

Parametri oksidacijskog stresa u klijanaca rotkvice (*Raphanus sativus* L.) nakon izloženosti ekstraktu žljezdastog nedirka (*Impatiens glandulifera* Royle)

Jagodar, Leona

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:813584>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Leona Jagodar

**Parametri oksidacijskog stresa u klijanaca rotkvice
(*Raphanus sativus* L.) nakon izloženosti ekstraktu
žljezdastog nedirka (*Impatiens glandulifera* Royle)**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Stanična biologija s genetikom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za Farmaceutsku botaniku pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ana-Marije Domijan.

Veliku zahvalu dugujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Ana-Mariji Domijan na ukazanoj pomoći, strpljenju, ugodnoj radnoj atmosferi i iznimnoj dostupnosti tijekom izrade ovog rada. Zahvaljujem svojoj obitelji i suprugu koji su mi pružili bezuvjetnu ljubav i bez čije podrške ne bih bila tu gdje jesam.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Alelopatija i alelokemikalije.....	2
1.2. Biljna interferencija	3
1.3. <i>Impatiens glandulifera</i> Royle - žljezdasti neditrak.....	4
1.3.1. Opis vrste	4
1.3.2. Invazivnost i fitotoksični učinak žljezdastog neditrka	6
1.4. Oksidacijski stres.....	7
1.4.1. Lipidna peroksidacija.....	8
1.4.2. Oksidirani proteini	10
1.4.3. Odgovor biljke na oksidacijski stres	10
1.4.3.1. Glutation (GSH)	11
1.4.3.2. Flavonoidi - antocijanini.....	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME	13
3. MATERIJALI I METODE	15
3.1. Materijali	16
3.1.1. Kemikalije.....	16
3.1.2. Oprema.....	17
3.1.3. Biljni model	17
3.2. Metode	18
3.2.1. Biološki pokus – germinacija.....	18
3.2.2. Metoda određivanja GSH.....	20
3.2.3. Metoda određivanja antocijanina	22
3.2.4. Metoda određivanja MDA	24
3.2.5. Metoda određivanja oksidiranih proteina	25
3.3. Statistička obrada rezultata	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	29

4.1. Masa svježeg tkiva.....	30
4.2. GSH	31
4.3. Antocijanini	33
4.4. MDA.....	35
4.5. Oksidirani proteini.....	36
5. ZAKLJUČCI.....	39
6. LITERATURA.....	41
7. SAŽETAK / SUMMARY	47
8. PRILOG	50
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Alelopatija i alelokemikalije

Danas možemo pronaći mnoge suvremene i proširene definicije alelopatije, ali osnova im i dalje ostaje ista. Rice 1974. godine definira alelopatiju kao svaki izravan ili neizravan negativan učinak nastao oslobađanjem kemijskih tvari u okoliš s jedne biljke (uključujući i mikroorganizme) na drugu biljku, tj. opisuje je samo kao nepovoljan učinak – inhibiciju (Narwal, 2004). Definicija je kasnije korigirana te se pod tim pojmom podrazumijevaju štetne, ali i pozitivne uzajamne (grč. *allelon* – uzajamno) biokemijske interakcije, iako sam korijen riječi ima uporište iz grčkog jezika *páthos* (hrv. patnja, bolest) (Kovačević, 1979). Haig (2008) alelokemikalije definira kao prirodne, neprehrambene sekundarne metabolite biljnih vrsta nastale primarnim metaboličkim procesima, koji ispoljavaju učinke na rast, zdravlje, ponašanje ili biologiju susjednih organizama (biljne i životinjske vrste te mikroorganizme). Takvo djelovanje odvija se otpuštanjem spojeva iz nadzemnih biljnih dijelova, ispiranjem za vrijeme padalina, izlučivanjem iz korijena, volatizacijom plinova u suhim uvjetima i razgradnjom biljnih ostataka (Chou, 1990). Slika 1. prikazuje navedene načine oslobađanja alelokemikalija u okoliš na primjeru žljezdastog nedirka (*Impatiens glandulifera* Royle). Pojedini autori navode korijen kao glavni izvor alelokemikalija, a uvriježeno je mišljenje kako su one prisutne u svim dijelovima biljke, poput stabljike, listova, plodova, cvjetova i sjemenki. Bhowmik i Inderjit (2003) te Rice (1984) objašnjavaju kako učinci na fizikalno-kemijske procese ovise najprije o koncentraciji otpuštenih kemikalija, ali i metaboličkom stadiju i starosti biljke, klimi, godišnjem dobu i okolini.

Na temelju kemijske strukture, alelokemikalije su razvrstane i nabrojane u šest kategorija: alkaloidi, benzoksazinoni, derivati cinamične kiseline, cijanogenični spojevi, etilen i drugi stimulatori klijanja sjemena i flavonoidi (Putnam, 1988). Promjenom kemijske strukture, uslijed metabolizma i djelovanja okoline, postaju aktivni spojevi koji sporadično u kombinaciji s drugim tvarima daju još jači alelopatski učinak.

Ne postoji jedinstven mehanizam i ciljano mjesto djelovanja za sve alelokemikalije. Učinak alelokemikalija jedne biljke na drugu često je raznolik i uključuje promjene na razini puči, floema, ksilema, dijeljenja stanice, permeabilnosti membrane, respiracije i fotosinteze, funkciji enzima i biljnih hormona, prikupljanja hranjivih tvari, klijanja i drugih fizioloških procesa biljke. Ti efekti, u smislu inhibicijskog alelopatskog učinka, ogledaju se u promjeni boje i volumena sjemenke, odgođenom i sporijem klijanju, skraćenom korijenu i produženom izdanku klice uz moguće odumiranje vrha ili kovrčanja korijena, povećanom broju postranih korjenčića i smanjenju reproduktivnog potencijala (Haig, 2008).



Slika 1. Mogući putevi otpuštanja alelokemikalija u okoliš (preuzeto s url: <https://lizzieharper.co.uk/image/himalayan-balsam-impatiens-glandulifera/> i prilagođeno)

1.2. Biljna interferencija

Negativan alelopatski učinak jedne biljke na drugu ispoljava se u otpuštanju, to jest dodavanju kemijskog spoja u okoliš koji će potom štetno djelovati na biljku efektor. S druge strane, kompeticija podrazumijeva oduzimanje ili redukciju čimbenika iz okoliša koji su nužni za rast i razvoj biljke koja dijeli stanište. To se događa kada biljke iz istog životnog prostora imaju sve veće potrebe za istim, količinski ograničenim izvorom, te se jedna biljka (primjerice korov, žljezdasti nedarak) nametne i nadjača drugu biljku (primjerice kultiviranu biljku, rotkvicu) i „preotme” joj potrebne količine vode, svjetlosti, hrane, minerala i topline.

Mnogi autori navode kako je alelopatiju i kompeticiju često nemoguće odvojiti (Kazinczi i sur., 2001; Quasem i Foy, 2008). Zbog toga Harper 1964. godine uvodi pojam „biljna interferencija” koji opisuje nepovoljan učinak biljaka koje rastu u zajednici, a rezultat je sinergije alelopatije i kompeticije (Quasem i Foy, 2008). Smatra se da se alelopatija javlja kao posljedica kompeticije, odnosno onda kada su biljke u stresu zbog ograničenih životnih uvjeta te se u takvim uvjetima snažno poveća produkcija alelokemikalija. Treba se imati na

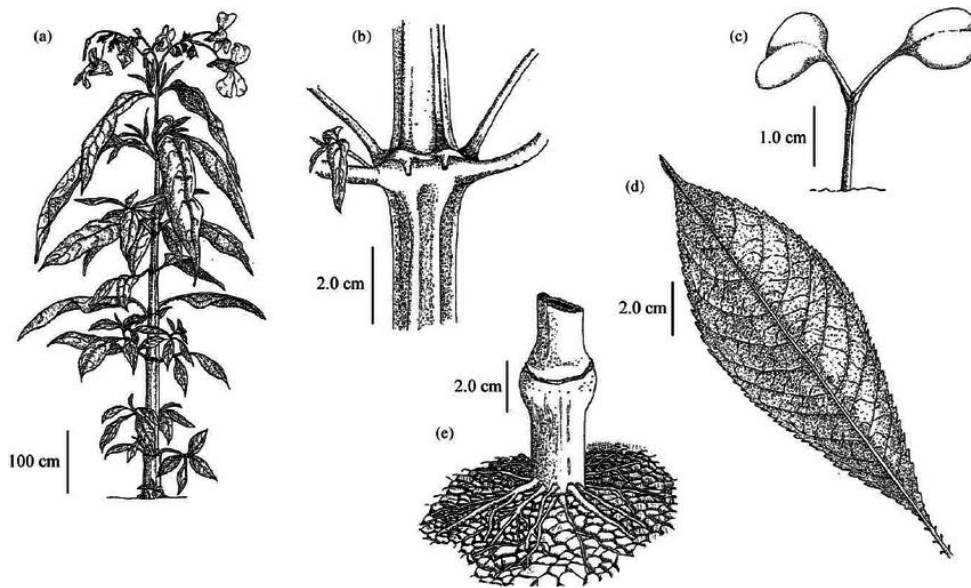
umu da se obje pojave mogu javiti istovremeno pod pretpostavkom da će učinci alelopatije najčešće biti suptilniji.

Veliko je zanimanje za alelopatski potencijal invazivnih ne-nativnih vrsta, osobito korova koji su, za razliku od uzgojenih biljaka, evolucijski probrani po kriteriju alelopatskog učinka pa se može zaključiti kako će imati veći alelopatski potencijal od kultiviranih biljnih vrsta, kojima se izgube mnoga svojstva tokom oplemenjivanja.

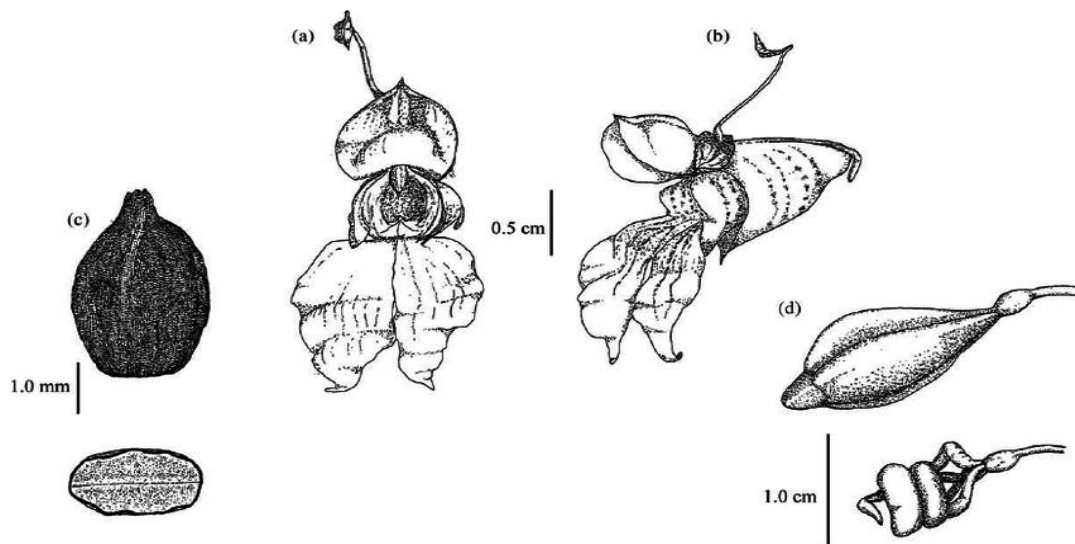
1.3. *Impatiens glandulifera* Royle - žljezdasti nedarak

1.3.1. Opis vrste

Impatiens glandulifera Royle (hrv. žljezdasti nedarak, vodenika, netik) jednogodišnja je egzotična zeljasta biljka iz porodice Balsaminaceae (hrv. neticaljke) koja potječe iz južne Azije, Himalaja i Indije, a kao pridošlica u floru Republike Hrvatske dospijeva kao ukrasna biljka. Uspravna, razgranata i glatka stabljika doseže do 2,5 metra visine (Basrek, 2019). Korijenje prodire u tlo svega petnaestak centimetara. Listovi su nasuprotni ili po tri u pršljenu, ušiljenog vrha i nazubljenih rubova, dugački do 20 centimetara te 4-5 puta duži od svoje širine (<http://civ.iptpo.hr/zljezdasti-nedarak/>). Cvjetovi su zigomorfni, dvospolni, purpurno-ljubičasti s čaškom građenom od 3 do 5 lapova, vjenčićem od 5 latica, nadraslom plodnicom s 5 sraslih plodnih listova te 5 prašnika. Cvjetovi se skupljaju u cvat od 5–12 grozadastih cvjetova koji se razvijaju u pazušcima listova. Prepoznatljiva je po plodu, duguljastom tobolcu koji se nakon zriobe otvara i na najmanji poticaj (osobito dodir, otuda i naziv „nedirak”) puca eksplozivno bacajući okruglaste crne sjemenke u radijusu do 7 metara od matične biljke (Nikolić i sur., 2014). Uglavnom se proizvede od 700 do 2500 sjemenki po biljci. Cvate od lipnja do listopada, tolerira svjetlost i sjenu te širok raspon tipova tla, a osjetljiva je na nedostatak vlage (Beerling i Perrins, 1993). Slike 2. i 3. prikazuju vegetativne i reproduktivne karakteristike žljezdastog nedaraka.



Slika 2. Vegetativne osobine žljezdastog nedirka: a) cjelokupan izgled biljke b) čvor stabljike koji pokazuje sporedne listiće u obliku prstiju c) klijalica u fazi kotiledona d) list e) osnova stabljike koja pokazuje nabubreni prvi čvor i adventivno korijenje uz površinu tla (preuzeto iz: Clements i sur., 2007 i prilagođeno)



Slika 3. Reproductive osobine žljezdastog nedirka: a) cvijet, prednji pogled b) cvijet, bočni pogled c) bočni pogled sjemena (gornji) i presjek (dolje) d) bočni pogled na netaknutu kapsulu (gornji) i bočni pogled na raspuknutu kapsulu (donji) (preuzeto iz: Clements i sur., 2007 i prilagođeno)

1.3.2. Invazivnost i fitotoksični učinak žljezdastog nedirka

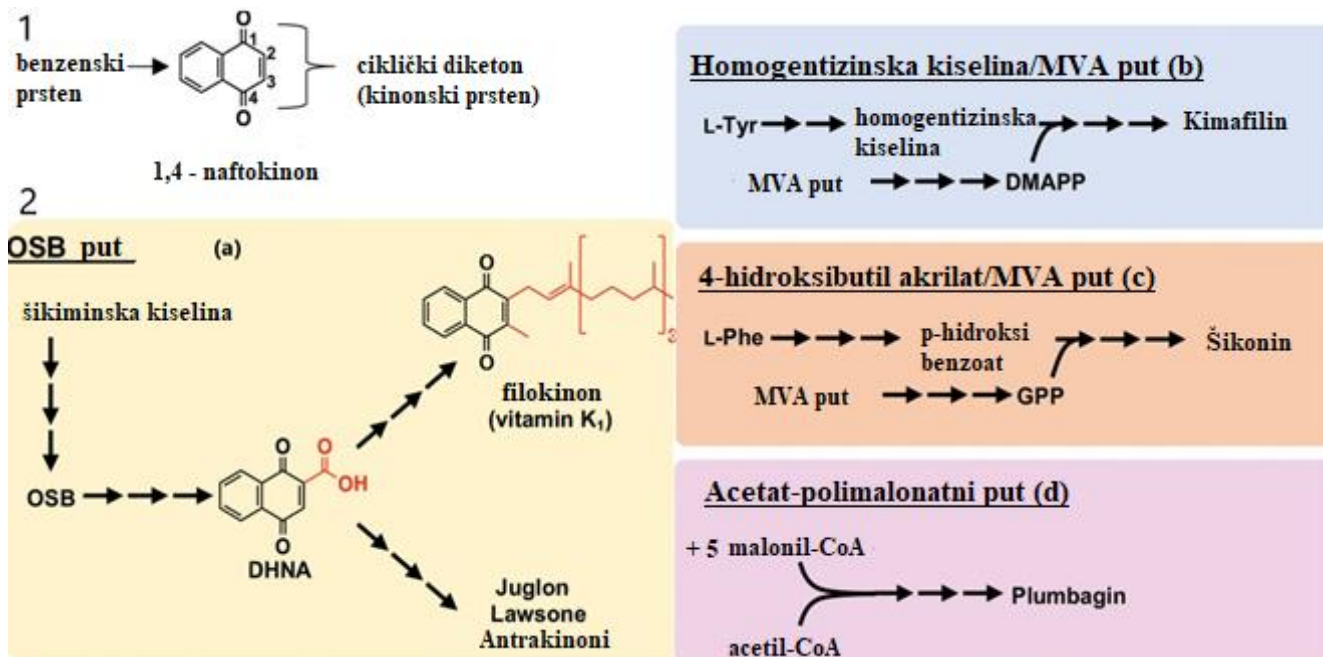
Žljezdasti nedirak iz vrtova je prešao u divljinu i na mnogim mjestima (obale tekućica, rubovi šuma, livade, močvare, kanali, zapuštena urbana područja, duž prometnica) počeo nekontrolirano rasti kao korovna vrsta. Napredovanju ove vrste u korist ide velika količina proizvedenog sjemenja, samorasprostranjivanje katapultiranjem sjemenki na velike udaljenosti, često nenamjerno širenje prijevozom tla, otpada te poplavama, ali i velika produkcija nektara koji priziva insekte na oprašivanje, dominacija visinom nad lokalnom vegetacijom čime zasjenjuje ostale biljke, otpornost u mnogim vrstama tla i vremenskim uvjetima (Clements i sur., 2007).

Osim kompetitivnih osobina, žljezdasti nedirak posjeduje visok alelopatski potencijal koji ide u prilog agresivnosti i perzistentnosti, inhibirajući klijanje i rast konkurentnih biljaka čime istiskuje ostale biljke sa staništa i dolazi u nadređeni položaj. Smatra se da su za invazivnost žljezdastog nedirka zaslužni prvenstveno naftokinoni sadržani u svim dijelovima biljke (Ruckli i sur., 2014; Block i sur., 2019). Žljezdasti nedirak proizvodi i oslobađa dva naftokinona: 2-metoksi-1,4-naftokinon i 2-hidroksi-1,4-naftokinon. Prisustvo 1,4-naftokinona (1,4-NQ) utvrđeno je u lišću i korijenu te u cvjetnom nektaru žljezdastog nedirka; pretpostavlja se da bi prisustvo 1,4-NQ u cvjetnom nektaru moglo služiti kao zaštita bogatog nektara od rasta gljivica. Zbog njihove zastupljenost u ekstrafloralnim nektarijima može se pretpostaviti da 1,4-NQ dolaze u tlo ispiranjem kišom, a gdje onda ispoljavaju svoje alelopatske učinke (Block i sur., 2019).

Biljni 1,4-NQ obuhvaćaju skupinu specijaliziranih metabolita za koje je poznato da posreduju u brojnim reakcijama. Najnovija istraživanja potvrđuju postojanje višestrukih putova za sintezu 1,4-NQ. Slika 4 prikazuje strukturu i biosintetske puteve biljnih 1,4-NQ. Zanimljivo je za primijetiti da se mnogi 1,4-NQ izlučuju u rizosferu i, jer su vrlo reaktivni, biljke koje ih sintetiziraju trebale su evoluirati k razvitku strategije za njihovo raspoređivanje i rezistenciju na njihove učinke (Meyer i sur., 2021).

U istraživanju inhibitornog potencijala 1,4-NQ žljezdastog nedirka koji je sakupljen u okolici Basela (Švicarska) identificiran je i potom kvantificiran sadržaj 2-metoksi-1,4-naftokinona u kotiledonima, lišću, stabljici i korijenu, kao i u ekstraktima tla i kišnici koja se ispire iz lišća uporabom UHPLC-MS-a (Ruckli i sur., 2014). Ti rezultati su pokazali da se 2-metoksi-1,4-naftokinon oslobađa iz korijena biljke te da ga kiša ispire s lišća u okolno tlo. U tom istraživanju specifičnim biotestovima utvrđen je snažan inhibitorni učinak vodenog ekstrakta izdanaka i korijena žljezdastog nedirka na klijanje dviju vrsta šumskih biljaka i na rast

micelija tri gljive ektomikorize, što ukazuje da oslobađanje 2-metoksi-1,4-naftokinona pridonosi invazivnosti žljezdastog nedirka.

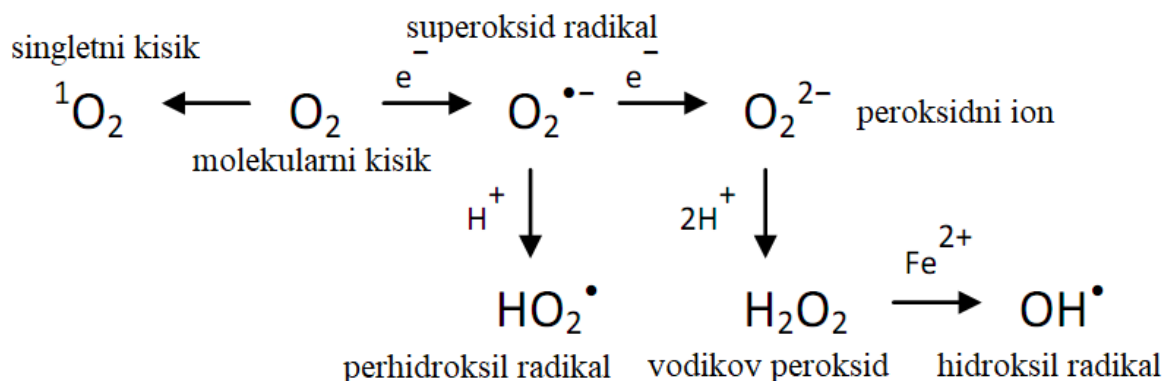


Slika 4. Struktura (1) i biosintetski putevi (2a-2d) biljnih 1,4-naftokinona (preuzeto iz: Meyer i sur., 2021 i prilagođeno); Kratice: DHNA - 1,4 dihidroksinaftalen karboksilna kiselina, DMAPP- dimetilalil difosfat, OSB - o-sukcinilbenzojeva kiselina, MVA - mevalonska kiselina, Lawsone - 2-hidroksi-1,4-naftokinon, Plumbagin - 5-hidroksi-2-metil-1,4-naftokinon, Kimafilin - 2,7-dimetil-1,4-naftokinon

1.4. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres je složena kemijsko-fiziološka pojava neravnoteže oksidansa i antioksidansa u korist oksidansa s posljedicom prekomjernog stvaranja i nakupljanja reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) koja prati gotovo sve biotske (među koje se ubrajaju i alelopatski odnosi između biljaka) i abiotske stresne uvjete u biljkama (Demidchik, 2015).

ROS-ovi, kao produkti neuravnoteženog metabolizama kisika, nastaju prijenosom jednog do tri elektrona na molekularni kisik, pri čemu se proizvode superoksidni radikal ($O_2^{\cdot-}$), vodikov peroksid (H_2O_2) ili hidroksilni radikal ($\cdot HO$), a ekscitacijom molekularnog kisika nastaje visokoenergetski singletni kisik (1O_2) (Yu i Rengel, 1999; Arora i sur., 2002; Bhattacharjee, 2005). Slika 5. prikazuje nastanak ROS-ova.



Slika 5. Nastajanje ROS-ova redukcijom molekularnog kisika (preuzeto s url: <https://osha.washington.edu/modrn/module4> i prilagođeno)

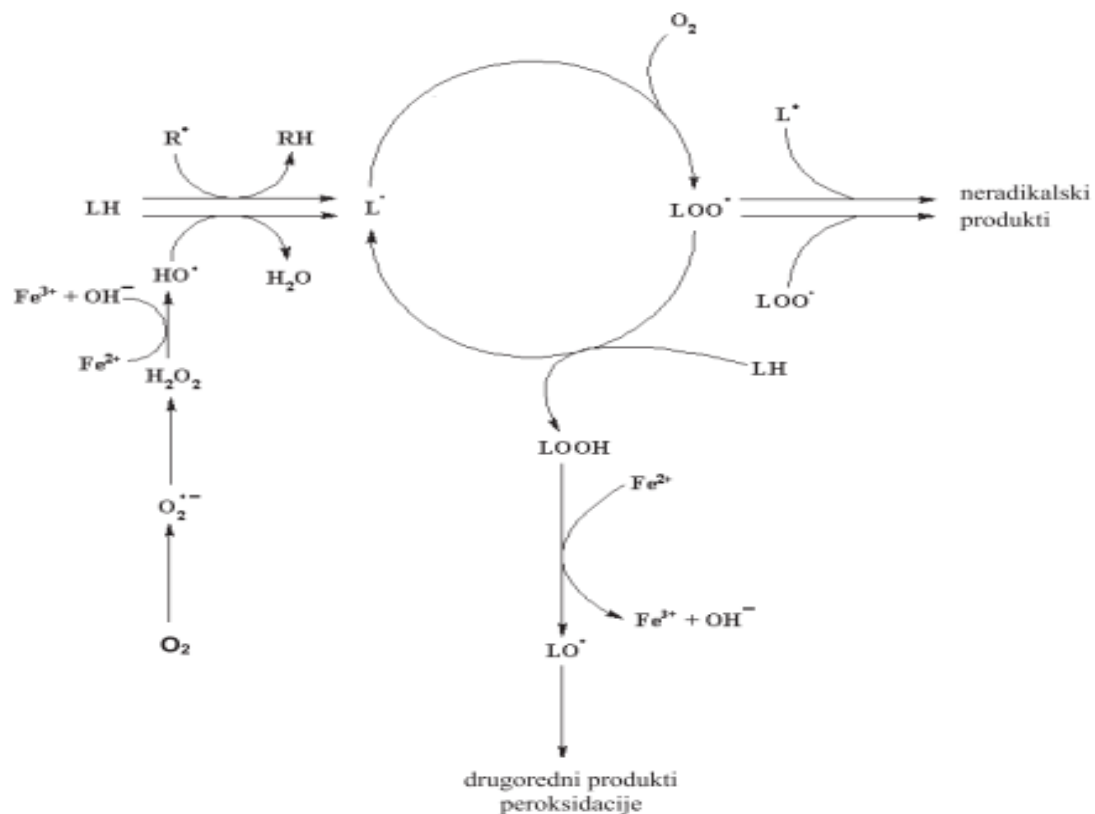
ROS-ovi nastaju u organelima visoke oksidacijske metaboličke aktivnosti ili velikog intenziteta protoka elektrona, poput mitohondrija, kloroplasta, peroksisoma, endoplazmatskog retikuluma i na membranama na kojima se nalaze NADPH-oksidge, amin-oksidge i peroksidaze (Mittler, 2002; Mundree i sur., 2002; Mittler i sur., 2004).

U normalnim fiziološkim uvjetima uklanjanje ROS-ova dobro je regulirano antioksidacijskim obrambenim mehanizmima te, kada je razina ROS-ova niska, djeluju kao drugi glasnici u nizu reakcija u biljnim stanicama, uključujući apoptozu, stjecanje tolerancije na abiotske i biotske stresove i obranu od patogena. Međutim, u visokoj koncentraciji su štetni i ugrožavaju rast i razvoj biljke putem peroksidacije lipida, oksidacije nukleinskih kiselina, denaturacije proteina, inhibicije aktivnosti enzima i aktivacije programirane stanične smrti (Xie i sur., 2019). Dakle, kao rezultat nakupljanja ROS-ova, dolazi do molekularnih i fizioloških promjena kao i promjena pojedinog tkiva ili cijele biljke s tim da su morfološke promjene posljedica kumulativnog djelovanja pojedinih činitelja te izmjena u genskoj ekspresiji i metaboličkim procesima (Ahanger i sur., 2017).

1.4.1. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija prirodni je metabolički proces u normalnim fiziološkim uvjetima i ubraja se u najistraživanije posljedice djelovanja ROS-ova na građu i funkciju membrana (Gaschler i Stockwell, 2017). Slobodni radikali koji sudjeluju u lipidnoj peroksidaciji su OH^{\bullet} , HO_2^{\bullet} , RO^{\bullet} i RO_2^{\bullet} , a sam proces opisan je trima stupnjevima: inicijaciji, propagaciji i terminaciji (slika 6). Zasićene masne kiseline i masne kiseline s jednom dvostrukom vezom otpornije su na djelovanje ROS-ova od višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA) koje posjeduju dvostruke veze u čijoj prisutnosti slabe obližnje C-H veze i izdvaja se atom vodika. Nastali

slobodni lipidni radikali (L^\bullet) pokušavaju se stabilizirati reorganizacijom stvarajući konjugirane diene koji mogu reagirati s molekulom kisika tvoreći peroksilne radikale (LOO^\bullet) koji potom eliminiraju H^\bullet iz nekog drugog organskog spoja. Ako je taj drugi organski spoj sljedeća molekula PUFA-e, dolazi do stvaranja lipidnih hidroperoksida i reaktivnih ugljikovih radikala koji nastavljaju reakciju nastajanja novih slobodnih radikala. U fazi propagacije lipidni hidroperoksidi ($LOOH$) se, u prisutnosti željeza, razdvajaju na LO^\bullet i LOO^\bullet koji reinicijaliziraju peroksidaciju, a mogu nastati i kratkolančani produkti poput ketona, aldehida (primjerice malondialdehida, MDA) i hidroksilnih kiselina koji su također reaktivni. Za terminaciju je nužan antioksidans koji donira vodikov atom LOO^\bullet radikalumu i tako prelazi u radikal antioksidansa koji s drugim radikalom tvori neradikalne produkte (Štefan i sur., 2007).



Slika 6. Lipidna peroksidacija (preuzeto iz: Štefan i sur., 2007 i prilagođeno); Kratice: OH^- - hidroksid, OH^\bullet - hidroksilni radikal, H_2O_2 - vodikov peroksid, LH -lipidna molekula, L^\bullet - lipidni radikal, LO^\bullet - lipidni alkoksilni radikal, LOO^\bullet - lipidni peroksilni radikal, $LOOH$ -lipidni hidroperoksid, R^\bullet - prooksidans, O_2 - kisik, $O_2^{\bullet -}$ - superoksidni radikal

Zbog peroksidacije lipida membrane gube fluidnost, smanjuje im se vrijednost membranskog potencijala, povećava permeabilnost za vodikove i druge ione te, u konačnici, dolazi do puknuća stanične membrane i otpuštanja staničnog sadržaja u okoliš.

Malondialdehid, MDA jedan je od produkata lipidne peroksidacije i uzročnik je oštećenja stanične membrane. Sadržaj MDA, utvrđen u reakciji s tiobarbituratnom kiselinom, predstavlja stupanj lipidne peroksidacije i pokazatelj je tolerancije biljke na stres (Wang i sur., 2004).

1.4.2. Oksidirani proteini

Proteini su osnovne komponente većine bioloških sustava s brojnim ulogama u stanici. Stoga su glavna meta ROS-ova upravo zbog prisutnosti u visokim koncentracijama i visoke konstante brzine reakcije s njima. Radikali, dvoelektronski oksidansi i metal-okso kompleksi mogu modificirati proteine, a reakcije sekundarnih produkata (primjerice aldehida, kinona) daljnji su izvor modifikacija. Zajedno stvaraju širok spektar post-translacijskih modifikacija koje rezultiraju promjenom sastava i strukture aminokiselina i proteina, naboja, hidrofobnosti / hidrofilitnosti, konformacije i funkcije. Nakupljanje oksidativno modificiranih proteina, uslijed povećanog stvaranja ili njihovog smanjenog uklanjanja, dovodi do promjena u prometu proteina i smanjene ili (povremeno) pojačane aktivnosti proteina (Davies, 2016).

Najčešća oksidativna modifikacija proteina je nastajanje proteinskih karbonila te se stoga proteinski karbonili koriste za praćenje razine oksidacijskog oštećenja proteina (Levin i sur., 1990).

1.4.3. Odgovor biljke na oksidacijski stres

Tijekom razdoblja evolucije i domestikacije, biljke su razvile mnoge mehanizme tolerancije na stresne uvjete, a najvažnijom prilagodbom smatra se ona na razini molekularne biologije (Shao i sur., 2007). Odgovori na okolišne promjene se, preko fizioloških i biokemijskih promjena, manifestiraju adaptivnim i morfološkim promjenama. Što je biljka sposobnija obraniti se, brže će i u većem obimu aktivirati gene i sintetizirati enzime koji će sudjelovati u modifikaciji metabolizma s ciljem prilagodbe na stres (Urano i sur., 2010).

Biljni antioksidativni sustav, koji uklanja ROS-ove, dijeli se na tri veće skupine (Alexieva i sur., 2003) :

1. Antioksidanse topljive u lipidnoj fazi i vezane na membrane, poput α -tokoferola i β -karotena, koji djeluju direktno gaseći slobodne radikale nastale lipidnom peroksidacijom
2. Antioksidanse topljive u vodenoj fazi, poput glutaciona i askorbinske kiseline, koji sudjeluju u uklanjanju H_2O_2 i $O_2^{\cdot-}$
3. Antioksidativne enzime: superoksid-dizmutaze (SOD), katalaze (CAT) i peroksidaze (PX) te enzime askorbat-glutation ciklusa.

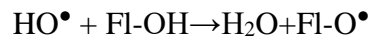
Uz navedene skupine potrebno je spomenuti i flavonoide u svojstvu hvatača slobodnih radikala. Aktiviranjem pojedinih ili svih spomenutih sustava, biljke su različito sposobne prevladati oksidacijski stres.

1.4.3.1. Glutation (GSH)

Unutar skupine neenzimskih antioksidansa ističe se glutacion (GSH), tripeptid sastavljen od glutamata, cisteina i glicina. U gotovo svim staničnim odjeljcima u milimolarnim koncentracijama nalazi se u reduciranoj formi uz slobodnu tiolnu skupinu ili rjeđe u oksidiranom obliku (GSSG), ako se dvije molekule GSH spoje disulfidnom vezom (Gill i sur., 2013). Ciklička konverzija između ta dva oblika presudna je za obrambene stanične procese (Foyer i sur., 2002). Kemijski reaktivna i u vodi topljiva tiolna skupina (-SH) čini GSH esencijalnom molekulom za regulaciju stanične diferencijacije i smrti, usklađivanje enzimskih reakcija i rezistenciju na napad patogena te obranu od ROS-om izazvanih oksidacijskih oštećenja (Gill i sur., 2013; Rausch i Wachter, 2005). Zato Tausz i sur. (2004) naglašavaju da je sustav glutaciona važan stres-marker ekofizioloških istraživanja. Glutation je neophodan za očuvanje normalnog reduciranog stanja stanica i u svom reduciranom obliku prelazi u oksidirani u reakciji s različitim ROS-ovima i tako neutralizira inhibicijske učinke oksidacijskog stresa (Anjum i sur., 2012).

1.4.3.2. Flavonoidi - antocijanini

Flavonoidi (FI) su heterogena skupina polifenolnih spojeva pretežno lociranih u vakuoli i apoplastu sjemenki, lišća, cvijeća i kore voća. Kao sekundarni metaboliti u biljkama imaju antioksidacijsku, antimikrobnu i fotoreceptorsku ulogu, a utječu i na privlačenje pozornosti oprašivača, odbijanje od prehrane i kao obrana od UV zračenja. Idealna struktura omogućuje im kelatno vezanje iona prijelaznih metala, aktiviranje antioksidacijskih enzima i inhibiranje oksidaza te najvažniji antioksidativni mehanizam prekidanja lančane reakcije slobodnog radikala njihovim hvatanjem, to jest sparivanjem. To čine doniranjem vodikova atoma slobodnom radikalu uz stvaranje manje reaktivnog flavonoidnog fenoksidnog radikala:



Antocijanini su najvažnija skupina flavonoida i pigmenti koji u strukturi, uz aglikonski antocijanidinski dio, sadrže šećernu i često acilnu skupinu. Antioksidativno djelovanje ovisi im o ukupnoj koncentraciji, strukturi i okolišu: što su više zastupljeni u biljci, to će se ona uspješnije boriti protiv autooksidacije masnih kiselina (Kazazić, 2004).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Impatiens glandulifera Royle visoka je jednogodišnja biljka poznata po tankim ekstrafloralnim nektarijima koji prekrivaju čvorove izdanaka, peteljke lišća i bazalne zube lišća. Predstavljena je kao ukras u Europi u 19. stoljeću, a od tada se nastanila duž plovnih putova i u šumama. Na određenim se područjima smatra izuzetno invazivnom zbog utjecaja na autohtone organizme na način da može promijeniti karakteristike tla i mikroklima i natjecati se za oprašivače svojim snažno mirisnim i nektarom bogatim cvjetovima (Block i sur., 2019).

Nedavni dokazi ukazuju kako ova alohtona vrsta svoju agresivnost i postojanost duguje oslobađanju inhibitornih molekula – naftokinona koji u većini slučajeva djeluju kao fitoaleksini. Kao važni sekundarni biljni metaboliti, naftokinoni pokazuju širok spektar bioloških aktivnosti, a jedna od njihovih uloga u natjecanju među biljkama je poznati proces koji se naziva alelopatija (Campos i sur., 2019). Brojne studije ukazuju da biljke na koje djeluju alelokemikalije stvaraju velike količine ROS-ova koji induciraju stanje oksidativnog stresa.

Istraživanje učinaka alelopatijskih biljnih kemikalija na rast i razvoj autohtone vegetacije ključno je za razumijevanje njihove ekološke uloge i važnosti u invaziji egzotičnih biljaka (Ruckli i sur., 2014). Stoga će se u ovom diplomskom radu ispitati alelopatijsko djelovanje naftokinona prisutnih u ekstraktu lista žljezdastog nedirka na usjevnu biljku rotkvicu (*Raphanus sativus* L., Brassicaceae) s pretpostavkom da će naftokinoni u modelnom organizmu uzrokovati hiperprodukciju ROS-ova koja će dovesti do promjene u razini antioksidansa te oksidacijskog oštećenja lipida i proteina.

Istraživanje će se provesti tako što će se sjemenke rotkvice izložiti metanolnom ekstraktu lista žljezdastog nedirka u tri različite doze te će se ostaviti na klijanju tri dana. U istraživanje će se uključiti i sjemenke rotkvice koje će biti izložene deioniziranoj vodi (negativna kontrola) i otopini CuSO₄ (pozitivna kontrola). Po završetku klijanja, odvagat će se masa svježeg biljnog tkiva modelnog organizma, pripremiti homogenat biljnoga tkiva te će se u homogenatu biljnoga tkiva izmjeriti parametri antioksidacijskog odgovora (sadržaj GSH i antocijanina) i parametri oksidacijskog oštećenja lipida i proteina (sadržaj MDA i oksidiranih proteina).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Kemikalije korištene za pripremu otopina za tretman sjemenki rotkvice:

- metanol (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- bakrov (II) sulfat, CuSO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvatska),
- deionizirana voda.

Za pripremu homogenata biljnog tkiva rotkvice korištena je:

- trikloroetena kiselina, TCA (Kemika, Zagreb, Hrvatska).

Za određivanje sadržaja GSH u homogenatu biljnog tkiva rotkvice bile su potrebne:

- 5,5'-ditiol-(2-nitrobenzojeva kiselina), DTNB (Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD),
- kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4 (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- dikalijev hidrogenfosfat, K_2HPO_4 (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA (Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD).

Za određivanje sadržaja antocijanina u homogenatu biljnog tkiva rotkvice korišteni su:

- kalij-kloridni pufer pH 1 (Kemika, Zagreb, Hrvatska),
- natrij-acetatni pufer pH 4,5 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD).

Kod određivanja sadržaja MDA u homogenatu biljnog tkiva rotkvice upotrijebljena je:

- 2-tiobarbituratna kiselina, TBA (Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD).

Za određivanje oksidiranih proteina u homogenatu biljnoga tkiva rotkvice korišteni su:

- klorovodična kiselina, HCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska),
- 2,4-dinitrofenilhidrazin, DNPH (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD),
- etanol 96% (Kuna, Oroslavje, Hrvatska),
- etilacetat (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD),
- urea (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD).

Sve upotrijebljene kemikalije bile su *pro analysi* čistoće.

3.1.2. Oprema

Prilikom istraživanja korištena je sljedeća oprema:

- mikropipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka),
- miješalica, Vortex-Heidolph model REAX top (Heidolph Instruments, Schwabach, Njemačka),
- centrifuga, Frontier 5706 (Ohaus, Greifensee, Švicarska),
- precizna analitička vaga, PB303 Delta Range (Mettler Toledo, Columbus, SAD),
- termostat, TMA (Termo-medicinski aparati, Dugo selo, Hrvatska),
- pH metar, HI 9025 (Hanna instruments, Woonsocket, SAD),
- kiveta, Open-top UV-quartz cell (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD),
- UV-VIS spektrofotometar T70 (PG Instruments Ltd, Lutterworth, UK),
- mikrotitarska pločica ravnog dna s 96 jažica nominalnog volumena 300 μ L (Kartell S.p.A., Noviglio, Italija),
- čitač mikrotitarskih pločica iEMS Reader MF (Labsystems, Vantaa, Finska).

Navedeni uređaji nalaze se na Zavodu za Farmaceutsku botaniku i Zavodu za mikrobiologiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

3.1.3. Biljni model

Za potrebe ovog eksperimentalnog rada, kao modelna biljna vrsta na kojoj se istraživala alelopatija, korištena je rotkvica, *Raphanus sativus* L. (slika 7), jednogodišnja biljna vrsta iz porodice krstašica (Brassicaceae). Porijeklom je iz Europe i Azije, a odlikuje se povećanim korijenom i hipokotilom koji su bogati sekundarnim metabolitima, poput glukozinolata, polifenola i izotiocijanata i konzumiraju se diljem svijeta zbog nutritivne i ljekovite vrijednosti (Manivannan i sur., 2019). Ističe se brzim dozrijevanjem i otpornošću na hladnoću. Zbog vrlo brzog klijanja odabrana je kao biljni model.

Sjemenke rotkvice koje su upotrijebljene u ovom ispitivanju komercijalno su nabavljene u sjemenari „Agromlinar“ Zagreb.



Slika 7. Klijanac rotkvice (*R. sativus*) (slikala: L. Jagodar)

3.2. Metode

3.2.1. Biološki pokus – germinacija

- **Priprema otopina**

- Priprema metanolnog ekstrakta žljezdastog nedirka

Prvi korak za provođenje ispitivanja bio je priređivanje ekstrakta žljezdastog nedirka za tretman sjemenki rotkvice. Metanolni ekstrakt lista žljezdastog nedirka priredio se ekstrakcijom iz 3,5 grama suhe tvari u 100 ml metanola.

- Priprema 0,02 M otopine CuSO_4

U istraživanje je uključena i pozitivna kontrola kojom su tretirane sjemenke rotkvice. Za tu je potrebu korištena 0,02 M otopina CuSO_4 koja je pripremljena vaganjem 0,32 g CuSO_4 koji je nakon toga kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 100 ml. Nakon toga je odmjerna tikvica nadopunjena do oznake destiliranom vodom i promućkana.

- **Provođenje biološkog pokusa**

Filtar papir postavljen je u Petrijeve zdjelice te impregniran trima različitim dozama pripremljenog ekstrakta žljezdastog nedirka (1,5 ml; 3,0 ml i 6,0 ml). Potom je filtir papir ostavljen na sušenju kako bi metanol ispario. Također, filtir papir impregniran je i s 1 ml 0,02 M otopine CuSO_4 koja je služila kao pozitivna kontrola te je i ona ostavljena na sušenju. Na

tako impregniran filter papir su potom postavljene sjemenke rotkvice. Svaka Petrijeva zdjelica sadržavala je po 25 sjemenki modelne biljke rotkvice ravnomjerno postavljenih za klijanje. U sve je Petrijeve zdjelice dodano po 2 ml deionizirane vode te su zatvorene s parafilmom. Tako pripremljene Petrijeve zdjelice ostavljene su tri dana na tamnom mjestu na sobnoj temperaturi na klijanju. U pokus je uključena negativna kontrola kod koje su sjemenke modelne biljke bile izložene 2 ml deionizirane vode (slika 8). Svi tretmani su provedeni u triplikatu.



Slika 8. Sjemenke rotkvice (*R. sativus*) na početku klijanja (slikala: A. Fajdetić)

Nakon tri dana klijanja, klijanci su pažljivo preneseni s filter papira te je odvagana masa svježeg tkiva. Potom su klijanci premješteni u označene vrećice i pohranjeni na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do biokemijskih analiza.

- **Priprema homogenata biljnog tkiva za mjerenje biokemijskih parametara**

Na analitičkoj vagi odvagano je 10 g TCA koja je zatim kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 200 ml. Tikvica je nadopunjena destiliranom vodom do oznake i tako je dobiveno 200 ml 5 %-tne otopine TCA.

Homogenat klijanaca rotkvice pripremljen je vaganjem 100 mg biljnog tkiva te je, korištenjem tučka, mehanički biljno tkivo homogenizirano u tarioniku uz dodatak 0,5 ml 5 %-tne otopine TCA. Pripremljeni homogenat biljnog tkiva rotkvice potom je centrifugiran kako bi se dobio bistar supernatant u kojem je određen sadržaj biokemijskih parametara oksidacijskog stresa (GSH, antocijanina, MDA i oksidiranih proteina).

3.2.2. Metoda određivanja GSH

- **Princip metode**

Spektrofotometrijska metoda određivanja sadržaja GSH temelji se na kolorimetrijskoj reakciji GSH s 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojevom kiselinom (DTNB-om), poznatim i kao Ellmanov reagens. Prema Ellmanovoj metodi (1959), u reakciji s tiolnom skupinom GSH i drugih neproteinskih tiola DTNB prelazi u 2-nitro-5-merkaptobenzojevu kiselinu (TNB). TNB u blago alkalnim uvjetima prelazi u žuto obojeni ionizirani oblik TNB^{2-} koji svoj apsorpcijski maksimum ima pri 412 nm. Žuto obojenje uzorka mjeri se spektrofotometrijski na 412 nm prema slijepoj probi, a intenzitet obojenja odgovara sadržaju GSH u uzorku. Sadržaj GSH može se kvantificirati pomoću poznatog apsorpcijskog koeficijenta (Ellman, 1959).

- **Priprema otopina za određivanje GSH**

Priprema 1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7,4

Kako bi se priredio 1 M kalij-fosfatni pufer, potrebni su KH_2PO_4 i K_2HPO_4 . Najprije se izračuna njihova molarna masa (M) koristeći periodni sustav elemenata, a primjenom jednadžbe za množinu tvari ($n = m / M$ gdje je n = množina tvari, m = masa tvari, M = molarna masa) dobije se masa tvari potrebna za pripremu 1 M otopine. Tako se za pripremu 1 M otopine KH_2PO_4 , prema dobivenim vrijednostima, na analitičkoj vagi izvagalo, a zatim kvantitativno prenijelo u odmjernu tikvicu od 100 ml 13,609 g KH_2PO_4 , potom je tikвица nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Isti postupak ponovio se za pripremu 1 M otopine K_2HPO_4 , samo što je izvagano 17,418 g K_2HPO_4 jer je ta vrijednost izračunata prema jednadžbi za množinu tvari.

Za pripremu 1 M otopine kalij-fosfatnog pufera pH 7,4 morale su se pomiješati 1 M otopine KH_2PO_4 i K_2HPO_4 koristeći pH metar da bi se dobio potrební pH 7,4. 1 M kalij-fosfatni pufer služi kao otapalo i medij za izvođenje eksperimenta. U otopinu pufera moralo se dodati i 0,0037 g etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) kako bi se postigao molaritet EDTA u otopini od 0,1 mM. EDTA služi za keliranje metala što rezultira sprječavanjem autooksidacije GSH u uzorku. Potrebna odvaga EDTA dobivena je korištenjem iste formule za množinu tvari, a dodana je u 100 ml otopine 1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7,4.

Priprema 1 mM otopine DTNB-a

Za priređivanje 1 mM otopine DTNB-a, prema izračunu trebalo bi se izvagati 0,00396 g DTNB-a. Kako bi se povećala preciznost odvage, priređena je 10 mM otopina vaganjem 0,0396 g DTNB-a. Izvagana masa kvantitativno je prenesena u odmjernu tikvicu od 10 ml, a do oznake je tikvica nadopunjena 1 M otopinom kalij-fosfatnog pufera pH 7,4. Pripremljena otopina se razrijedila 10 puta kako bi se pripremila 1 mM otopina DTNB-a. Dobivena otopina koristila se kao reagens za dokazivanje GSH.

- **Postupak**

Postupak određivanja GSH dan je shematskim prikazom u tablici 1.

Tablica 1. Shematski prikaz postupka za određivanje GSH

SLIJEPA PROBA	UZORAK
	Homogenati biljnog tkiva rotkvice
	⇒ centrifugiranje 10 minuta na 7000 RPM
100 µl 5 % TCA + 900 µl DTNB	100 µl supernatanta homogenata + 900 µl DTNB
⇒ inkubacija 15 minuta na sobnoj temperaturi	
⇒ mjerenje apsorbancije na 412 nm	

Sadržaj GSH izračunat je pomoću jednadžbe za Beer-Lambertov zakon:

$$A = \varepsilon \times l \times c$$

$$\text{Sadržaj GSH} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times l} [\mu\text{M}]$$

pri čemu je:

ΔA – razlika izmjerene apsorbancije uzorka i slijepe probe na valnoj duljini od 412 nm

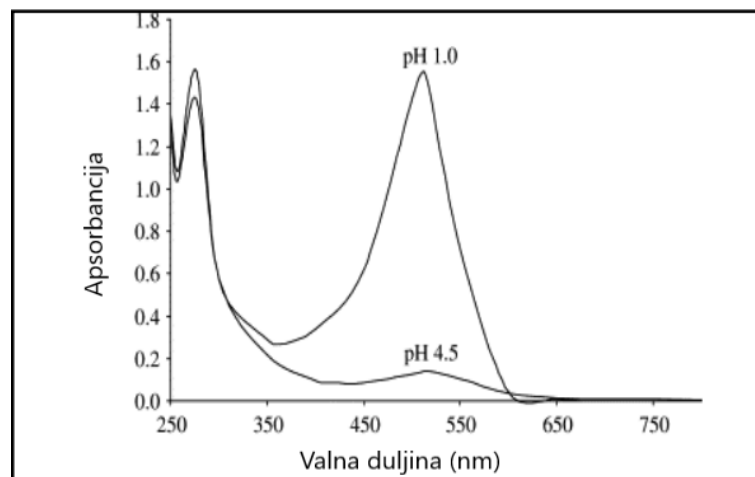
ε – apsorpcijski koeficijent ($14,15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l – dužina optičkog puta (1 cm).

3.2.3. Metoda određivanja antocijanina

- **Princip metode**

Za određivanje sadržaja antocijanina korištena je metoda prema Giusti i Wrolstadu (2001) koja se temelji na pretpostavci da antocijaninski kromofor mijenja strukturu u ovisnosti o pH, a ta se promjena može mjeriti UV-VIS spektrofotometrom. Pigmenti antocijanina pri pH 1,0 postoje u obliku kationa i crvene su boje, dok pri pH 4,6 dolazi do reverzibilne promjene strukture te antocijanini prelaze u bezbojne hidratizirane oblike (Giusti i Wrolstad 2001). Dakle, pH–diferencijalna metoda pretpostavlja kako monomerni ili „čisti“ antocijani imaju malo ili nimalo apsorpcije u puferu pH 4,5, dok polimerni ili razgrađeni antocijani apsorbiraju pri navedenom pH (slika 9). Iako su gotovo svi monomerni antocijani u hemiketalnom obliku pri pH 4,5, mali je udio u kinoidnom ili flavilij obliku koji daju mali doprinos apsorpciji. I uz prisustvo polimeriziranih, degradiranih pigmenta, metoda je brza, jednostavna i pouzdane točnosti za mjerenje sadržaja ukupnih antocijaninskih pigmenta.



Slika 9. UV-VIS spektar antocijanina u puferu pH 1,0 i pH 4,5 (preuzeto iz: Vankar i Srivastava, 2010 i prilagođeno)

- **Postupak**

Svaki uzorak pripremljen je u dvije serije uzoraka u duplikatu. Jedna serija uzoraka miješala se s puferom otopinom pH 1,0, a druga pufer otopinom pH 4,5. Pufer otopine su komercijalno nabavljene te ih nije bilo potrebno pripremati. Cijeli postupak određivanja antocijanina prikazan je shematski u tablici 2. U pokusu su korištene mikrotitarske pločice zbog manjeg utroška volumena supernatanta u odnosu na mjerenje apsorbanca u kiveti UV-VIS

spektrofotometrom. Apsorbancija uzorka izmjerena je na čitaču mikrotitarskih pločica (engl., *Plate reader*). Kako uređaj ne može mjeriti apsorbanciju na potrebnim valnim duljinama od 512 nm (apsorpcijski maksimum) i 700 nm (korekcija zamućenja), izmjerene su apsorbancije na valnim duljinama od 492 nm, 540 nm i 690 nm, a apsorpcijski maksimum na valnoj duljini od 516 nm (odabran zbog blizine potrebnoj apsorbanciji na valnoj duljini od 512 nm) određen je prema formuli:

$$A_{516\text{ nm}} = (A_{492\text{ nm}} + A_{540\text{ nm}})/2$$

Tablica 2. Shematski prikaz postupka za određivanje antocijanina

SERIJA UZORAKA 1	SERIJA UZORAKA 2
Homogenati biljnog tkiva rotkvice	
⇒ centrifugiranje 10 minuta na 7000 RPM	
40 µl supernatanta homogenata + 160 µl pufera pH 1,0	40 µl supernatanta homogenata + 160 µl pufera pH 4,5
⇒ inkubacija 15 minuta na sobnoj temperaturi	
⇒ mjerenje apsorbancije na 492 nm, 540 nm i 690 nm	

Sadržaj antocijanina određen je prema formuli:

$$\text{Sadržaj antocijanina} = \frac{A \times Mr \times FR \times 1000}{\epsilon \times l} \quad [\text{mg/l}]$$

pri čemu je:

A – apsorbancija uzorka koja se računa prema izrazu:

$$A = (A_{516} - A_{690})_{\text{pH } 1,0} - (A_{516} - A_{690})_{\text{pH } 4,5}$$

Mr – molekulska masa = 449,2

FR – faktor razrjeđenja

1000 – faktor za preračunavanje g u mg

ϵ – apsorpcijski koeficijent (26,9 mM⁻¹ cm⁻¹)

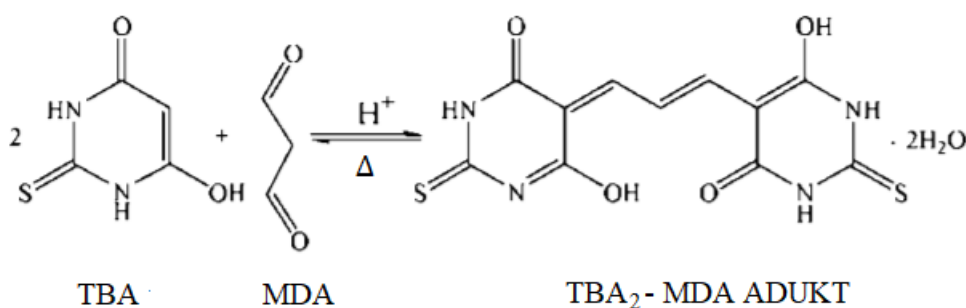
l – dužina optičkog puta (1 cm).

Podatci za vrijednost molekulske mase (Mr = 449,2) i ekstinkcijski koeficijent (26,9 mM⁻¹ cm⁻¹) korišteni u izračunu uzeti su od standarda cijanidin-3-glukozida, najzastupljenije vrste antocijanina.

3.2.4. Metoda određivanja MDA

- **Princip metode**

MDA je krajnji produkt lipidne peroksidacije koji se određuje tiobarbituratnim testom (TBA test) kojeg su razvili Heath i Packer (1968). Temelji se na reakciji nukleofilne adicije MDA s tiobarbiturnom kiselinom u jako kiselim uvjetima i povišenoj temperaturi, pri čemu nastaje crveno obojen TBA₂-MDA adukt koji se može izmjeriti UV-VIS spektrofotometrom mjereći apsorbanciju na valnoj duljini od 532 nm (Heath i Packer 1968) (slika 10).



Slika 10. Reakcija MDA i TBA uz stvaranje MDA-TBA₂ adukta (preuzeto iz: Zhang i sur., 2010 i prilagođeno)

- **Priprema otopina za određivanje MDA**

Priprema 0,6 % otopine TBA

Na analitičkoj vagi izvaže se 0,6 g TBA koja se potom kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 ml, a tikvica se nadopuni destiliranom vodom do oznake. Otapanje je potaknuto umjerenim zagrijavanjem na grijaču. Tako pripremljena otopina služi kao reagens u TBA testu.

- **Postupak**

U tablici 3 shematski je prikazan postupak određivanja MDA.

Tablica 3. Shematski prikaz postupka za određivanje MDA

SLIJEPA PROBA	UZORAK
	Homogenati biljnog tkiva rotkvice
	⇒ centrifugiranje 10 minuta na 7000 RPM
200 µl destilirane vode + 800 µl 0,6% TBA	200 µl supernatanta homogenata + 800 µl 0,6% TBA
⇒ zagrijavanje 30 minuta na 90 °C	
⇒ naglo hlađenje na ledu (zaustavljanje reakcije)	
⇒ centrifugiranje 10 minuta na 7000 RPM	
⇒ mjerenje apsorbancije na 532 nm	

Sadržaj MDA izračuna se pomoću jednadžbe za Beer-Lambertov zakon uz poznatu vrijednost apsorpcijskog koeficijenta prema formuli:

$$\text{Sadržaj MDA} = \frac{\Delta A}{\epsilon \times l} [\mu\text{M}]$$

pri čemu je:

ΔA – razlika izmjerene apsorbancije uzorka i slijepe probe na valnoj duljini od 532 nm

ϵ – apsorpcijski koeficijent ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

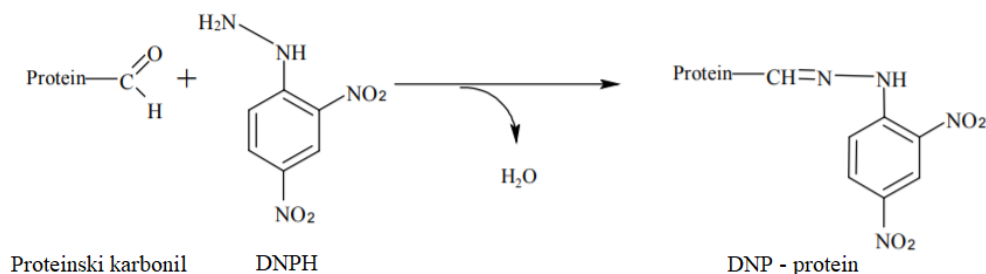
l – dužina optičkog puta (1 cm).

3.2.5. Metoda određivanja oksidiranih proteina

- **Princip metode**

Daleko najšire primijenjen biomarker i indikator oksidacije proteina su proteinski karbonili - produkti oksidacije proteina uslijed oksidacijskog stresa. Mjerenje njihovog sadržaja ima prednost nad određivanjem ostalih oksidacijskih produkata zbog njihove stabilnosti i vrlo ranog formiranja te mogućnosti određivanja UV-VIS spektrofotometrom. Levine i sur. (1990) razvili su metodu koja se temelji na reakciji proteinskih karbonila s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) u kojoj dolazi do supstitucije karbonilne skupine proteina s DNPH uz stvaranje

stabilnog 2,4-dinitrofenilhidrazonskog produkta (DNP; slika 11). DNP skupina apsorbira UV zračenje pa se ukupni sadržaj karbonila može kvantificirati spektrofotometrijski na 370 nm (Purdel i sur., 2014).



Slika 11. Derivatizacija karbonilne skupine proteina s DNPH (preuzeto iz: Purdel i sur., 2014 i prilagođeno)

- **Priprema otopina za određivanje oksidiranih proteina**

Priprema 10 % TCA

Za dobivanje 10 %-tne otopine TCA potrebno je izvagati, kvantitativno prenijeti i otopiti 10 g TCA u destiliranoj vodi u odmjernoj tikvici od 100 ml te nadopuniti tikvicu destiliranom vodom do oznake. Dobivena otopina služila je za taloženje proteina u uzorcima i slijepoj probi.

Priprema 2 N HCl

100 ml 2 N otopine klorovodične kiseline napravljeno je miješanjem 17 ml 36,5 % klorovodične kiseline u odmjernoj tikvici od 100 ml nadopunjenoj destiliranom vodom do oznake. Tako dobivena otopina služila je za pripremu reagensa 0,2 % 2,4-DNPH u 2 N HCl.

Priprema 0,2 % 2,4-DNPH u 2 N HCl

Za pripremu ovog reagensa prvo je odvagano, zatim kvantitativno preneseno 0,2 g 2,4-DNPH u odmjernu tikvicu od 100 ml, koja se nakon toga nadopunila do oznake prethodno pripremljenim 2 N HCl.

Priprema etanol : etil-acetat (1:1) otopine

Kako je omjer navedenih otapala 1:1, u menzuri se izmjerio jednak volumen etanola i etil-acetata, odnosno, uzeto je 50 ml etanola i 50 ml etil-acetata, a otopine su izmiješane staklenim štapićem u čaši od 200 ml. Tako napravljena otopina služila je za ispiranje viška reagensa (DNPH) u uzorcima.

Priprema 6 M uree u 20 mM kalij-fosfatnom puferu pH 2,4

Za pripremu ove otopine prvo se morao prirediti kalij-fosfatni pufer. On se dobio vaganjem 0,1361 g KH_2PO_4 i otapanjem odvage u 40 ml destilirane vode. U tako priređenoj otopini pufera, u odmjernoj tikvici od 50 ml, lijevkom se dodalo i otopilo 18,02 g ranije izvagane uree, a tikvica je nadopunjena do oznake. Otopina je upotrijebljena za otapanje taloga u uzorcima i slijepoj probi.

• Postupak

Budući da je svaki uzorak izrađen u triplicatu, za svaki uzorak priređene su tri epruvete, jedna za slijepu probu te dvije za duplikat uzorka u kojima se odvija reakcija proteinskih karbonila s DNPH. U ovom pokusu korišten je talog homogenata biljnoga tkiva koji je dobiven nakon centrifugiranja prilikom određivanja GSH i MDA. Taj je talog prije samog početka izvođenja pokusa bilo potrebno razrijediti (a kako bi se mogao uzeti točan volumen uzorka u postupak) te je dodan 17x veći volumen 5 %-tne TCA.

Cijeli postupak za određivanje oksidiranih proteina shematski je prikazan u tablici 4.

Tablica 4. Shematski prikaz određivanja oksidiranih proteina

SLIJEPA PROBA	UZORAK
500 μl razrijeđenog taloga homogenata + 500 μl 10 % TCA	
⇒ miješanje na vorteksu ⇒ centrifugiranje 15 minuta na 21000 RCF ⇒ dekantiranje	
talog + 300 μl 2N HCl	talog + 300 μl 0,2 % 2,4-DNPH u 2 N HCl
⇒ miješanje na vorteksu ⇒ reakcijska smjesa stoji 1 sat na sobnoj temperaturi, u mraku ⇒ miješanje na vorteksu	
reakcijska smjesa + 200 μl 10 % TCA	
⇒ miješanje na vorteksu ⇒ centrifugiranje 15 minuta na 21000 RCF ⇒ dekantiranje	
	talog + 500 μl etanol:etil-acetat (1:1)

	⇒ miješanje na vorteksu ⇒ centrifugiranje 10 minuta na 21000 RCF ⇒ dekantiranje ➤ pranje taloga 2x
talog + 2 ml 6 M uree u 20 mM K-fosfatnom puferu pH 2,4	
	⇒ miješanje na vorteksu ⇒ otapanje taloga preko noći ⇒ miješanje na vorteksu ⇒ centrifugiranje 10 min na 21000 RCF ⇒ mjerenje apsorbancije na 370 nm

Koncentracija proteinskih karbonila izračunata je prema Beer–Lambertovom zakonu prema formuli:

$$\text{Sadržaj oksidiranih proteina} = \frac{\Delta A}{\epsilon \times l} \text{ } [\mu\text{M}]$$

pri čemu je:

A – apsorbancija na 370 nm

ϵ – apsorpcijski koeficijent (22 mM⁻¹ cm⁻¹)

l – dužina optičkog puta (1 cm).

3.3. Statistička obrada rezultata

Modelni organizam (*R. sativus*) tretiran je u triplikatu, a biokemijski parametri: GSH, antocijanini, MDA, oksidirani proteini izmjereni su za svaki od triplikata u duplikatu. Rezultati mase svježeg tkiva prikazani su kao srednje vrijednosti triplikata ± standardna devijacija za svaki od tretmana, a biokemijski parametri prikazani su kao srednje vrijednosti 6 replika ± standardna devijacija. Korištenjem *t-testa* pomoću računalnog programa *Excel* uspoređeni su dobiveni rezultati između tretmana s deioniziranom vodom (negativna kontrola) i drugih tretmana za masu svježeg tkiva i pojedinih ranije navedenih biokemijskih parametara. Kao statistički značajna razlika postavljena je vrijednost $P \leq 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

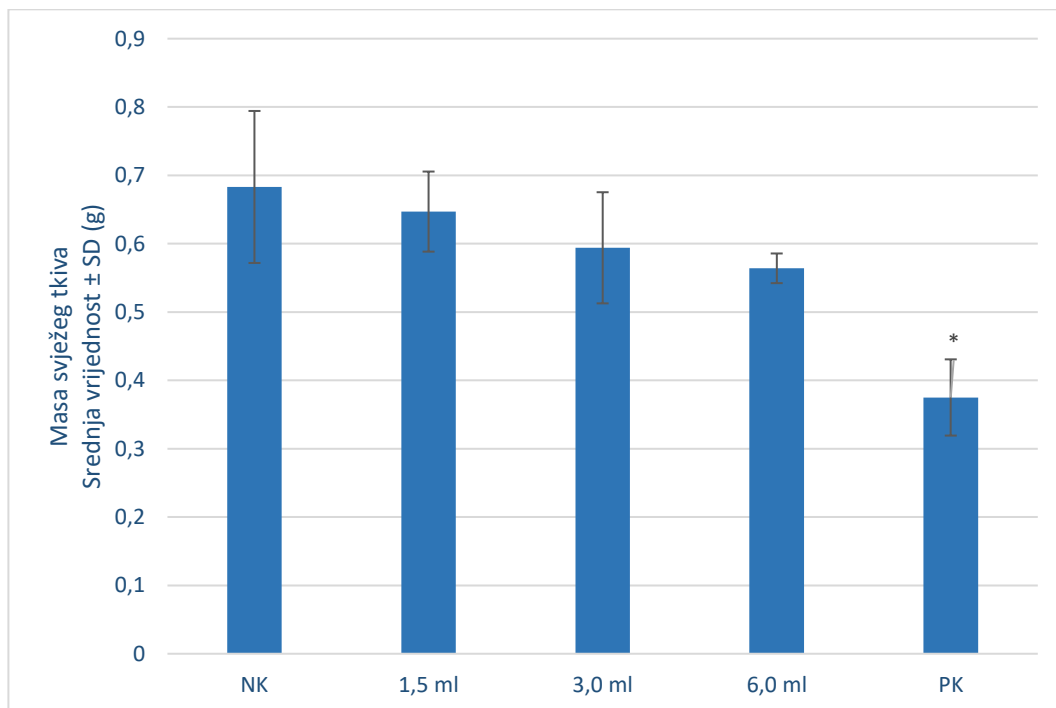
U ovom diplomskom radu istraženo je alelopatsko djelovanje invazivne biljne vrste žljezdastog nedirka, *I. glandulifera* na klijance rotkvice, *R. sativus*. Sjemenke rotkvice, kao modelne biljne vrste, bile su izložene tri dana trima različitim dozama (1,5 ml; 3,0 ml i 6,0 ml) metanolnog ekstrakta lista žljezdastog nedirka tako što je filter papir, na kojem su sjemenke postavljene za klijanje, impregniran navedenim dozama ekstrakta. U ispitivanje je uključena negativna kontrola (sjemenke izložene deioniziranoj vodi kao primjer klijanja u normalnim fiziološkim uvjetima) te pozitivna kontrola (sjemenke izložene 0,02 M otopini CuSO₄). Kao pozitivna kontrola odabrana je otopina bakra jer je poznato da bakar u visokim koncentracijama uzrokuje oksidacijski stres i djeluje toksično na klijanje (Lombardi i Sebastiani, 2005). Nakon trodnevnog klijanja izvagana je masa svježeg tkiva klijanaca, a sadržaj biokemijskih parametara mjerio se u homogenatu biljnog tkiva. Metodom prema Ellmanu (1959) određen je sadržaj GSH, antocijanini su pH-diferencijalnom metodom mjereni prema Giusti i Wrolstadu (2001), TBA testom prema Heathu i Packeru (1968) određen je MDA, a derivatizacijom karbonilne skupine proteina s DNPH prema Levine i sur. (1990) određen je sadržaj oksidiranih proteina. Sva mjerenja provedena su u duplikatu, a sam pokus klijanja proveden je u triplicatu te su dobiveni rezultati statistički obrađeni.

4.1. Masa svježeg tkiva

Nakon trodnevnog klijanja u prethodno opisanim uvjetima, klijancima rotkvice izvagana je masa. Masa svježeg tkiva u izravnom je odnosu s rastom biljke i stoga predstavlja važan parametar u istraživanju alelopatije. Slika 12 prikazuje odvagane mase svježeg tkiva.

Iz rezultata se može iščitati pad mase svježeg tkiva klijanaca izloženih metanolnom ekstraktu žljezdastog nedirka u usporedbi s negativnom kontrolom ($0,683 \pm 0,111$ g) koja predstavlja germinaciju u normalnim fiziološkim okolišnim uvjetima. Povećanjem doze ekstrakta alelopatske biljke razmjerno se snižava masa svježeg tkiva klijanaca. Masa svježeg tkiva modelne biljke nakon trodnevne izloženosti 1,5 ml ekstrakta iznosila je $0,645 \pm 0,059$ g, što je niže od negativne kontrolne skupine, ali nije značajno. Daljnje snižavanje mase svježeg tkiva modelne biljke zabilježeno je nakon izloženosti 3,0 ml ekstrakta ($0,593 \pm 0,081$ g). Još veći pad mase svježeg tkiva zabilježen je pri tretmanu s 6,0 ml ekstrakta žljezdastog nedirka $0,564 \pm 0,022$ g, no ni ta masa svježeg tkiva nije se statistički značajnije razlikovala od mase svježeg tkiva negativne kontrole. Najnižu masu svježeg tkiva imala je pozitivna kontrola,

tretman klijanaca 0,02 M otopinom CuSO₄ (0,375 ± 0,056 g) sa statistički značajnom razlikom (P = 0,006).



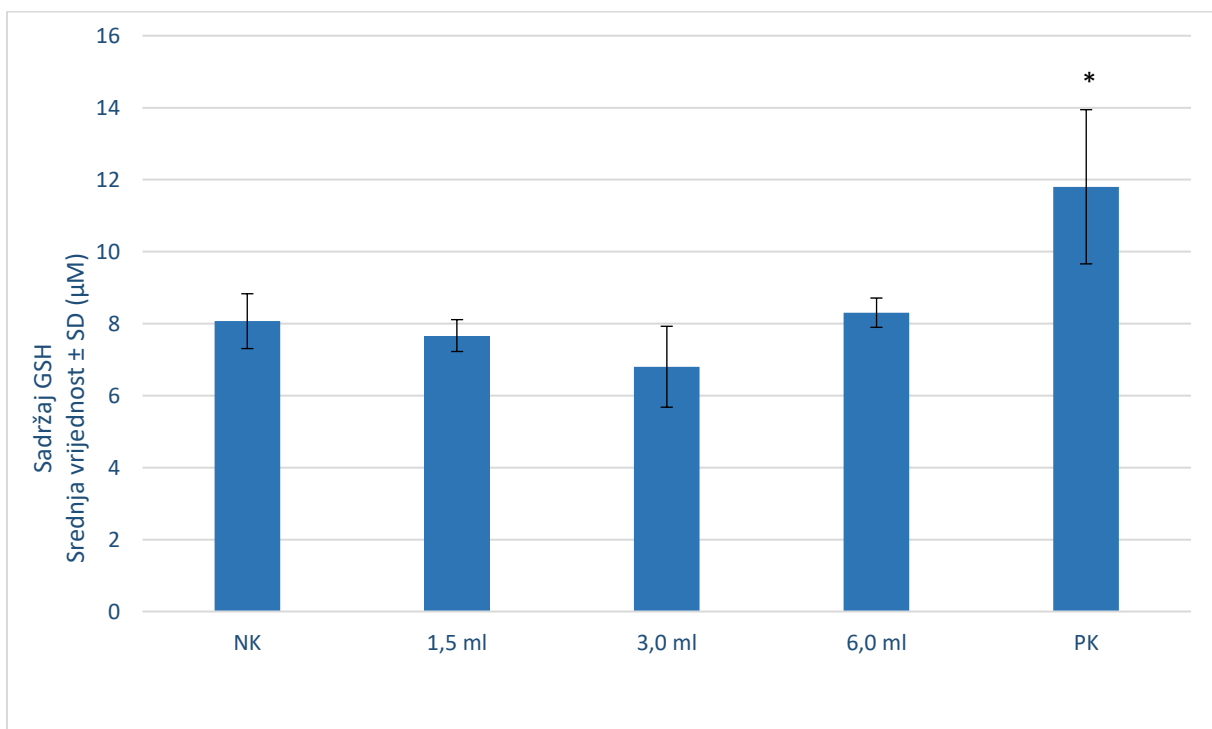
Slika 12. Masa svježeg tkiva klijanaca rotkvice nakon trodnevne izloženosti različitim dozama metanolnog ekstrakta žljezdastog nedirka; NK – negativna kontrola (sjemenke izložene deioniziranoj vodi), PK – pozitivna kontrola (sjemenke izložene 0,02 M CuSO₄)

4.2. GSH

Glutation, GSH, endogena je tripeptidna komponenta staničnog metabolizma i najvažniji antioksidans male molekularne mase sintetiziran u stanicama. GSH sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa, a tiolna skupina (-SH) cisteina u njegovoj strukturi u reakcijama redukcije i konjugacije koje se obično smatraju njegovim najvažnijim ulogama. Te reakcije sudjeluju u uklanjanju peroksida i mnogih ksenobiotičkih spojeva koji bi se inače vezali za proteine ili nukleinske kiseline, što bi rezultiralo staničnim oštećenjima i genetskim mutacijama. Brojna istraživanja pokazala su da GSH ima direktnu i indirektnu zaštitnu ulogu od oksidacijskog stresa te o njegovoj koncentraciji ovisi hoće li se na adekvatan način ukloniti proizvedeni slobodni radikali u stanici. Ako je njegov sadržaj prenizak, u stanici se nalazi više slobodnih radikala koji uzrokuju oksidacijska oštećenja, a kad je njegova koncentracija iznad

optimalne razine, moguća je reakcija s ionima metala uz proizvodnju slobodnih radikala i generiranja oksidacijskog stresa (Forman i sur., 2008).

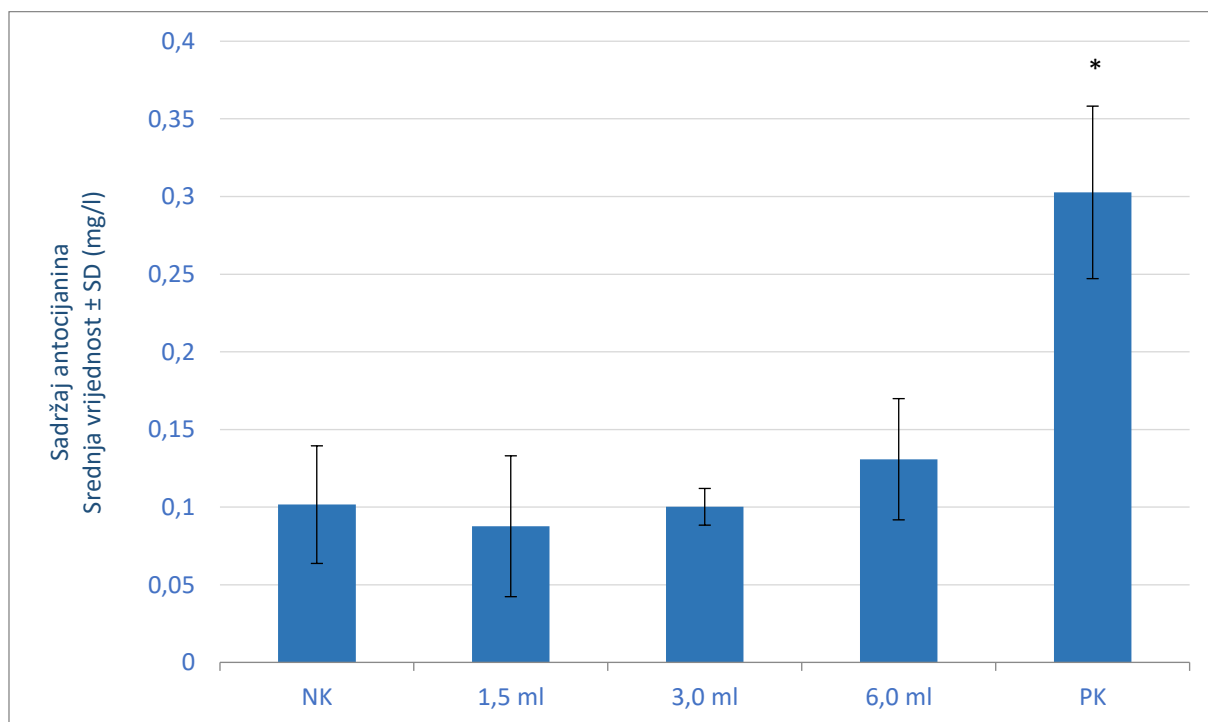
Dobiveni rezultati mjerenja sadržaja GSH u klijancima rotkvice prikazani su slikom 13. Tretman sjemenki otopinom bakra (pozitivna kontrola) prouzročio je statistički značajno povećanu proizvodnju GSH u odnosu na negativnu kontrolu ($11,802 \pm 2,143 \mu\text{M}$ vs. $8,068 \pm 0,762 \mu\text{M}$; $P = 0,023$). To ukazuje da, u uvjetima toksičnim za biljku, dolazi do povećane sinteze ovog antioksidansa s ciljem eliminacije ROS-ova. Trodnevna izloženost metanolnom ekstraktu alelopatske biljke u nižim dozama (1,5 ml i 3,0 ml) dovela je do smanjenja sadržaja antioksidansa GSH. Takvi rezultati mogu se pripisati trošenju zaliha GSH u prvoj fazi stresa. Samo je nakon izloženosti sjemenki 6,0 ml ekstrakta žljezdastog nedirka sadržaj GSH blago porastao ($8,304 \pm 0,408 \mu\text{M}$) u odnosu na negativnu kontrolu, ali ne statistički značajno, što pokazuje da je stres bio dovoljno velik da biljka krene sa sintezom dodatnog GSH kako bi se od njega obranila i sintetizirala nove zalihe ovog antioksidansa.



Slika 13. Sadržaj GSH u homogenatu klijanaca rotkvice nakon trodnevne izloženosti različitim dozama metanolnog ekstrakta žljezdastog nedirka; NK – negativna kontrola (sjemenke izložene deioniziranoj vodi), PK – pozitivna kontrola (sjemenke izložene 0,02 M CuSO_4)

4.3. Antocijanini

Antocijanini su prirodni vodotopljivi pigmenti, polifenoli koji se nalaze u biljkama kao glikozidi gdje je aglikonski antocijanidinski dio vezan za šećernu skupinu. Kemijske strukture antocijanina sadrže polihidroksi ili polimetoksi derivate 2-fenilbenzofirilija. Oni imaju pozitivan naboj u svojim strukturama pri kiselom pH i postoje prvenstveno kao stabilni kationski flavilij kada je $\text{pH} < 2$. Ova jedinstvena kemijska struktura jedan je od ključnih čimbenika koji utječe na njihovu apsorpciju, metabolizam, bioraspoloživost i biološke reakcije. Poznato je da mogu ulaziti u direktne interakcije s lipidima membrane, utječući na taj način na fiziološka svojstva membrane, interakcije između liganda i receptora, modulaciju prijenosa signala, transport kroz membranu i enzimsku aktivnost (Kazazić, 2004). Biljke s visokom koncentracijom antocijanina imaju i veći antioksidacijski kapacitet, odnosno uspješnije inhibiraju oksidaciju lipida i proteina. Ravnoteža između sinteze i degradacije određuje njihovu koncentraciju, a za određivanje njihovog ukupnog sadržaja u ovom radu korištena je brza i jednostavna pH-diferencijalna metoda prema Giusti i Wrolstadu (2001). Rezultati analize prikazani su slikom 14.



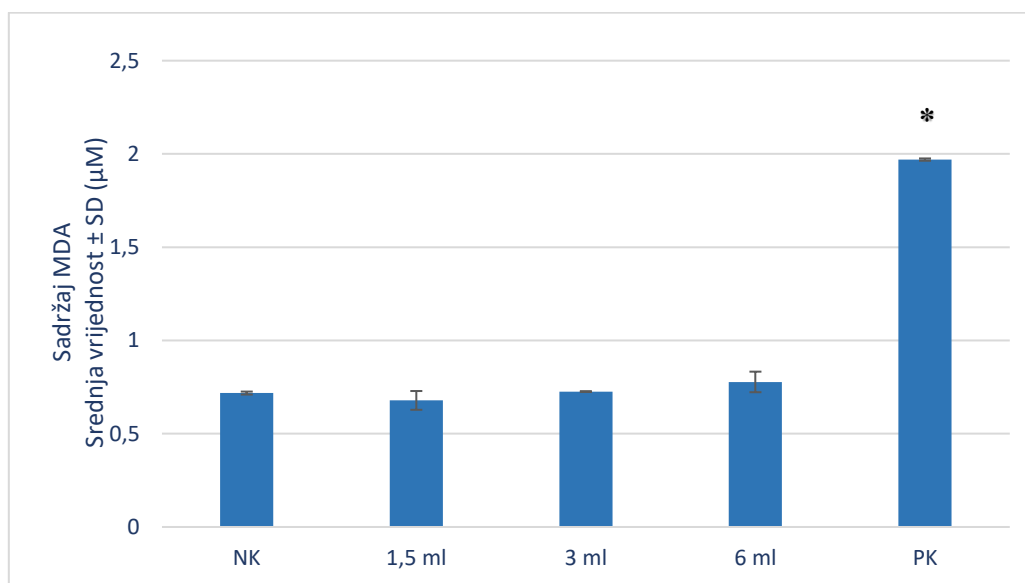
Slika 14. Sadržaj antocijanina u homogenatu klijanaca rotkvice nakon trodnevne izloženosti različitim dozama metanolnog ekstrakta žljezdastog nedirka; NK – negativna kontrola (sjemenke izložene deioniziranoj vodi), PK – pozitivna kontrola (sjemenke izložene 0,02 M CuSO_4)

Da bi rezultati bili potpuni, uz izmjereni sadržaj antocijanina, trebali bi se odrediti i degradirani antocijanidinski produkti i antioksidacijska aktivnost antocijanina. No, utvrđen je pozitivan odnos između antioksidacijske aktivnosti i ukupne koncentracije antocijanina (Yang i sur., 2019) i temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti da se one biljne vrste, koje sadrže više antocijanina, mogu uspješnije boriti protiv oksidacije lipida i proteina.

Nakon trodnevne izloženosti 0,02 M CuSO₄ (pozitivna kontrola) došlo je do statistički značajnog povećanja sadržaja antocijanina u odnosu na negativnu kontrolu ($0,303 \pm 0,056$ mg/l vs. $0,102 \pm 0,038$ mg/l; $P = 0,0008$). Očekivan porast ukupnog sadržaja antocijanina, premda ne statistički značajan, izmjeren je pri tretmanu modelne biljke sa 6,0 ml metanolnog ekstrakta žljezdastog nedirka ($0,131 \pm 0,039$ mg/l) u odnosu na negativnu kontrolu ($0,102 \pm 0,038$ mg/l). Iz ovako blago povećanog sadržaja antocijanina može se zaključiti da je, pri izlaganju najvišoj dozi alelopatske biljne vrste, došlo do aktivacije antioksidacijskog odgovora modelne biljke. Sličan blagi porast nakon tretmana s najvišom dozom ekstrakta žljezdastog nedirka zabilježen je i kod GSH, drugog mjenenog antioksidansa u ovom istraživanju. Tretman s 1,5 ml i 3,0 ml ekstrakta invazivne vrste nije uzrokovao značajnu promjenu u sadržaju antocijanina ($0,088 \pm 0,045$ mg/l i $0,100 \pm 0,012$ mg/l) u odnosu na negativnu kontrolu. Nakon tretmana s 1,5 ml ekstrakta zabilježen je i blagi pad sadržaja antocijanina što može ukazivati na „trošenje“ njihovih zaliha u sprečavanju oksidacijskog stresa izazvanog trodnevnom izlaganju sjemenki ekstraktu žljezdastog nedirka. Može se primijetiti da se oba antioksidansa, GSH i antocijanini ponašaju slično nakon tretmana s ekstraktom alelopatske biljke: niže doze uzrokuju trošenje zaliha antioksidansa, dok više doze potiču biljnu stanicu na sintezu antioksidansa. Zabilježena velika standardna devijacija pri tretmanu s 1,5 ml ekstrakta žljezdastog nedirka može se pripisati različitoj vijabilnosti korištenih sjemenki rotkvice. Vijabilnost označava sposobnost stanice i organizma za život, njihov potencijal da prežive i razvijaju se (Copeland i McDonald, 2001). Iako je u svakoj Petrijevoj zdjelici bilo po 25 sjemenki te su tretirane u triplikatu jednako, moguće je da su sjemenke različito vijabilne te stoga daju različite rezultate mjerenja što rezultira s velikom standardnom devijacijom. Također, poznato je da su antocijanini relativno nestabilni spojevi na čiju stabilnost utječe mnoštvo faktora, poput same kemijske strukture antocijanina, temperature, pH, svjetlosti, kisika, sadržaja raznih metala i šećera u uzorku homogenata (ali i u ekstraktu kojim se tretira modelna biljka) pa se pri obradi rezultata trebaju poznavati svi spomenuti faktori koji će utjecati na stabilnost i, posljedično, na rezultat sadržaja antocijanina.

4.4. MDA

Peroksidacija lipida široko je korišten pokazatelj stresa i gubitka funkcije biljnih staničnih membrana. MDA, sekundarni toksični produkt lipidne peroksidacije, koji nastaje kada ROS-ovi razgrade PUFA-e membrana, koristi se kao biomarker za kvantifikaciju lipidne peroksidacije, a njegov sadržaj ukazuje i na oksidativni stres organizma. Dobiveni rezultati mjerenja sadržaja MDA u klijancima rotkvice prikazani su slikom 15.



Slika 15. Sadržaj MDA u homogenatu klijanaca rotkvice nakon trodnevne izloženosti različitim dozama metanolnog ekstrakta žljezdastog nedirka; NK – negativna kontrola (sjemenke izložene deioniziranoj vodi), PK – pozitivna kontrola (sjemenke izložene 0,02 M CuSO_4)

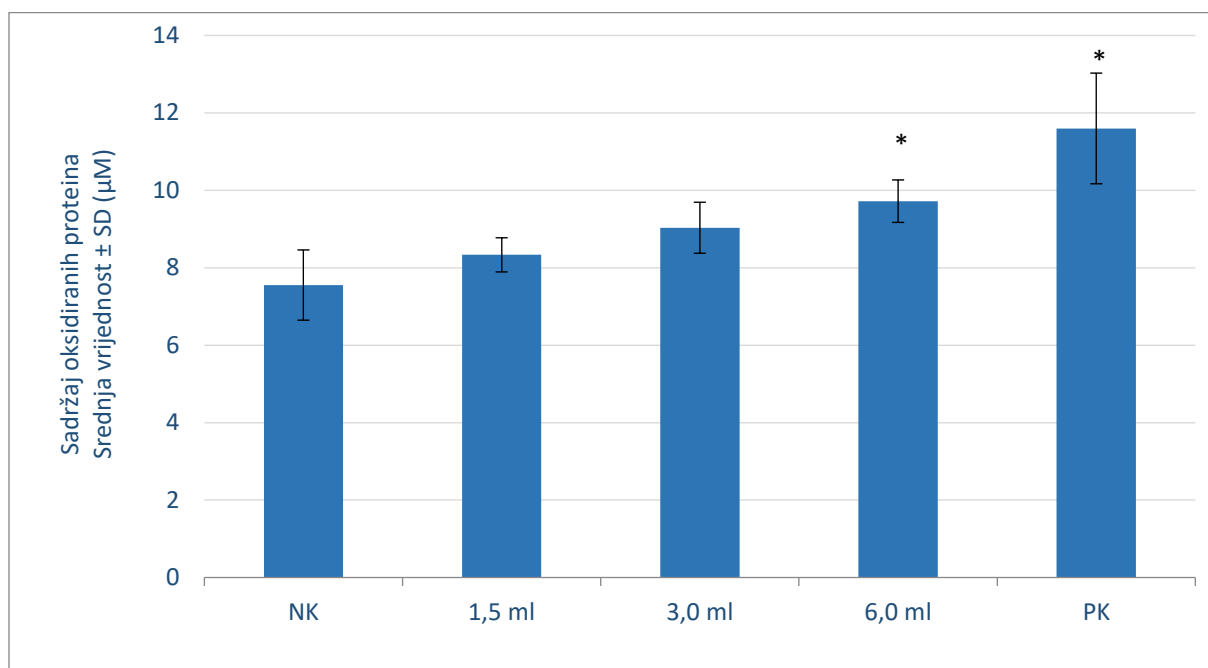
Kako je vidljivo iz slike, sadržaj MDA povećavao se s dozom ekstrakta žljezdastog nedirka. Tako je, u odnosu na negativnu kontrolu ($0,718 \pm 0,008 \mu\text{M}$), najveća koncentracija MDA zabilježena pri izloženosti 6,0 ml ekstrakta invazivne biljke ($0,778 \pm 0,055 \mu\text{M}$). Iako porast sadržaja nije statistički značajan, ovakav rezultat rastućeg sadržaja MDA može ukazati da je kod modelne biljke ipak došlo do lipidne peroksidacije i oštećenja stanične membrane te nastanka citotoksičnog produkta, MDA. Najviši sadržaj MDA zabilježen je prilikom tretmana s otopinom bakra (pozitivna kontrola) $1,970 \pm 0,006 \mu\text{M}$, što je bilo i statistički značajno više u odnosu na negativnu kontrolu. Sadržaja MDA nakon tretmana s dozama ekstrakta žljezdastog nedirka 1,5 ml i 3,0 ml bio je sličan vrijednosti kontrolne skupine. Prilikom izloženosti nižim dozama ekstrakta (1,5 ml i 3,0 ml) sadržaji GSH i antocijanina, kao predstavnika

antioksidativne sposobnosti biljne stanice, su ili blago padali ili bili na istoj razini. To može značiti da je biljna stanica trošila antioksidanse kako bi spriječila nastajanje MDA pri izloženosti nižim dozama ekstrakta. GSH i antocijanini su prisutni u normalnim fiziološkim uvjetima te prilikom blagog stresa dolazi do sniženja njihovog sadržaja (troše se na hvatanje slobodnih radikala). Tek kada je razina stresa visoka pri izloženosti većim koncentracijama oksidansa, biljka mora sintetizirati potrebne antioksidanse kako bi se obranila od oksidacijskog stresa.

4.5. Oksidirani proteini

Proteini su glavna meta radikala i dvoelektronskih oksidansa u biološkim sustavima zbog njihove visoke koncentracije i velike konstante brzine reakcije. Složena struktura daje im visoku selektivnost i specifičnost u obavljanju bioloških funkcija, stoga će se male promjene u strukturi odraziti na njihovu aktivnost. Modifikacija proteina reaktivnim radikalima može rezultirati povećanom hidrofilnošću i fragmentacijom bočnog lanca, agregacijom kovalentnim umrežavanjem ili hidrofobnim interakcijama, odmatanjem proteina te promijenjenim interakcijama s njihovim supstratima (Davies, 2016). Kako proteini sudjeluju u mnoštvu bioloških procesa, njihovo oksidacijsko oštećenje ima puno veće negativne učinke na organizam od samog propadanja molekule. Mjerenje sadržaja proteinskih karbonila najšire je korišten indikator i marker za oksidaciju proteina, a rezultati dobiveni njihovom kvantifikacijom u ovome istraživanju prikazani su slikom 16.

Negativna kontrola tretirana deioniziranom vodom imala je najniži sadržaj proteinskih karbonila ($7,553 \pm 0,906 \mu\text{M}$). Iz slike je jasno vidljivo da je, povećanjem doze ekstrakta alelopatske biljke, rastao i sadržaj proteinskih karbonila kao produkata oksidacije proteina. Statistički značajan porast zabilježen je kod tretmana najvišom dozom ekstrakta 6,0 ml ($9,720 \pm 0,548 \mu\text{M}$, $P = 0,012$) kao i kod tretmana otopinom CuSO_4 , pozitivna kontrola ($11,598 \pm 1,430 \mu\text{M}$, $P = 0,007$). Ovakvi rezultati potvrđuju da je trodnevni tretman modelne biljke s ekstraktom žljezdastog nedirka doveo do karbonilacije proteina, jedne od najštetnijih nepovratnih oksidativnih modifikacija proteina i glavnog obilježja poremećaja povezanih s oksidativnim stresom. Kako se mjerenje proteinskih karbonila često provodi da bi se procijenila razina oksidativnog stresa, može se zaključiti da je do istog došlo u uvjetima izloženosti metanolnom ekstraktu žljezdastog nedirka, što potvrđuju i rezultati mjerenja ostalih parametara oksidacijskog stresa.



Slika 16. Sadržaj oksidiranih proteina u homogenatu klijanaca rotkvice nakon trodnevne izloženosti različitim dozama metanolnog ekstrakta žljezdastog nedirka; NK – negativna kontrola (sjemenke izložene deioniziranoj vodi), PK – pozitivna kontrola (sjemenke izložene 0,02 M CuSO₄)

Provedena su i druga istraživanja alelopatskog učinka žljezdastog nedirka. U diplomskom radu Zelić (2020) ispitan je učinak ove biljke na bijelu gorušicu (*Sinapis alba*, L.). U tom istraživanju pokazano je da ekstrakt lista žljezdastog nedirka uzrokuje smanjenje mase svježeg tkiva modelne biljke, što je potvrdilo fitotoksičan učinak alelopatske biljke na bijelu gorušicu. Također, u tom je istraživanju zabilježen i blagi porast GSH i antocijanina nakon tretmana s najvišom dozom ekstrakta (6,0 ml) što je u skladnosti s ovim istraživanjem.

Pretpostavlja se da svoju invazivnost žljezdasti nedirak duguje fenolima - naftokinonima koji ispoljavaju fitotoksičan učinak na okolne biljke u staništu. U istraživanju koje su proveli Block i sur. (2019) potvrđeno je prisustvo 1,4-NQ u cvjetnim nektarima žljezdastog nedirka te u lišću i korijenju. Zbog njihove velike zastupljenost u ekstrafloralnim nektarijima Block i sur. (2019) zaključili su da se 1,4-NQ ispiru u tlo kišom gdje pokazuju svoje alelopatske i toksične učinke.

U istraživanju alelopatskog potencijala i mogućih alelopatskih sastavnica žljezdastog nendirka korištene su sadnice i mlade biljke autohtonih ciljnih vrsta: pravog blaženka (*Geum urbanum* L.), močvarne končare (*Filipendula ulmaria* L.), obične koprive (*Urtica dioica* L.) i krhke vrbe (*Salix fragilis* L., samo sadnice potonjeg), koje se često javljaju zajedno s invazivnom vrstom na različitim staništima (Bieberich i sur., 2018). Biljke su uzgajane u kompeticiji sa žljezdastim nendirkom ili tretirane pripravkom njegovih listova ili 2-metoksi-1,4-naftokinonom (2-MNQ), njegovim glavnom alolokemijskim sastojkom. Provedeno istraživanje pokazalo je da žljezdasti nendirak negativno utječe na rast svih ispitivanih vrsta. 2-MNQ doveo je do manjeg smanjenja rasta biljaka, što upućuje na to da možda nije jedina alelopatska tvar koju posjeduje žljezdasti nendirak. Stoga je zaključeno da žljezdasti nendirak smanjuje rast autohtone vegetacije i mijenja rane faze razvoja, ali da ih u potpunosti ne ometa. Istraživanje provedeno u ovom diplomskom radu u skladnosti je s navedenim istraživanjem - žljezdasti nendirak smanjio je rast modelne biljke rotkvice, ali nije u potpunosti spriječio njen razvoj. Važno je i primijetiti da je u ovome istraživanju ekstrakt u ispitivanim dozama imao slabiji učinak od otopine bakra za koju je utvrđen toksičan i pro-oksidativan učinak.

Za kraj, važno je uzeti u obzir da je kompletne učinke invazivnih vrsta na autohtone teško procijeniti jer ovise o nizu čimbenika, poput identiteta svake vrste, njenih svojstava i čimbenika okoliša. Također, oksidacijski stres kojeg bi invazivna vrsta mogla izazvati u autohtonoj je vrlo kompleksan fenomen kojeg je teško karakterizirati. Još uvijek ne postoji prihvaćena klasifikacija oksidacijskoga stresa, a jedan biomarker ne mora nužno biti prikladniji od drugoga. Upravo je stoga, kako bi se mogli donijeti relevantni zaključci u ovome istraživanju izmjereno više parametara: dva parametra antioksidacijske obrane i dva parametra oksidacijskog oštećenja makromolekula. Nadalje, alelopatija ni dan danas nije u potpunosti odgonetnuta i pred znanstvenicima je dug put k otkrivanju novih alelokemikalija, njihovih mehanizama djelovanja i utjecaja na mirookolinu.

5. ZAKLJUČCI

Nakon provedenog istraživanja alelopatskog učinka metanolnog ekstrakta lista biljne vrste *I. glandulifera* na klijanje i parametre oksidacijskog stresa modelne biljke rotkvice (*R. sativus*) te usporedbe s dostupnom literaturom može se zaključiti sljedeće:

1. Nakon trodnevnog tretmana metanolnim ekstraktom vrste *I. glandulifera* došlo je do smanjenja mase svježeg tkiva klijanaca vrste *R. sativus* i može se zaključiti da ekstrakt biljne vrste *I. glandulifera* fitotoksično djeluje na klijanje vrste *R. sativus*.
2. Prilikom izloženosti niskim dozama ekstrakta došlo je do blagog pada sadržaja neenzimskih antioksidansa, GSH i antocijanina, a pri izloženosti visokim dozama ekstrakta do blagog porasta sadržaja GSH i antocijanina u odnosu na negativnu kontrolu te se može zaključiti da je tretman u postavljenim eksperimentalnim uvjetima (modelna biljka, doza i dužina trajanja izloženosti) u modelnom organizmu (*R. sativus*) prouzročio trošenje, a potom i sintetiziranje novih zaliha antioksidansa u borbi protiv oksidacijskog stresa.
3. Nakon trodnevnog tretmana ekstraktom žljezdastog nendirka zabilježen je značajan porast sadržaja oksidiranih proteina, kao i porast sadržaja MDA, pokazatelja lipidne peroksidacije, što potvrđuje da je u modelnom organizmu došlo do oksidacijskog stresa.

Dobiveni rezultati ukazuju na fitotoksično djelovanje biljne vrste *I. glandulifera* koje ova biljka duguje naftokinonima. Može se zaključiti da je izazivanje oksidacijskog stresa jedan od mehanizama alelopatskog djelovanja biljne vrste *I. glandulifera*.

6. LITERATURA

- Ahanger MA, Tomar NS, Tittal M, Argal A, Agarwal RM. Plant growth under water/salt stress: ROS production; antioxidants and significance of added potassium under such conditions. *Physiol Mol Biol Plants*, 2017, 23 (4), 731-744.
- Alexieva V, Ivanov S, Sergiev I, Karanov E. Interaction between stresses. *Bulg. J. Plant Physiol.*, 2003, posebno izdanje, 1-17.
- Anjum NA, Ahmad I, Mohmood I, Pacheco M, Duarte AC, Pereira E, Umar S, Ahmad A, Khan NA, Iqbal M, Prasad MNV. Modulation of glutathione and its related enzymes in plants' responses to toxic metals and metalloids. *Environ. Exp. Bot.*, 2012, 75, 307-324.
- Arora A, Sairam RK, Srivastava GC. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr. Sci.*, 2002, 82 (10), 1227-1238.
- Basrek L. Invazivne biljne vrste i mogućnosti uklanjanja. Samobor, Javna ustanova za upravljanje zaštićenim područjima i drugim zaštićenim dijelovima prirode na području Zagrebačke županije „Zeleni prsten”, 2019.
- Beerling DJ, Perrins JM. *Impatiens glandulifera* Royle (*Impatiens Roylei* Walp.). *J. Ecol.*, 1993, 81, 367-382.
- Bhattacharjee S. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Curr. Sci.*, 2005, 89, 1113-1121.
- Bhowmik PC, Inderjit. Challenges and oportunites in implementing allelopathy. *J. Crop Prot.*, 2003, 22 (4), 661-671.
- Bieberich J, Lauerer M, Drachsler M, Heinrichs J, Müller S, Feldhaar H. Species- and developmental stage-specific effects of allelopathy and competition of invasive *Impatiens glandulifera* on co-occurring plants. *PLoS ONE*, 2018, 13 (11), 1-19.
- Block AK, Yakubova E, Widhalm JR. Specialized naphthoquinones present in *Impatiens glandulifera* nectaries inhibit the growth of fungal nectar microbes. *Plant Direct*, 2019, 3, 1-7.
- Campos JA, Peco JD, García-Noguero E. Antigerminative comparison between naturally occurring naphthoquinones and commercial pesticides. Soil dehydrogenase activity used as bioindicator to test soil toxicity. *Sci Total Environ*, 2019, 694, 1-7.

Chou CH. The role of allelopathy in agroecosystems: studies from tropical Taiwan. U: Agroecology: Researching the ecological basis for sustainable agriculture, Ecological studies 78. Gliessman SR, urednik, New York, Springer-Verlag, 1990, str. 105-121.

Clements DR, Feenstra KR, Jones K, Staniforth R. The Biology of Invasive Alien Plants in Canada. 9. *Impatiens glandulifera* Royle, *Can. J. Plant Sci.*, 2007, 88 (2), 403-417.

Copeland LO, McDonald MB. Seed Viability and Viability Testing, U: Principles of Seed Science and Technology. Copeland LO, urednik, New York, Springer, 2001, 124-139.

Davies MJ, Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J*, 2016, 473 (7), 805-825.

Demidchik V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environ. Exp. Bot.*, 2015, 109, 212-228.

Ellman GL, Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, 82 (1), 70-77.

Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis, *Mol Aspects Med*, 2009, 30 (1-2), 1-12.

Foyer CH, Vanacker H, Gomez LD, Harbinson J. Regulation of photosynthesis and antioxidant metabolism in maize leaves at optimal and chilling temperatures: review. *Plant Physiol. Biochem.*, 2002, 40 (6-8), 659-668.

Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death, *Biochem Biophys Res Commun.*, 2017, 482 (3), 419-425.

Gill SS, Anjum NA, Hasanuzzaman M, Gill R, Trivedi DK, Ahmad I, Pereira E, Tuteja N. Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiol. Biochem.*, 2013, 70, 204-212.

Giusti MM, Wrolstad RE. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy, *Curr. protoc. food anal. chem*, 2001, F1.2.1.-F1.2.13.

Haig T. Allelochemicals in Plants. U: Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry. Zeng RS, Mallik AU, Luo SM, urednici, New York, Springer, 2008, 63-104.

Heath RL, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 1968, 125 (1), 189-198.

Kazinczi G, Beres I, Narwal SS. Allelopathic plants. 3. Velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medic.). *Allelopathy J.*, 2001, 8 (2), 179-188.

Kazazić SP. Antioksidacijska i antiradikalska aktivnost flavonoida. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2004, 55 (4), 279-290.

Kovačević J. Poljoprivredna fitocenologija. Zagreb, Sveučilišna naklada Liber, 1979.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins, *Methods Enzymol*, 1990, 186, 464-478.

Lombardi L, Sebastiani L. Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants, *Plant Sci.*, 2005, 168, 797-802

Manivannan A, Kim JH, Kim DS, Lee ES. Deciphering the Nutraceutical Potential of *Raphanus sativus*-A Comprehensive Overview, *Nutrients*, 2019, 11 (402), 1-15.

Meyer GW, Bahamon Naranjo MA, Widhalm RM. Convergent evolution of plant specialized 1,4-naphthoquinones: metabolism, trafficking, and resistance to their allelopathic effects. *J Exp Bot*, 2021, 72 (2), 167-176.

Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.*, 2002, 7 (9), 405-410.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.*, 2004, 9 (10), 490-498.

Mundree SG, Baker B, Mowla S, Peters S, Marais S, Willigen CV, Govender K, Maredza A, Muyanga S, Farrant JM, Thomson JA. Physiological and molecular insights into drought tolerance. *Afr. J. Biotechnol.*, 2002, 1 (2), 28-38.

Narwal SS. Allelopathy in Crop Production. Jodhpur, Scientific Publishers, 2004, str. 1-249.

Nikolić T, Mitić B, Boršić I. Flora hrvatske: invazivne biljke. Zagreb, Alfa d.d., 2014, str. 190-193.

Purdel NC, Margina D, Ilie M. Current Methods Used in the Protein Carbonyl Assay. *Annu. res. rev. biol.*, 2014, 4 (12), 2015-2026.

Putnam AR. Allelochemicals from plants as herbicides. *Weed Technol.*, 1988, 2, 510-518.

Rausch T, Wachter A. Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends Plant Sci.*, 2005, 10, 503-509.

- Rice EL. Allelopathy. Orlando, FL, Academic Press inc., 1984, str.1-7.
- Ruckli R, Hesse K, Glauser H, Rusterholz HP, Baur B Inhibitory potential of naphthoquinones leached from leaves and exuded from roots of the invasive plant *Impatiens glandulifera*, *J Chem Ecol*, 2014, 40 (4), 371-378.
- Shao HB, Guo QJ, Chu LY, Zhao XN, Su ZL, Hu YC, Cheng JF. Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. *Colloids Surf. B.*, 2007, 54 (1), 37-45.
- Štefan L, Tepšić T, Zavidčić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija – urzoci i posljedice. *Med. Flum.*, 2007, 43 (2), 84-93.
- Tausz M, Sircelj H, Grill D. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *J. Exp. Bot.*, 2004, 55, 1955-1962.
- Urano K, Kurihara Y, Seki M, Shinozaki K. „Omics“ analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Curr Opin Plant Biol*, 2010, 13 (2), 132-138.
- Vankar PS, Srivastava Y. Evaluation of anthocyanin content in red and blue flowers. *Int J Food Eng*, 2010, 6, Article 7.
- Wang LJ, Huang WD, Li JY, Liu YF, Shi YL. Peroxidation of membrane lipid and Ca²⁺ homeostasis in grape mesophyll cells during the process of cross-adaptation to temperature stresses. *Plant Sci.*, 2004, 167 (1), 71-77.
- Zelić K. Alelopatski učinak žljezdastog neditirka (*Impatiens glandulifera* Royle) na bijelu gorušicu (*Sinapis alba* L.). Diplomski, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2020. <https://zir.nsk.hr/islandora/object/pharma:1950>, pristupljeno 10.5.2021.
- Zhang D, Haputhanthri R, Ansar SM, Vangala K, De Silva HI, Sygula A, Saebo S, Pittman CU. Ultrasensitive detection of malondialdehyde with surface-enhanced Raman spectroscopy. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 398, 3193–3201.
- Žljezdasti neditrak, <http://civ.iptpo.hr/zljezdasti-neditrak/>, pristupljeno 20.7.2021.
- Quasem JR, Foy CL. Weed Allelopathy, Its Ecological Impacts and Future Prospects: A Review. *J. Crop Prod*, 2008, 4 (2), 43-119.
- Xie X, He Z, Chen N, Tang Z, Wang Q, Cai Y. The Roles of Environmental Factors in Regulation of Oxidative Stress in Plant. *Biomed Res. Int.*, 2019, 1-11.

Yang L, Rong-Rong C, Ji-Li F, Ke Y. Total anthocyanins and cyanidin-3-O-glucoside contents and antioxidant activities of purified extracts from eight different pigmented plants. *Phcog Mag*, 2019, 15, 124-129.

Yu Q, Rengel Z. Drought and salinity differentially influence activities of superoxide dismutases in narrow-leaved lupins. *Plant Sci.*, 1999, 142 (1), 1-11.

7. SAŽETAK / SUMMARY

Sažetak

Cilj ovog rada bio je ispitati učinak metanolnog ekstrakta žljezdastog nendirka (*Impatiens glandulifera* R., Balsaminaceae) na klijavost sjemenki i na razinu oksidacijskog stresa u klijanaca rotkvice (*Raphanus sativus* L., Brassicaceae). Sjemenke vrste *R. sativus* tri su dana bile izložene metanolnom ekstraktu lista vrste *I. glandulifera* kojim se impregnirao filter papir trima različitim dozama (1,5 ml; 3,0 ml i 6,0 ml). Za pozitivnu kontrolu filter papir je impregniran s 0,02 M otopinom CuSO₄, a negativna kontrola bio je tretman deioniziranom vodom. Modelni organizam (*R. sativus*) tretiran je u triplikatu. Nakon trodnevne izloženosti, izvagana je masa svježeg tkiva klijanaca rotkvice te je potom pripremljen homogenat biljnog tkiva u trikloroetanoj kiselini (100 mg tkiva/0,5 mL TCA). U supernatantu homogenata određeni su parametri oksidacijskog stresa: sadržaj reduciranog glutationa (GSH), antocijanina, malondialdehida (MDA) i oksidiranih proteina. Metodom prema Ellmanu (1959) određen je sadržaj GSH, antocijanini su pH-diferencijalnom metodom mjereni prema Giusti i Wrolstadu (2001), tiobarbituratnim testom prema Heathu i Packeru (1968) određen je MDA, a derivatizacijom karbonilne skupine proteina s DNPH prema Levine i sur. (1990) određen je sadržaj oksidiranih proteina. Rezultati su statistički obrađeni *t-testom* (program *Excel*, $P < 0,05$).

Masa svježeg tkiva klijanaca rotkvice tretiranih ekstraktom žljezdastog nendirka bila je niža u odnosu na negativnu kontrolu. Značajnija promjena u sadržaju neenzimskih antioksidansa, GSH i antocijanina u odnosu na negativnu kontrolu nije zabilježena. Sadržaj MDA u klijanaca rotkvice tretiranih s najvišom dozom (6,0 ml) ekstrakta bio je viši u usporedbi s negativnom kontrolom. Sadržaj oksidiranih proteina klijanaca tretiranih s ekstraktom žljezdastog nendirka bio je viši od negativne kontrole, a statistički značajno viši bio je nakon tretmana s najvišom dozom ekstrakta, 6,0 ml (negativna kontrola *vs.* najviša doza ekstrakta; $7,553 \pm 0,906 \mu\text{M}$ *vs.* $9,720 \pm 0,548 \mu\text{M}$, $P = 0,012$). Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti kako ekstrakt biljne vrste *I. glandulifera* fitotoksično djeluje na klijanje vrste *R. sativus*, ali se u modelnoj biljci, u eksperimentalnim uvjetima, nije aktivirao adekvatan odgovor na oksidacijski stres (porast sadržaja GSH i antocijanina). To je rezultiralo porastom sadržaja MDA i oksidiranih proteina, odnosno došlo je do oksidacijskog stresa. Dobiveni rezultati jasno pokazuju da je oksidacijski stres mehanizam alelopatskog djelovanja biljne vrste *I. glandulifera*.

Summary

The aim of this study was to explore the effect of methanol extract of himalayan balsam (*Impatiens glandulifera* R., Balsaminaceae) on seed germination and on the level of oxidative stress in radish seedlings (*Raphanus sativus* L., Brassicaceae). Seeds of *R. sativus* were treated for three days with methanol extract prepared from *I. glandulifera* leaves (filter papers were impregnated with three doses of methanol extract: 1.5, 3 and 6 mL). As positive control 0.02 M CuSO₄ solution was used, and negative control was treatment with deionized water. The model organism (*R. sativus*) was treated in triplicate. After three days of exposure, the fresh mass of radish seedlings was weighed. Plant tissue homogenate was prepared using trichloroacetic acid (100 mg tissue/0.5 mL TCA). As parameters of oxidative stress, the content of reduced glutathione (GSH), anthocyanin, malondialdehyde (MDA) and oxidized proteins was determined in the supernatant of the homogenates. The GSH content was determined using the Ellman method (1959), anthocyanins were measured by the pH-differential method according to Giusti and Wrolstad (2001), the MDA was determined by using the thiobarbituric test according to Heath and Packer (1968) and the content of oxidized proteins was determined by derivatization of the carbonyl group of proteins with DNPH according to Levine et al. (1990). The obtained results were statistically analysed (*t-test*, Excel; P <0.05).

The fresh mass weight of radish seedlings treated with 1.5 – 6 ml of *I. glandulifera* extract was lower compared to the negative control. There was no significant change in the content of non-enzymatic antioxidants, GSH and anthocyanins compared to the negative control. The MDA content was higher in radish seedlings treated with the highest dose of extract (6 ml) compared to the negative control. The content of oxidized proteins was higher in treated seedlings, and treatment with the highest dose of *I. glandulifera* extract (6 mL) induced a statistically significant increase of oxidized proteins content (negative control vs. the highest extract dose; $7.553 \pm 0.906 \mu\text{M}$ vs. $9.720 \pm 0.548 \mu\text{M}$, P = 0.012). According to the results, it can be concluded that the *I. glandulifera* extract has a phytotoxic effect on *R. sativus* germination, but in the model plant, in experimental conditions, an adequate response to oxidative stress (increase in GSH and anthocyanin content) was not activated. This resulted in an increase in the content of MDA and oxidized proteins, which means that oxidative stress has occurred. Therefore, it can be concluded that one of the mechanisms of allelopathic effect *I. glandulifera* is oxidative stress.

8. PRILOG

Popis kratica

CAT - katalaza

DTNB - 5,5'-ditiol-(2-nitrobenzojeva kiselina)

2,4-DNPH - 2,4-dinitrofenilhidrazin

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina

GSH - reducirani glutation

GSSG - oksidirani glutation

MDA - malondialdehid

MNQ - 2-metoksi-1,4-naftokinon

PUFA - polinezasićene masne kiseline

PX - peroksidaza

RCF - relativna centrifugalna sila

ROS - reaktivni kisikovi spojevi

RPM - okretaji u minuti

SOD - superoksid dismutaza

TBA - 2-tiobarbituratna kiselina

TCA - trikloroctena kiselina

UHPLC-MS - tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti vezana sa spektrometrom masa

**9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA /
BASIC DOCUMENTATION CARD**

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku botaniku
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Parametri oksidacijskog stresa u klijanaca rotkvice (*Raphanus sativus* L.) nakon izloženosti ekstraktu žljezdastog nendirka (*Impatiens glandulifera* Royle)

Leona Jagodar

SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je ispitati učinak metanolnog ekstrakta žljezdastog nendirka (*Impatiens glandulifera* R., Balsaminaceae) na klijavost sjemenki i na razinu oksidacijskog stresa u klijanaca rotkvice (*Raphanus sativus* L., Brassicaceae). Sjemenke vrste *R. sativus* tri su dana bile izložene metanolnom ekstraktu lista vrste *I. glandulifera* kojim se impregnirao filter papir trima različitim dozama (1,5 ml; 3,0 ml i 6,0 ml). Za pozitivnu kontrolu filter papir je impregniran s 0,02 M otopinom CuSO_4 , a negativna kontrola bio je tretman deioniziranom vodom. Modelni organizam (*R. sativus*) tretiran je u triplikatu. Nakon trodnevne izloženosti, izvagana je masa svježeg tkiva klijanaca rotkvice te je potom pripremljen homogenat biljnog tkiva u trikloroctenoj kiselini (100 mg tkiva/0,5 mL TCA). U supernatantu homogenata određeni su parametri oksidacijskog stresa: sadržaj reduciranog glutationa (GSH), antocijanina, malondialdehida (MDA) i oksidiranih proteina. Metodom prema Ellmanu (1959) određen je sadržaj GSH, antocijanini su pH-diferencijalnom metodom mjereni prema Giusti i Wrolstadu (2001), tiobarbituratnim testom prema Heathu i Packeru (1968) određen je MDA, a derivatizacijom karbonilne skupine proteina s DNPH prema Levine i sur. (1990) određen je sadržaj oksidiranih proteina. Rezultati su statistički obrađeni *t*-testom (program *Excel*, $P < 0,05$). Masa svježeg tkiva klijanaca rotkvice tretiranih ekstraktom žljezdastog nendirka bila je niža u odnosu na negativnu kontrolu. Značajnija promjena u sadržaju neenzimskih antioksidansa, GSH i antocijanina u odnosu na negativnu kontrolu nije zabilježena. Sadržaj MDA u klijanaca rotkvice tretiranih s najvišom dozom (6,0 ml) ekstrakta bio je viši u usporedbi s negativnom kontrolom. Sadržaj oksidiranih proteina klijanaca tretiranih s ekstraktom žljezdastog nendirka bio je viši od negativne kontrole, a statistički značajno viši bio je nakon tretmana s najvišom dozom ekstrakta, 6,0 ml (negativna kontrola *vs.* najviša doza ekstrakta; $7,553 \pm 0,906 \mu\text{M}$ *vs.* $9,720 \pm 0,548 \mu\text{M}$, $P = 0,012$). Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti kako ekstrakt biljne vrste *I. glandulifera* fitotoksično djeluje na klijanje vrste *R. sativus*, ali se u modelnoj biljci, u eksperimentalnim uvjetima, nije aktivirao adekvatan odgovor na oksidacijski stres (porast sadržaja GSH i antocijanina). To je rezultiralo porastom sadržaja MDA i oksidiranih proteina, odnosno došlo je do oksidacijskog stresa. Dobiveni rezultati jasno pokazuju da je oksidacijski stres mehanizam alelopatskog djelovanja biljne vrste *I. glandulifera*.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 51 stranicu, 16 grafičkih prikaza, 4 tablice i 54 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Žljezdasti nendirak, alelopatija, oksidacijski stres, rotkvica

Mentor: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Maja Friščić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Daniela Jakšić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmaceutical Botany
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Oxidative stress parameters in radish (*Raphanus sativus* L.) seedlings after exposure to himalayan balsam (*Impatiens glandulifera* Royle) extract

Leona Jagodar

SUMMARY

The aim of this study was to explore the effect of methanol extract of himalayan balsam (*Impatiens glandulifera* R., Balsaminaceae) on seed germination and on the level of oxidative stress in radish seedlings (*Raphanus sativus* L., Brassicaceae). Seeds of *R. sativus* were treated for three days with methanol extract prepared from *I. glandulifera* leaves (filter papers were impregnated with three doses of methanol extract: 1.5, 3 and 6 mL). As positive control 0.02 M CuSO₄ solution was used, and negative control was treatment with deionized water. The model organism (*R. sativus*) was treated in triplicate. After three days of exposure, the fresh mass of radish seedlings was weighed. Plant tissue homogenate was prepared using trichloroacetic acid (100 mg tissue/0.5 mL TCA). As parameters of oxidative stress, the content of reduced glutathione (GSH), anthocyanin, malondialdehyde (MDA) and oxidized proteins was determined in the supernatant of the homogenates. The GSH content was determined using the Ellman method (1959), anthocyanins were measured by the pH-differential method according to Giusti and Wrolstad (2001), the MDA was determined by using the thiobarbituric test according to Heath and Packer (1968) and the content of oxidized proteins was determined by derivatization of the carbonyl group of proteins with DNPH according to Levine et al. (1990). The obtained results were statistically analysed (*t*-test, Excel; $P < 0.05$). The fresh mass weight of radish seedlings treated with 1.5 – 6 ml of *I. glandulifera* extract was lower compared to the negative control. There was no significant change in the content of non-enzymatic antioxidants, GSH and anthocyanins compared to the negative control. The MDA content was higher in radish seedlings treated with the highest dose of extract (6 ml) compared to the negative control. The content of oxidized proteins was higher in treated seedlings, and treatment with the highest dose of *I. glandulifera* extract (6 mL) induced a statistically significant increase of oxidized proteins content (negative control vs. the highest extract dose; $7.553 \pm 0.906 \mu\text{M}$ vs. $9.720 \pm 0.548 \mu\text{M}$, $P = 0.012$). According to the results, it can be concluded that the *I. glandulifera* extract has a phytotoxic effect on *R. sativus* germination, but in the model plant, in experimental conditions, an adequate response to oxidative stress (increase in GSH and anthocyanin content) was not activated. This resulted in an increase in the content of MDA and oxidized proteins, which means that oxidative stress has occurred. Therefore, it can be concluded that one of the mechanisms of allelopathic effect *I. glandulifera* is oxidative stress.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 51 pages, 16 figures, 4 tables and 54 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Himalayan balsam, allelopathy, oxidative stress, radish

Mentor: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Friščić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Daniela Jakšić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2021.

