., Katanić J., Mladenović M., Stanković N., Boroja T., Stanković M.S. (2015). Comparative phytochemical analysis of *Gentiana cruciata* L. roots and aerial parts, and their biological activities. Industrial Crops and Products 73 (2015) 49–62.
- Neagu E., Radu G. L., Albu C., Paun G. (2018). Antioxidant activity, acetylcholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of *Pulmonaria officinalis* and *Centarium umbellatum* extracts. Saudi Journal of Biological Sciences 25(3): 578-585.
- Scalbert A., Monties B., Janin G. (1989). Tannin in wood: comparison of different estimation methods. Journal of Agricultural and Food Chemistry 37: 1324-1329.
- 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.

PROTECTIVE EFFECT OF *Pulmonaria officinalis* L. AGAINST *IN VITRO* OXIDATIVE DNA DAMAGE

Nikola Srećković¹, Vladimir Mihailović¹, Sanja Matić², Nevena Mihailović¹, Jelena S. Katanić Stanković², Milan S. Stanković³, Snežana Stanić³

Abstract

The aim of this study was to investigate the total contents of different phenolic compounds of the aerial part and root methanol extracts of *Pulmonaria officinalis* L., as well as to evaluate their protective activity against DNA damage induced by hydroxyl and peroxy radicals using two *in vitro* tests. The extracts were rich in total phenolic compounds and the rosmarinic acid was confirmed as the dominant compound in both extracts by HPLC analysis. The extracts showed an effective reduction of DNA damage induced by hydroxyl and peroxy radicals, with no significant change in the protective effect by increasing the concentration of the extracts.

Key words: antigenotoxic activity, *Pulmonaria officinalis* L., rosmarinic acid, hydroxyl radical, peroxy radical

¹University of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, Radoja Domanovića 12, 34000 Kragujevac, Serbia (nikola.sreckovic@pmf.kg.ac.rs)

²University of Kragujevac, Institute for Information Technologies, Jovana Cvijića bb, 34000 Kragujevac, Srbija

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
учеšćem, 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