

Оригинални научни рад

## КАРАКТЕРИЗАЦИЈА АНТИОКСИДАТИВНОГ МЕТАБОЛИЗМА СРИЈЕМУША (*Allium ursinum* L.)

Биљана Давидовић Плавшић<sup>1</sup>, Николина Милетић<sup>1</sup>, Зоран Кукрић<sup>2</sup>, Свјетлана Чолић<sup>1</sup>,  
Биљана Кукавица<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Универзитет у Бањој Луци, Природно-математички факултет, Младена Стојановића 2,  
78000 Бања Лука, Република Српска, БиХ

<sup>2</sup>Универзитет у Бањој Луци, Технолошки факултет, Војводе Степе Степановића 73, 78000  
Бања Лука, Република Српска, БиХ

### Abstract

**DAVIDOVIĆ-PLAVŠIĆ, Biljana, Nikolina MILETIĆ, Z. Kukrić, Svjetlana ČOLIĆ, Biljana KUKAVICA: CHARACTERIZATION OF ANTIOXIDANT METABOLISM OF WILD GARLIC (*Allium ursinum* L.)** [University of Banja Luka, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, Mladena Stojanovića 2, 78000 Banja Luka, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina; University of Banja Luka, Faculty of Tehnology, Vojvode Stepe Stepanovića 73, 78000 Banja Luka, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina]

In addition it still has no significant commercial use of *Allium ursinum* L. (wild garlic), this interesting plant is widely used in folk medicine as well as nutrition. It is important to note that although in the fresh form wild garlic is available a short period of time, the healing properties of wild garlic are available throughout the year in the form of the extract. The aim of our work was to characterize the enzymatic antioxidative metabolism of fresh leaves of the wild garlic and non-enzymatic antioxidative metabolism of fresh and dry leaves in ethanol and methanol extracts. Our results have shown that different preparation of the extract of the wild garlic affects the quantitative composition of the phenolic compounds. Characterization of enzymatic profiles of superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, 1.11.1.6) and peroxidase (POX, EC 1.11.1.7) was performed, which showed the presence of three CAT isoforms and three POX isoforms, while two SOD isoforms were detected. To our knowledge this is the first time that the isoenzyme profiles of wild garlic leaves were shown. Powerful antioksidative capacity of wild garlic leaves is important predisposition for the plants survival under different stress conditions.

**Key words:** wild garlic, phenolic compounds, antioxidant capacity, SOD, CAT, POX

### Сажетак

Поред тога што још увијек нема значајне комерцијалне употребе *Allium ursinum* L. (сријемуша), ова занимљива биљка доста се користи у народној медицини као и у исхрани. Важно је истаћи да иако је сријемуш у свјежем облику доступан кратак период, његова љековита својства доступна су током цијеле године у облику екстракта. Циљ нашег рада био је да се уради карактеризација ензимског антиоксидативног метаболизма свјежих листова биљке сријемуш и неензимског антиоксидативног метаболизма свјежих и сувих листова у етанолном и метанолном екстракту. Наши резултати показали су да различита припрема екстракта сријемуша утиче на квантитативни састав фенолних једињења. Урађена је карактеризација ензимских профила супероксид дисмутазе (SOD, EC 1.15.1.1), каталазе (CAT, 1.11.1.6) и пероксидазе (POX, EC

1.11.1.7) који су показали присуство три CAT и три POX изоформе, док су детектоване двије SOD изоформе. Према нашим сазнањима, по први пут су показани изоензимски профили антиоксидативних ензима листа сријемуша. Моћан антиоксидативни капацитет листова сријемуша добра је предиспозиција за преживљавање биљке у условима различитих врста стреса.

**Кључне ријечи:** сријемуш, феноли, антиоксидативни капацитет, SOD, CAT, POX

## УВОД

Биљке су током вегетационог периода изложене различитим врстама биотичког и абиотичког стреса који неповољно утичу на њихов раст и развој. Једна од негативних посљедица дјеловања стресних фактора је оксидативни стрес који представља повећану производњу реактивних врста кисеоника (*eng.* ROS-*reactive oxygen species*, као што су: супероксид анјон радикал ( $O_2^-$ ), хидроксил радикал (OH), водоник пероксид ( $H_2O_2$ ) и синглет кисеоник ( $^1O_2$ )). Реактивне врсте кисеоника су производ нормалног биљног метаболизма и настају у процесима респирације, фотореспирације и фотосинтезе у скоро свим компартманима биљне ћелије (хлоропластима, митохондријама, плазма мембранама, пероксизомима, апопласту, ендоплазматичном ретикулуму и ћелијском зиду (Halliwell и Gutteridge, 1999; Sharma и сар., 2012)). При ниским/умјереним концентрацијама, ROS су секундарни гласници и посредници процеса у биљним ћелијама као што су затварање стома, програмирана смрт ћелије, гравитопизам, постизање толеранције на биотички и абиотички стрес (Sharma и сар., 2012). Међутим, повећана производња ROS може довести до нарушавања ћелијске редокс хомеостазе и оштећења липида, протеина, ДНК и других биомолекула што као крајњи резултат може имати смрт ћелије. Да би се као сесилни организми избориле са повећаном ROS продукцијом, биљке су морале развити ефикасан антиоксидативни систем који контролише ниво ROS у ћелији и уклања вишак. Антиоксидативни систем чине ензимске (као што су супероксид дисмутаза, каталаза, пероксидаза, ензими аскорбат-глутатион циклуса) и неензимске компоненте (аскорбат, глутатион,  $\alpha$ -токоферол, каротеноиди, феноли итд.) (Sharma и сар., 2012).

Супероксид дисмутаза (SOD, EC 1.15.1.1) има централну улогу у одбрани свих аеробних организама од оксидативног стреса. Припада групи металоензима и катализује дисмутацију супероксид анјон радикала до  $H_2O_2$  и  $O_2$ . Каталаза (CAT, 1.11.1.6) је тетрамерни протеин у коме свака субјединица садржи хем као простетичну групу и катализује разградњу водоник пероксида до воде и  $O_2$ . Биљне, Класа III (*Class III*, POX, EC 1.11.1.7) пероксидазе су гликопротеини са хемом као простетичном групом које катализују оксидацију различитих фенолних супстрата са  $H_2O_2$ .

Феноли су веома распрострањени производи секундарног метаболизма биљака и антиоксидативно дјеловање биљних екстраката углавном се везује за њихово присуство. У биљним ћелијама ова једињења претежно се налазе у конјугованом облику, са једном или више молекула шећера, те показују активност како у хидрофобним тако и у хидрофилним системима (Rice-Evans и сар., 1997; Croft, 1999). Најзаступљенија фенолна једињења су: фенолне киселине (деривати бензоеве и циметне киселине), флаваноли, флавоноиди, кумарини, антоцијани и дихидрохалкони. Заједничка карактеристика фенолних једињења је да садрже ароматичан прстен са једном или више хидроксилних група. Активност ових једиња испољава се тако што редукују слободне радикале (супероксид анјон радикал, пероксил, алкоксил и хидроксил радикал), тј. донирају водоникове атоме реактивним

врстама неутралишући присуство слободних радикала, а истовремено настају мање реактивни феноксил радикали. Стабилност феноксил радикала последица је делокализације електрона и постојања више резонантних форми које на крају доводе до терминације слободно-радикалских процеса (Ohshima и сар., 1998).

Медвјеђи лук (сријемуш, *Allium ursinum* L.) широко је распрострањен у Европи и сјеверној Азији и доста се примјењује у исхрани и народној медицини. Тачан хемијски састав биљке сријемуш још увијек се не зна јер су једињења присутна у екстрактима биљке јако нестабилна и осјетљива на температурне промјене и зависе од врсте растварача и методе екстракције. Такође, сама биљка јако је осјетљива на промјену станишта и земљишта. Сријемуш је карактеристичног мириса на бијели лук, а доминантан је мирис сумпора који потиче од сумпорних једињења (Sobolewska и сар., 2015). Једињења сумпора која улазе у састав етарских уља најзначајнија су и налазе се у свим дијеловима биљке. Квантитативни и квалитативни профил једињења сумпора је промјенљив, а најчешћи разлог за то је њихова нестабилност (Sobolewska и сар., 2015). Осим једињења која садрже сумпор, сријемуш је богат и фенолним једињењима која су стабилнија и позната по својим антиоксидативним особинама. Циљ нашег рада био је да се испита утицај услова екстракције на садржај фенолних једињења и антиоксидативни капацитет екстракта у сувом и свјежем листу, као и активност и изоензимски профил антиоксидативних ензима SOD, CAT и POX у свјежем листу сријемуша.

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Узорке биљке сријемуш прикупили смо у количини од 50 g на локалитету Гај (општина Лакташи, 120 m надморске висине, 44° 55' 18" N и 17° 19' 01" E) 31. марта 2017. године. За експерименте су кориштени листови биљке који су испрани обичном водом, дестилованом водом па посушени папирним убрусима. Један дио узорака осушен је на собној температури (означен као суви узорак), док је други дио спакован у кесице од алуминијумске фолије и до лабораторије транспортован у течном азоту (означен као свјежи узорак). За екстракцију фенолних компонената из сувог и свјежег узорка кориштени су етанол и метанол.

### Припрема узорка:

**Суви узорци:** екстракција је вршена са два растварача посебно, у метанолу и у 80% етанолу. По 3 g осушеног узорка хомогенизовано је са 40 mL метанола или 40 mL 80% етанолу у авану са тучком и пребачено у балон са шлифованим чепом. Екстракција је рађена са рефлуксом уз водено хладило (температура се кретала до 70 °C). Након кључања растварача узорак је остављен још 10 мин. да куха, након чега је екстракт прохладен и профилиран у нормални суд. У заостали талог у балону додата је још једна запремина растварача и екстракција је поновљена. Реекстракт је исто профилиран и спојен са екстрактом у нормалном суду и допуњено је до 100 mL са растварачима. Екстракција и са етанолом и са метанолом урађена је два пута.

**Свјежи узорци:** екстракција је вршена са два растварача посебно, у метанолу и у 80% етанолу. По 5 g узорка хомогенизовано је у авану са тучком са течним азотом, и пребачено у балон са шлифованим чепом. Након тога додата је 20 mL метанола или 20 mL 80% етанолу. Екстракција је рађена са рефлуксом уз водено хладило (температура се кретала до 70 °C). Након кључања растварача узорак је остављен још 10 мин. да куха, након чега је

екстракт прохлађен и профилиран у нормални суд. У заостали талог у балону додата је још једна запремина растварача и екстракција је поновљена. Реекстракт је исто профилиран и спојен са екстрактом у нормалном суду и допуњено је до 50 mL етанолом или метанолом. За оба растварача припрема екстракта урађена је два пута.

Сви резултати (концентрација укупних фенола, флавоноида и флавонола, DPPH и ABTS тест) представљају средњу вриједност за двије екстракције, у два растварача, свјежих и сувих листова сријемуша.

**Концентрација укупних фенола** одређена је модификованом методом по Folin-Ciocalteu (Wolfe и сар., 2003). Мјерена је апсорбанца на 765 nm и концентрација укупних фенола изражена је као еквивалент галној киселини ( $\mu\text{g GAE/g}$ ), на основу стандардне криве за галну киселину направљену у опсегу концентрација од 50 до 250  $\mu\text{g/mL}$  ( $y = 0,0043x - 0,0295$ ).

**Концентрација укупних флавоноида** одређена је методом по Ordonez-u (Ordonez и сар., 2006). Мјерена је апсорбанца на 420 nm и концентрација укупних флавоноида изражена је као еквивалент кверцетину ((quercetin-a) Qc  $\mu\text{g/g}$ ), на основу стандардне криве за кверцетин хидрат направљену у опсегу концентрација 10–100  $\mu\text{g/mL}$  ( $y = 0,0043x - 0,0295$ ).

**Одређивање концентрације укупних флавонола** рађено је методом по Kumaran-у и Kagunakaran-у (Kumaran и Kagunakaran, 2007). Мјерена је апсорбанца на 440 nm и концентрација укупних флавонола изражена је као еквивалент кверцетину ((quercetin-a) Qc  $\mu\text{g/g}$ ), на основу стандардне криве за кверцетин хидрат направљену у опсегу концентрација 10–100  $\mu\text{g/mL}$  ( $y = 0,0228x + 0,0345$ ).

#### **Одређивање антиоксидативног капацитета**

**DPPH метода.** За DPPH методу етанолни и метанолни узорци разблажени су 10 пута са кориштеним растварачима, тако да је концентрација свјежих узорака спрашених у азоту била 0,01 g свјеже масе/mL, а концентрација сувих узорака 0,0003 g суве масе/mL.

Ефекат узорка на DPPH радикал одређиван је методом по Liyana-Pathiranan и Shaidi-у (Liyana-Pathiranan и Shaidi, 2005). Мјерена је апсорбанца на 515 nm, која потиче од DPPH радикала, а способност узорка за гашење DPPH радикала рачуната је као проценат инхибиције у односу на контролу, према формули:

$$I\% = \frac{A_{\text{контрола}} - A_{\text{узорак}}}{A_{\text{контрола}}} \times 100$$

гдје је:

$A_{\text{контрола}}$ –апсорбанца DPPH радног раствора + метанол (етанол)

$A_{\text{узорак}}$ –апсорбанца DPPH радног раствора + узорак

На основу стандардне криве за Trolox направљене у опсегу концентрација 1,25–25  $\mu\text{g/mL}$  ( $y = 0,032x + 0,0445$ ) израчунате су DPPH концентрације изражене у еквивалентима Trolox-a  $\mu\text{g}$  (Trolox) Tr/g.

**ABTS метода.** Ефекат етанолног и метанолног екстракта сријемуша свјежих и сувих листова на ABTS радикал одређен је модификованом методом по Re-у и сарадницима (Re и сар., 1999). За ABTS методу свјежи узорци разблажени су још 10 пута са кориштеним растварачем, тако да је финална концентрација била 0,001 g/mL (ABTS<sup>+</sup>). Мјерена је апсорбанца на 734 nm и резултати су изражени са TEAC вриједношћу (*eng. Trolox*

*equivalen tantioxidant capacity*) тј. као  $\mu\text{g Trolox /g}$  суве или свјеже масе према формули:

$$I\% = \frac{A \text{ контрола} - A \text{ узорак}}{A \text{ контрола}} \times 100$$

гдје је:

A контрола–апсорбанца ABTS радног раствора + метанол (етанол)

A узорак–апсорбанца ABTS радног раствора + узорак

На основу стандардне криве за Trolox у опсегу концентрација од 0,25–4  $\mu\text{g/mL}$  ( $y = 18,03x + 0,188$ ) израчунате су ABTS концентрације изражене у  $\mu\text{g (Trolox) Tr/g}$ .

**Ензимски антиоксидативни статус** сријемуша урађен је карактеризацијом ензимских профила супероксид дисмутазе (SOD), каталазе (CAT) и пероксидазе (POX) нативном електрофорезом. Претходно смо екстраховали протеине из свјежих листова сријемуша.

**Екстракција протеина.** У течном азоту спрашено је 0,5 g узорка и додато 4 mL пуфера за екстракцију (0,1 M Na-фосфатни, pH 6,4). Пуфер за екстракцију садржавао је 0,2 % TWEEN и 1 mM PMSF. Хомогенат је центрифугиран 10 минута на 9610 g. Екстракција је поновљена за 3 различита узорка означена као S1, S2 и S3. У супернатантима је одређена концентрација протеина по Lowry-у (Lowry и сар., 1951) са BSA као стандардом у опсегу концентрација од 0,1 до 1 mg/mL.

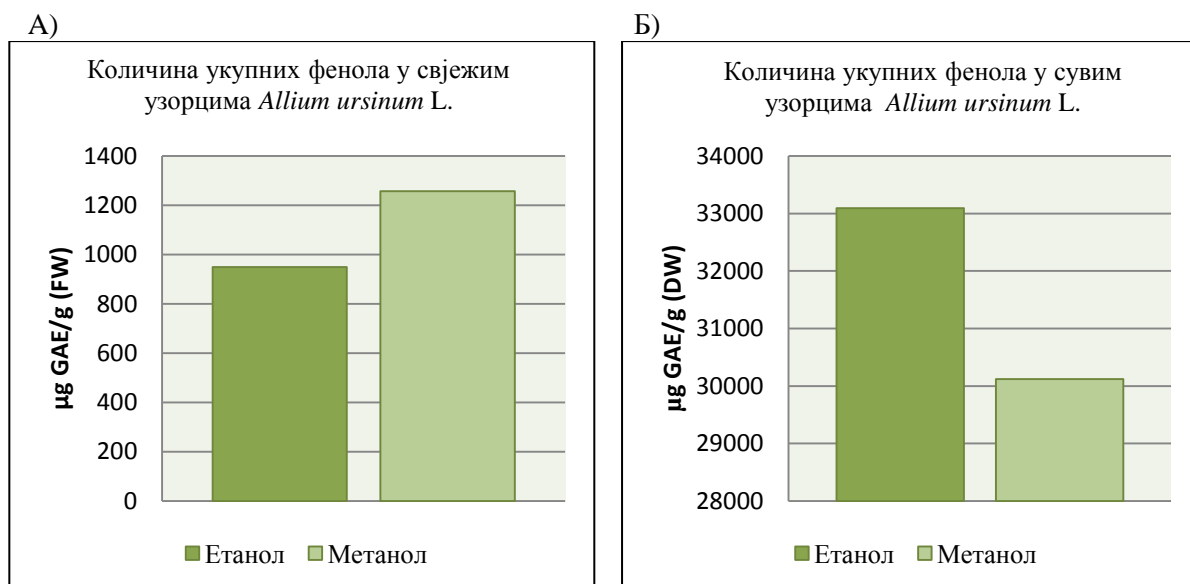
**Нативна електрофореза.** Детекција изоформи антиоксидативних ензима рађена је на гелу добијеном након нативне електрофорезе хомогената на 8% полиакриламидном гелу за CAT и 10% за SOD и POX. Након електрофорезе, SOD изоформе су одређене специфичним бојењем. Гелови су инкубирани у раствору боје који се састоји од: 4 mmol/L Tris пуфера pH 7,8; 0,25 mmol/L NBT; 0,13 mmol/L рибофлавина; 1 mmol/L EDTA и 2,72 mmol/L TEMED (Beauchamp и Fridovich, 1971). За детекцију CAT изоформи на гелу, гел је најприје инкубиран у 0,003%  $\text{H}_2\text{O}_2$  током 5 минута, а након уклањања вишка раствора бојен преливањем са раствором 1%  $\text{FeCl}_3$  и 1%  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (Woodbury и сар., 1971). Пероксидазе на гелу детектоване су инкубирањем гела са раствором који је садржавао: 5 mg нафтола, 5 mL метанола, 45 mL 0,1 M Na-фосфатног пуфера, pH 6,4 и 50  $\mu\text{L}$  30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

## РЕЗУЛТАТИ

### Неензимски антиоксидативни статус

#### Концентрација укупних фенола

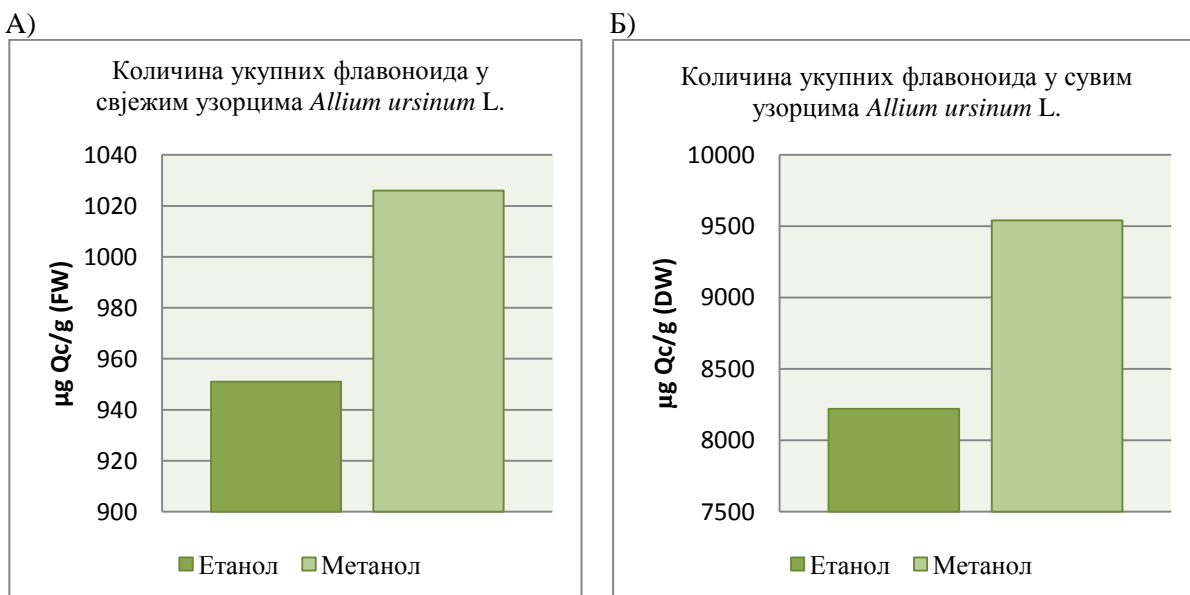
На слици 1 приказани су резултати за концентрацију укупних фенола, у свјежим и сувим листовима екстрахованим етанолом и метанолом. Количина укупних фенола у свјежим узорцима у етанолном екстракту износила је 949  $\mu\text{g GAE/g FW}$  (*eng. Fresh Weight* – свјежа маса), а у метанолном 1257  $\mu\text{g GAE/g FW}$  (А). У сувим узорцима сријемуша екстрахованим у етанолу количина укупних фенола износила је 33093  $\mu\text{g GAE/g DW}$  (DW, *eng. Dry Weight* – сува маса), а у метанолу 30123  $\mu\text{g GAE/g DW}$  (Б). У односу на свјеже узорке сријемуша количина укупних фенола у сувим узорцима била је значајно већа (35 пута за етанол и 24 пута за метанол).



**Слика 1.** Количина укупних фенола у свјежим (А) и сувим (Б) узорцима сријемуша (*Allium ursinum* L.) екстрахованим у етанолу и метанолу. Резултати представљају средње вриједности двије екстракције за оба растварача

#### Концентрација укупних флавоноида

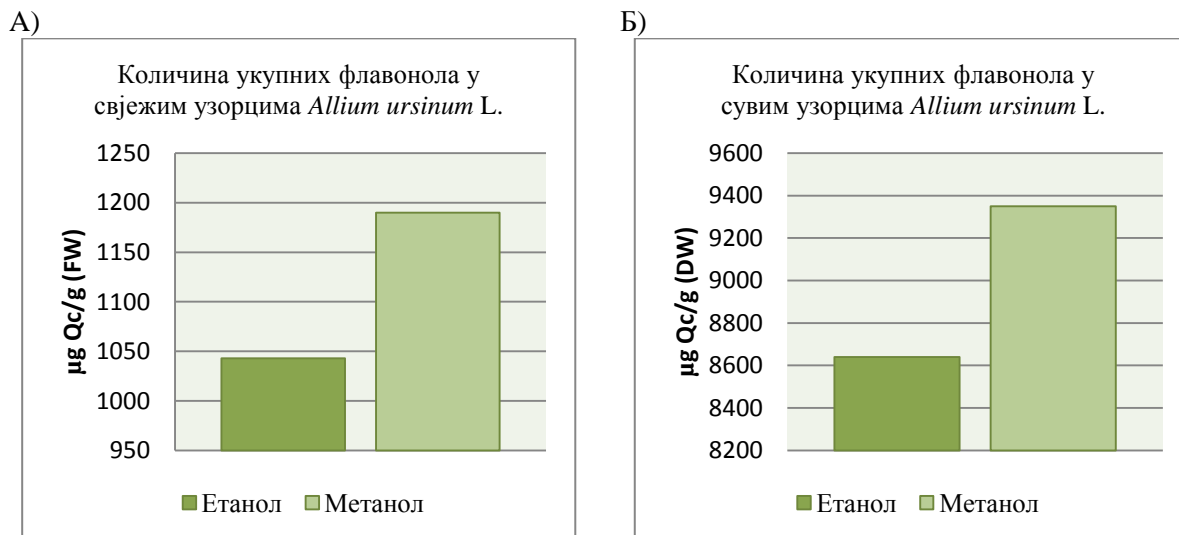
Резултати за укупне флавоноиде, у свјежим и сувим узорцима екстрахованим етанолом и метанолом представљени су на слици 2. Количина укупних флавоноида у етанолном екстракту у сувим узорцима (Слика 2Б) износила је 8220 µg Qc/g DW и била је већа 8,6 пута у односу на свјеже узорке (Слика 2А) (951 µg Qc/g FW) за исти растварач. И у метанолном екстракту, количина укупних флавоноида била је већа у сувим узорцима (9541 µg Qc/g DW) у односу на свјеже узорке (1026 µg Qc/g FW) и то за 9,3 пута.



**Слика 2.** Количина укупних флавоноида у свјежим (А) и сувим (Б) узорцима сријемуша (*Allium ursinum* L.) екстрахованим у етанолу и метанолу. Резултати представљају средње вриједности двије екстракције за оба растварача

### Концентрација укупних флавонола

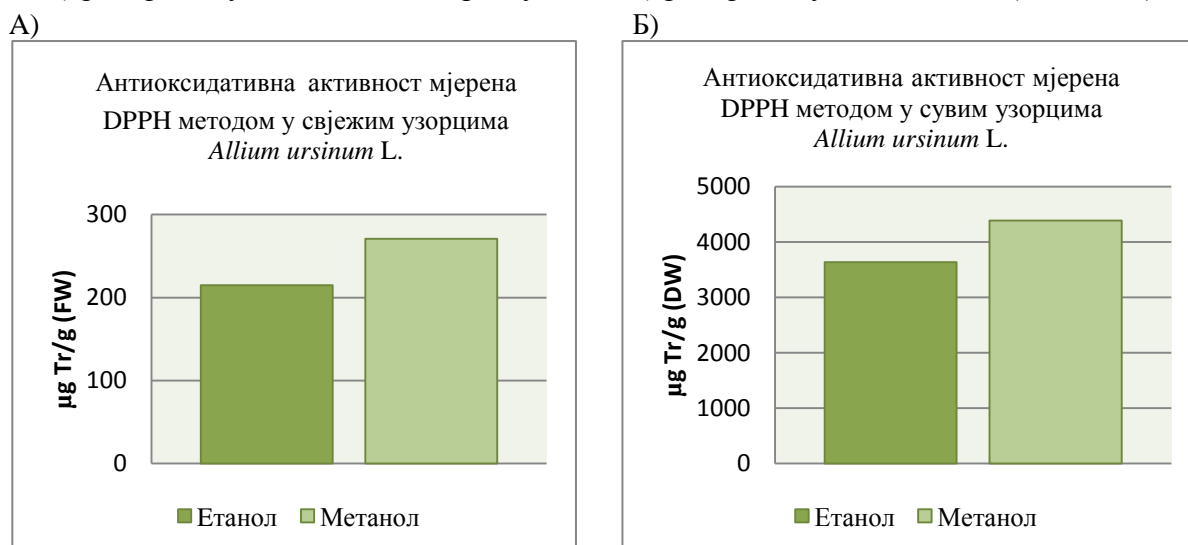
Количина укупних флавонола у свјежим узорцима екстрахованим етанолом износила је 1043  $\mu\text{g Qc/g FW}$ , док је у метанолном екстракту била 1190  $\mu\text{g Qc/g FW}$  (Слика 3А). У сувим узорцима укупна количина флавонола у етанолном екстракту износила је 8640  $\mu\text{g Qc/g DW}$ , а у метанолном 9350  $\mu\text{g Qc/g DW}$  (Слика 3Б) и била је већа за оба растварача  $\sim 8$  пута у односу на свјеже узорке.



**Слика 3.** Количина укупних флавонола у свјежим (А) и сувим (Б) узорцима сријемуша (*Allium ursinum* L.) екстрахованим у етанолу и метанолу. Резултати представљају средње вриједности двије екстракције за оба растварача

### Антиоксидативна активност у односу на DPPH радикал

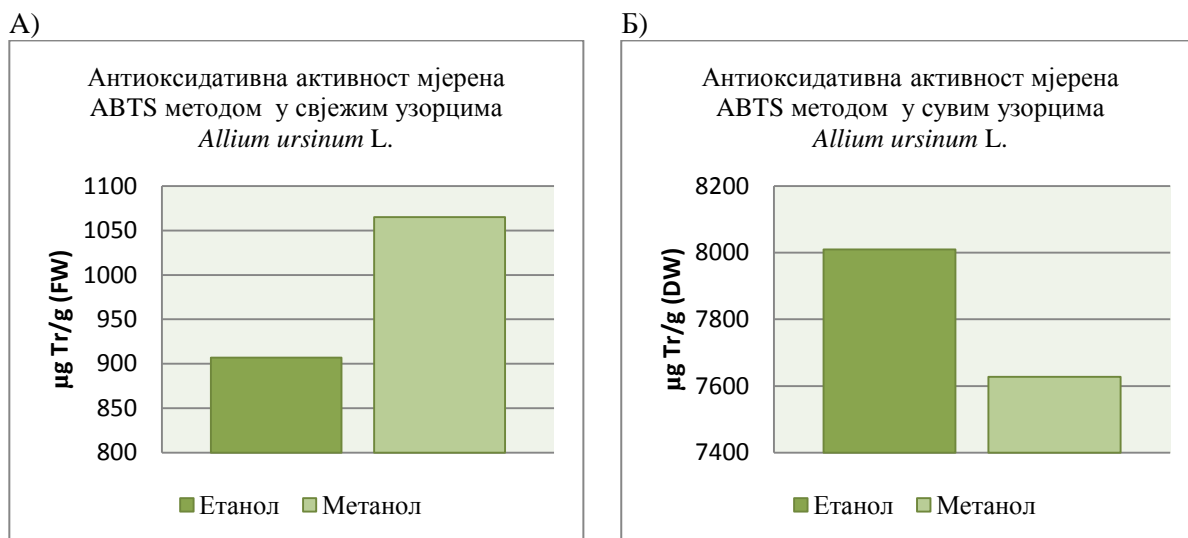
На слици 4 приказана је антиоксидативна активност у односу на DPPH радикал у свјежим и сувим узорцима сријемуша екстрахованим етанолом и метанолом, изражена у  $\mu\text{g Tr/g}$ . Антиоксидативна активност измјерена DPPH методом у свјежим узорцима екстрахованим етанолом износила је 215  $\mu\text{g Tr/g FW}$ , а метанолом 271  $\mu\text{g Tr/g FW}$  (Слика 4А). У сувим узорцима антиоксидативна активност била је значајно већа и износила је 3637  $\mu\text{g Tr/g DW}$  у етанолном екстракту и 4387  $\mu\text{g Tr/g DW}$  у метанолном (Слика 4Б).



**Слика 4.** Антиоксидативна активност екстракта сријемуша (*Allium ursinum* L.) у свјежим (А) и сувим (Б) узорцима екстрахованим у етанолу и метанолу мјерена DPPH методом. Резултати представљају средње вриједности двије екстракције за оба растварача

### Антиоксидативна активност у односу на ABTS радикал

Антиоксидативна активност екстракта сријемуша мјерена у односу на ABTS у свјежим и сувим узорцима екстрахованим етанолом и метанолом, изражена је у  $\mu\text{g Tr/g}$  (Слика 5). Антиоксидативна активност измјерена ABTS методом у свјежим узорцима (Слика 5А) екстрахованим етанолом износила је  $907 \mu\text{g Tr/g FW}$ , а метанолом  $1065 \mu\text{g Tr/g FW}$ . У сувим узорцима (Слика 5Б) антиоксидативна активност износила је  $8010 \mu\text{g Tr/g DW}$  у етанолном екстракту и  $7627 \mu\text{g Tr/g DW}$  у метанолном и била знатно већа (8,8 пута у етанолном и 7,2 пута у метанолном) у односу на екстракт свјежег узорка сријемуша.

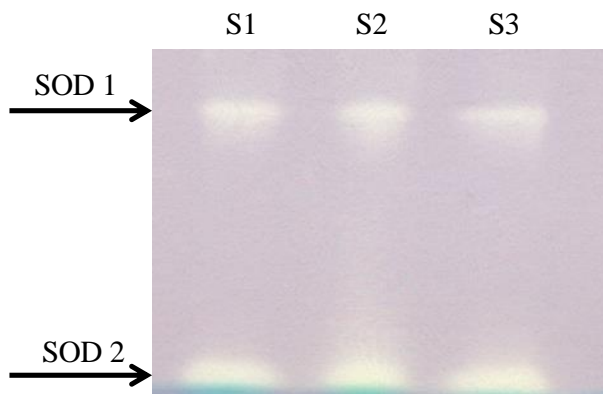


Слика 5. Антиоксидативна активност екстракта сријемуша (*Allium ursinum L.*) у свјежим (А) и сувим (Б) узорцима екстрахованим у етанолу и метанолу мјерена ABTS методом. Резултати представљају средње вриједности двије екстракције за оба растварача

### **Ензимски антиоксидативни статус**

#### Карактеризација SOD изоформи

Након специфичног бојења гелова за SOD у свим узорцима детектоване су двије изоформе супероксид дисмутазе (означене са SOD 1 и SOD 2) са Rf-вриједностима: Rf SOD 1 =  $0,645 \pm 0,003$  и Rf SOD 2 =  $0,966 \pm 0,006$  (Слика 6).

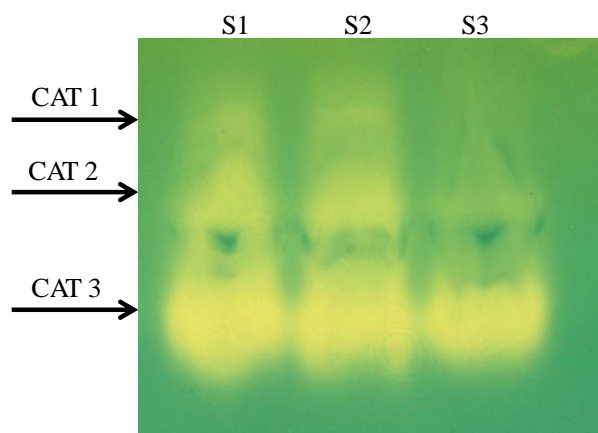


Слика 6. Нативни електрофоретски гел са раздвојеним SOD 1 и SOD 2 изоформама из екстракта протеина свјежих листова сријемуша



### Карактеризација САТ изоформи

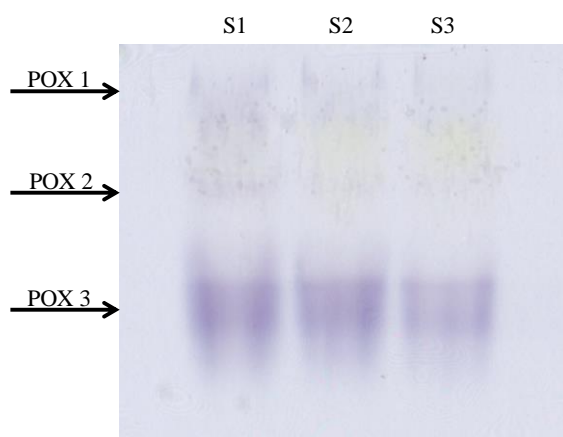
На слици 7 представљен је нативни гел са раздвојеним САТ изоформама у узорцима сријемуша након специфичног бојења за каталазу. У свим узорцима детектоване су три изоформе каталазе (означене са САТ 1, САТ 2 и САТ 3) са Rf-вриједностима: Rf САТ 1 =  $0,143 \pm 0,006$ , Rf САТ 2 =  $0,248 \pm 0,003$  и Rf САТ 3 =  $0,379 \pm 0,005$ .



**Слика 7.** Нативни електрофоретски гел са раздвојеним САТ 1, САТ 2 и САТ 3 изоформама из протеинског екстракта свјежих листова сријемуша

### Карактеризација РОХ изоформи

Након специфичног бојења гелова за РОХ, у свим узорцима сријемуша детектоване су три РОХ изоформе (означене са РОХ 1, РОХ 2 и РОХ 3) са Rf-вриједностима: Rf РОХ 1 =  $0,112 \pm 0,006$ , Rf РОХ 2 =  $0,223 \pm 0,004$  и Rf РОХ 3 =  $0,435 \pm 0,005$  (Слика 8).



**Слика 8.** Нативни електрофоретски гел са раздвојеним РОХ 1, РОХ 2 и РОХ 3 изоформама из протеинског екстракта свјежих листова сријемуша

## ДИСКУСИЈА

Задњих година у фокусу истраживача су испитивања антиоксидативних особина биљака из рода *Allium* због њихових изузетних фармаколошких особина (Štajner и Popović, 2009). Фармаколошки ефекат екстракта сријемуша различит је за различите видове екстракције (Rejatović и сар., 2017) и дијелове биљке који се користе (Štajner и Popović, 2009). Од раније је у литератури познато да фармаколошки ефекти које посједује сријемуш потичу од сумпорних једињења (Sobolewska и сар., 2015). Међутим, важну улогу имају и фенолна једињења за које је показано да имају висок антиоксидативни капацитет (Rejatović и сар., 2017).

Сматра се да је антиоксидативна активност фенола првенствено резултат њихове способности да буду донори водоникових атома и као такви уклањају радикале уз формирање мање реактивних феноксил радикала (Michalak, 2006). Повећана стабилност феноксил радикала приписује се првенствено делокализацији електрона и постојању више резонантних форми. Фенолна једињења могу се класификовати на више начина, а најчешће се уопштено сврставају у три групе: флавоноиди, фенолна једињења нефлавоноидне структуре и испарљива фенолна једињења. Такође, класификација се може заснивати на броју угљеникових атома везаних за основни скелет фенола (Robards и сар., 1999). Феноли се индукују када су биљке заражене или повријеђене, на ниским температурама или ниским хранљивим условима. *In vitro* студије показале су да феноли могу директно да „хватају“ реактивне кисеоничне врсте као што су: супероксид анион радикал, водоник пероксид, хидроксилни радикал, синглет кисеоник, пероксид радикал и сл. Антиоксидативно дјеловање фенола потиче од њихове способности да донирају електроне или атоме водоника (Rice-Evans и сар., 1997). Полифеноли посједују идеалну хемијску структуру за ову активност и експериментално је доказано да су много ефикаснији од витамина Е или С, на моларној бази (Rice-Evans и сар., 1997).

Наши резултати показали су да су концентрације укупних фенола, флавоноида и флавонола веће у случају када је екстракција рађена из сувих листова сријемуша (Слике 1–3). Што се тиче кориштеног растварача за екстракцију, наши резултати показали су да је етанол ефикаснији у екстракцији укупних фенола, док је метанол ефикаснији код екстракције укупних флавоноида и укупних флавонола (Слике 1–3).

У раду Tomšik-а и сарадника (2015) показано је да експериментални услови значајно утичу на количину екстрахованих укупних фенола и флавоноида. Методе екстракције значајно утичу на ниво фенолних једињења у екстракту листа сријемуша (Rejatović и сар., 2017) као и зрелост биљке (Lachowicz и сар., 2017). У раду Rejatovića и сар. (2017), за разлику од наших резултата показано је да је метанол боље екстракционо средство за укупне феноле из сувих листова сријемуша са оба локалитета. Садржај укупних фенола у сувим узорцима (Слика 1Б) који смо ми добили скоро је дупло већи него у узорцима узетим са оба локалитета (Чемерно и Горње Липово у Колашину) испитивана у раду Rejatovića и сар. (2017). Исти аутори показали су да на садржај укупних фенола у листу сријемуша утиче и локалитет са кога су узорци узети, што може бити такође разлог одступања њихових резултата од наших.

Ми смо показали да је боља екстракција укупних флавоноида у метанолу у сувим узорцима. Кадић (2017) у свом мастер раду на биљци сријемуш показала је да је

концентрација флавоноида добијена ултразвучном екстракцијом сувих узорака у етанолу износила 79,60 и 64,29 mg QE/g суве масе листа за два различита локалитета. Аутор је такође показао да екстракција на повишеној температури (70°C) у етанолу смањује принос флавоноида у одосу на ултразвучну екстракцију (68,90 и 44,30 mg QE/g суве масе листа за два различита локалитета). Већа количина флавоноида у њиховом екстракту у односу на наш може бити последица другачијег начина припремања екстракта, а и локалитети са којих су се узимали узорци сријемуша у њиховом и нашем раду су различити. С друге стране Рејатовић и сар. (2017) показали су да је метанол ефикаснији у екстракцији укупних флавоноида из сувих листова сријемуша са оба локалитета, при чему су њихове вриједности за флавоноиде у опсегу 13,75–20,00 mg QE/g суве масе листа и 2,50–6,87 mg QE/g суве масе листа за два локалитета. У поређењу са нашим резултатима за укупне флавоноиде (Слика 2), садржај флавоноида са једног локалитета је већи, а са другог мањи. Флавоноли су једна од најзначајнијих подгрупа флавоноида при чему је кверцетин најраспрострањенији. Позната је антимикуробна, антиалергијска и антиоксидативна улога флавонола, мада је позната и њихова прооксидативна улога. Oszmianski и сарадници (2013) у свом раду показали су да је у метанолном екстракту листова сријемуша укупна количина флавонола 1856,31 mg/100 g суве масе.

Методе екстракције одређују и антиоксидативни капацитет екстракта (Velioğlu и сар., 1998). Наши резултати показују да је антиоксидативни капацитет екстракта сувих листова сријемуша у односу на DPPH радикал већи у метанолној фракцији (слика 4). У свом раду, Рејатовић и сар. (2017) показали су да нема разлике између метанолне и етанолне фракције за један локалитет, док метанолна фракција показује већи антиоксидативни капацитет за други локалитет. На антиоксидативну активност екстракта листова сријемуша мјерену DPPH методом утичу биљни орган и период узорковања (Lachowicz и сар., 2017). Антиоксидативна активност измјерена ABTS методом већа је у етанолном екстракту сувих листова сријемуша (Слика 5). У раду Lachowicz-а и сарадника (2017) показано је да способност редукције слободних радикала одређена ABTS тестом зависи од биљног органа који се користи и периода узимања узорака. Аутори су показали да је у листовима узоркованим у јуну највећа антиоксидативна активност мјерена ABTS методом. Осим наведеним једињењима, лековита својства биљке сријемуш приписују се и високим концентрацијама стероидних гликозида и другим једињењима (лектини, полисахариди, масне киселине, пигменти итд.) (Sobolewska и сар., 2015).

Супероксид дисмутаза сматра се најважнијим ензимом антиоксидативне одбране у одговору на различите врсте стреса, а код биљака је укључена и у процесе клијања, растења, развића (Singh и сар., 2010; Mitrović и сар., 2010). Ми смо у листовима сријемуша нативном електрофорезом детектовали двије SOD изоформе (Слика 6). У досадашњој литератури показана је већа активност SOD у луковицама, док је активност CAT и POX већа у листовима сријемуша (Štajner и сар., 2008), али нема података о изоформама SOD CAT и POX. Каталаза има висок афинитет према водоник пероксиду и уклања вишак водоник пероксида који настаје у биљним ћелијама као последица различитих врста стреса. У биљним ћелијама детектован је велики број пероксидазних изоформи које су укључене у важне процесе у ћелији: лигнификација (синтези лигнина), суберинизација, унакрсно повезивање (*eng. cross-linking*) структурних протеина ћелијског зида, метаболизам хормона (примјер, катаболизам ауксина), одбрана против патогена, уклањање H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и старења (Hiraga и сар., 2001). Наши резултати показали су присуство

двје SOD и три CAT и POX изоформе (Слике 6–8). У доступној литератури нисмо пронашли податке о изоензимским профилима SOD, CAT и POX у листовима сријемуша.

## ЗАКЉУЧАК

Наши резултати показали су високу антиоксидативну активност, како неензимску (феноли) тако и ензимску (SOD, CAT и POX), листовима сријемуша са локалитета општине Лакташи у Републици Српској. Добијени резултати указују да биљка сријемуш посједује антиоксидативне особине које би јој могле омогућити преживљавање и адаптацију на различите услове у животној средини, а с друге стране, и да се може користити у фармаколошке сврхе.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Beauchamp, C., I. Fridovich: Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry* 44(1): 276–287, 1971.
2. Croft, K. D.: Antioxidant effects of plant phenolic compounds. In: **Antioxidants in Human Health and Disease**. CABI Publishing, New York, New York, 109–121, 1999.
3. Halliwell, B., J. M. Gutteridge: **Free radicals in biology and medicine**. Third edition. Oxford University Press, USA, 1999.
4. Hiraga, S., K. Sasaki, H. Ito, Y. Ohashi, H. Matsui: A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology* 42(5): 462–468, 2001.
5. Kadić, L.: Fitohemijaska analiza vrste *Allium ursinum* L. (Alliaceae) sa aspekta prisustva flavonoida. Master rad, Univerzitet u Sarajevu, Farmaceutski fakultet, 2017.
6. Kumaran, A., R. J. Karunakaran: In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. *LWT-Food Science and Technology* 40(2): 344–352, 2007.
7. Lachowicz, S., J. Kolniak-Ostek, J. Oszmia-Nski, R. Wiśniewski: Comparison of phenolic content and antioxidant capacity of bear garlic (*Allium Ursinum* L.) in different maturity stages. *Journal of food processing and preservation* 41(1), 2017.
8. Liyana-Pathirana C.M., F. Shahidi: Antioxidant Activity of Commercial Soft and Hard Wheat (*Triticum aestivum* L.) as Affected by Gastric pH Conditions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 53(7): 2433–2440, 2005.
9. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265–275, 1951.
10. Michalak, A.: Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies* 15(4): 523–530, 2006
11. Mitrović, A., B. Živanović, T. Dučić, J. B. Pristov, K. R. Hadži-Manić: *Chenopodium rubrum* L. as a model plant for physiological and biochemical investigations of ontogenesis in vitro. *Biologica Nyssana 1: (1–2)*, 2010.
12. Ohshima, H., Y. Yoshie, S. Auriol, I. Gilbert: Antioxidant and prooxidant actions of flavonoids: effects on DNA damage induced by nitric oxide, peroxy nitrite and nitroxyl anion. *Free Radical Biology and Medicine* 25: 1057–1065, 1998.
13. Ordonez, A. A. L., J. D. Gomez, M.A. Vattuone: Antioxidant activities of *Sechium edule*

- (Jacq.) Swartz extracts. *Food chemistry* 97(3): 452–458, 2006.
14. Oszmianski, J., J. Kolniak-Ostek, A. Wojdyło: Characterization and content of flavonol derivatives of *Allium ursinum* L. plant. *Journal of agricultural and food chemistry* 61(1): 176–184, 2013.
  15. Pejatović, T., D. Samardžić, S. Krivokapić: Antioxidative properties of a traditional tincture and several leaf extracts of *Allium ursinum* L. (collected in Montenegro and Bosnia and Herzegovina). *Journal of Materials and Environmental Sciences*: 1929–1934, 2017.
  16. Re, R., N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26(9–10): 1231–1237, 1999.
  17. Rice-Evans, C., N. Miller, G. Paganga: Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science* 2(4): 152–159, 1997.
  18. Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food chemistry*, 66(4): 401–436, 1999.
  19. Sharma, P., A. B., Jha, R. S. Dubey, M. Pessarakli: Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of botany* 2012: 2012.
  20. Singh, B. K., S. R. Sharma, B. Singh: Antioxidant enzymes in cabbage: variability and inheritance of superoxide dismutase, peroxidase and catalase. *Scientia Horticulturae* 124(1): 9–13, 2010.
  21. Sobolewska, D., I. Podolak, J. Makowska-Wąs: *Allium ursinum*: botanical, phytochemical and pharmacological overview. *Phytochemistry reviews* 14(1): 81–97, 2015.
  22. Štajner, D., B. Popović: Comparative study of antioxidant capacity in organs of different *Allium* species. *Open Life Sciences* 4(2): 224–228, 2009.
  23. Štajner, D., B. M. Popović, J. Čanadanović-Brunet, M. Štajner: Antioxidant and scavenger activities of *Allium ursinum*. *Fitoterapia* 79(4): 303–305, 2008.
  24. Tomšik, A., B. Pavlič, J. Vladić, M. Ramić, J. Brindza, S. Vidović: Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). *Ultrasonics sonochemistry* 29: 502–511, 2016.
  25. Velioglu, Y. S., G. Mazza, L. Gao, B. D. Oomah: Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of agricultural and food chemistry* 46(10): 4113–4117, 1998.
  26. Wolfe, K., X. Wu, R.H. Liu: Antioxidant Activity of Apple Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(3): 609–614, 2003.
  27. Woodbury, W., A.K. Spencer, M.A. Stahmann: An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isoenzymes. *Analytical biochemistry* 44(1): 301–305, 1971.

Примљено: 09.06.2018.

Одобрено: 30.08.2018.