

Utjecaj bisfenola A na parametre oksidacijskog stresa u korjenčićima luka (*Allium cepa* L.)

Blažeka, Klara

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:730980>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



Klara Blažeka

**Utjecaj bisfenola A na parametre oksidacijskog
stresa u korjenčićima luka (*Allium cepa* L.)**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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. Istraživanje je provedeno u sklopu bilateralnog hrvatsko-slovenskog znanstveno-istraživačkog projekta „Toksikološki profil i interakcije bisfenola A i njegovih analoga“ financiranog iz sredstava Ministarstva znanosti i obrazovanja Republike Hrvatske.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Ana-Mariji Domijan na iznimnoj dostupnosti, posvećenosti, strpljenju, potpori i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada. Zahvaljujem i na ugodnoj radnoj atmosferi tijekom izrade biološkog istraživanja.

Najveće hvala mojim roditeljima koji su mi omogućili školovanje te pružili iznimnu potporu i podršku, bez koje bih teško uspjela. Zahvaljujem sestrama, nećakinji i dečku na strpljenju, ljubavi te riječima utjehe i ohrabrenja kada su mi bile potrebne.

Sadržaj

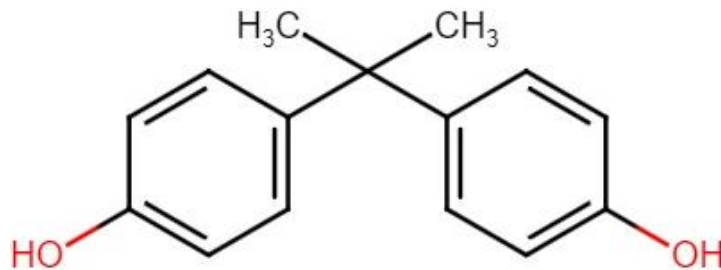
1. Uvod.....	1
1.1 Bisfenol A	1
1.1.1 Utjecaj BPA na okoliš	2
1.1.2 Utjecaj BPA na čovjeka	2
1.2 Oksidacijski stres i ROS-ovi	4
1.2.1 Reaktivni kisikovi spojevi – ROS-ovi.....	4
1.2.2 Lipidna peroksidacija	6
1.2.3 Oksidirani proteini.....	7
1.2.4 Obrana biljke od oksidacijskog stresa.....	8
1.2.5 Glutation.....	9
2. Obrazloženje teme.....	10
3. Materijali i metode	11
3.1 Materijali	11
3.1.1 Kemikalije	11
3.1.2 Oprema	11
3.1.3 Biljni model – obični luk (<i>Allium cepa</i> L.)	12
3.2 Metode.....	13
3.2.1 Biološki pokus.....	13
3.2.2 Određivanje mase svježeg tkiva korjenčića	15
3.2.3 Priprema homogenata biljnog tkiva	15
3.2.4 Određivanje sadržaja GSH	16
3.2.5 Određivanje sadržaja MDA.....	18
3.2.6 Određivanje sadržaja oksidiranih proteina	19
3.3 Statistička obrada rezultata.....	22
4. Rezultati i rasprava	23
4.1 Masa svježeg tkiva korjenčića.....	23
4.2 GSH.....	24

4.3 MDA.....	25
4.4 Oksidirani proteini.....	26
5. Zaključci.....	32
6. Popis kratica	33
7. Literatura.....	34
8. Sažetak / Summary.....	41
Temeljna dokumentacijska kartica / Basic documentation card	

1. Uvod

1.1 Bisfenol A

Bisfenoli su skupina spojeva s dvije fenolne funkcionalne skupine. Koriste se u proizvodnji polikarbonata i epoksidnih smola te drugih potrošačkih proizvoda. Najšire korišteni bisfenol je bisfenol A (BPA) poznat kao 2,2-bis(4-hidroksifenil)propan (slika 1). Ovaj kemijski spoj prvi put je predstavio ruski kemičar Aleksandar P. Dianin 1891. godine, a široka komercijalna proizvodnja i uporaba započinje 50-ih godina 20. stoljeća (Jalal i sur., 2017; Inadera, 2015).



Slika 1. Strukturna formula BPA

BPA je bijela do svijetlosmeđa krutina u obliku pahuljica ili praha blagog fenolnog mirisa, slabe topljivosti u vodi, a dobre topljivosti u organskim otapalima kao što je etanol, eter i benzen te alkalnim otopinama (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov; Corrales i sur., 2015). Zbog svoje strukture i umreživačkih svojstava, BPA je široko korišten i vrlo teško zamjenjivi spoj usprkos negativnom učinku na okoliš i čovjeka (Bocharnikova, 2020; Hwang i sur., 2015).

U 2012. godini diljem svijeta proizvedeno je više od 4,6 milijuna tona BPA, a proizvodnja nastavlja rasti godišnjom stopom od 4,6%. Prema nekim predviđanjima u 2023. godini globalna količina proizvedenog BPA će iznositi 7,4 milijuna tona, a moguće i više (Zaborowska i sur., 2021; www.prnewswire.com). Porast proizvodnje BPA usko je povezan sa sve većom potražnjom i potrošnjom proizvoda i ambalaže u čijoj se proizvodnji koristi BPA. BPA je intermedijarna ili konačna komponenta brojnih komercijalnih proizvoda kao što su deterdženti, građevinski materijal, ambalaža za hranu i piće, elektronički uređaji, medicinska oprema i medicinski potrošni materijal poput zubnih ispuna i filtera za dijalizu, fenolnih i epoksidnih smola te brojnih polimernih spojeva (Zaborowska i sur., 2021; Frankowski i sur., 2020). Plastični i plastificirani proizvodi mogu otpuštati BPA u hranu i piće, posebice uslijed

zagrijavanja, kiselih ili bazičnih uvjeta te prisutnost visokih koncentracija natrijeva klorida ili biljnih ulja. Navedeni uvjeti doprinose bržem i većem prijenosu BPA u ljudski organizam i okoliš (Cimmino i sur., 2020).

1.1.1 Utjecaj BPA na okoliš

Masovna i učestala primjena BPA rezultirala je značajnom prisutnosti i akumulacijom BPA u okolišu. Tako je prema literaturnim podacima, BPA moguće detektirati u tlu, zraku, podzemnim, nadzemnim i otpadnim vodama, kanalizacijskom mulju, prašini te u biljkama, životinjama i ljudima (Janda i sur., 2021; Corrales i sur., 2015; Huang, 2012). Otpadne vode i kanalizacijski mulj glavni su izvor zagađenja tla BPA, čiji transport u tlo značajno ovisi o sastavu tla, kako organskom tako i mineralnom. Ulaskom u biljno tkivo BPA se brzo metabolizira glikozilacijom ili pak stvaranjem polarnih polimernih spojeva. Prisutnost BPA u tlu značajno utječe na biokemijsku i mikrobiološku homeostazu tla te na rast i razvoj biljaka i mikroorganizama (Zaborowsaka i sur., 2021). Istraživanja su pokazala da BPA potiče biljni organizam na stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS), odnosno uvodi biljni organizam u stanje oksidacijskog stresa. Usprkos toksičnosti nastalih ROS-ova tijekom izloženosti biljnog organizma BPA, Zhang i sur. (2018) su na korijenju soje ukazali na potencijalnu zaštitnu ulogu ROS-ova koji sudjeluju u oksidativnom metabolizmu BPA. U okolišu, značajnu ulogu u metabolizmu BPA uz biljke imaju i mikroorganizmi (Zielinska i sur., 2019). Studije su pokazale snažan negativni učinak BPA na razvoj i reprodukciju vodenih kralježnjaka, kao i na njihov imunostani sustav i metabolizam, ali i na biokemijske parametre u serumu i mikrobiotu gastrointestinalnog trakta pasa (Koestel i sur., 2017; Canesi i Fabbri, 2015). Zbog sve veće zastupljenosti BPA te spoznaja o njegovim štetnim učincima na okoliš i čovjeka, znanstvenici nastoje razviti efikasne metode eliminacije BPA, biorazgradnjom, oksidacijom i filtracijom (Juan i sur., 2021).

1.1.2 Utjecaj BPA na čovjeka

BPA kao ubikvitarna molekula, predstavlja veliki rizik ne samo za okoliš, već i za čovjeka. Poznato je da BPA u organizam čovjeka ulazi ingestijom, inhalacijom te kroz kožu, oči i sluznice (Cimmino i sur., 2020). Također, istraživanja su pokazala da BPA može proći placentarnu barijeru te izazvati negativne učinke na rast i razvoj fetusa (Cimmino i sur., 2020; Iwano i sur., 2018). Ulaskom u gastrointestinalni trakt BPA se glukuronidira u lumenu, čime je

ograničen ulazak slobodnog BPA. Ipak, slobodni BPA koji uđe u krvotok u jetri podliježe glukuronidaciji te u manjoj mjeri sulfataciji što dovodi do povećanja hidrofilnosti molekule i lakšoj eliminaciji putem bubrega i žuči (Quiroga, 2021; Yokota i sur., 1999). Enzim β -glukuronidaza ima negativni utjecaj na detoksifikaciju BPA u organizmu. Pojedina tkiva i organi (placenta, pluća) pokazuju visoku aktivnost navedenog enzima što doprinosi smanjenju eliminacije te povećanoj izloženosti organizma učinku BPA. Tako visoka aktivnost placentarne kao i fetalne β -glukuronidaze dovodi do povećane izloženosti fetusa BPA (Iwano i sur., 2018; Edlow i sur., 2012). Osim reakcijama II faze metabolizma, BPA se metabolizira enzimima I faze, citokromima P450. Produkti koji nastaju su 4-metil-2,4-bis(4-hidroksifenil)pent-1-en (MBP) i bisfenol-o-kinon. Za bisfenol-o-kinon pokazano je da se veže za DNA molekulu čime nastaju DNA-adukti, dok je za MBP pokazano estrogeno djelovanje te da potiče aktivnost ribosoma, sintezu i transport proteina (Schönemann i sur., 2022; Atkinson i Roy, 1995).

BPA svrstavamo u skupinu spojeva koji djeluju na endokrini sustav, a nazivamo ih endokrinim disruptorima. Zbog svoje strukture slične 17β -estradiolu, BPA stupa u interakciju s estrogenskim receptorima te djeluje agonistički ili antagonistički na endokrine receptore time djelujući na signalizacijske puteve (Konieczna i sur., 2015). Interferencijom s receptorima i signalnim putevima, indukcijom transkripcijskih faktora te preko epigenetičkih modifikacija, izloženost BPA može dovesti do brojnih poremećaja i bolesti (Cimmino i sur., 2020). Istraživanja su pokazala da u ljudi BPA ima obesogeni potencijal, potiče oksidativni stres i adipogenezu, utječe negativno na muški i ženski reproduktivni sustav te rad štitnjače, doprinosi razvoju inzulinske rezistencije i upale, remeti funkciju β -stanica gušterače i doprinosi razvoju šećerne bolesti (Meli i sur., 2020; Kim i sur., 2019). Pored toga utvrđeno je da izloženost BPA povećava rizik od hipertenzije i kardiovaskularnih bolesti, toksično djeluje na jetru i bubrege, remeti funkciju imunskog sustava te je povezan s nastankom i razvojem karcinoma (Quiroga, 2021; Cimmino i sur., 2020).

Prema Europskoj agenciji za sigurnost hrane (EFSA) nakon prehrambenih proizvoda (pohranjenih u plastičnoj ambalaži), termalni papir je drugi najveći izvor BPA. Premda Američka agencija za hranu i lijekove (FDA) i EFSA smatraju da razina BPA u prehrambenim proizvodima ne prelazi granice štetnog učinka na zdravlje, Europska unija je ograničila sadržaj BPA u termalnom papiru na 0,02% mase papira, a u prosincu 2020. godine je snizila podnošljivi dnevni unos (engl. *Tolerable Daily Intake*, TDI) BPA s 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tjelesne mase na dan na 0,04 ng/kg tjelesne mase na dan (Zaborowska i sur. 2021). U siječnju 2022. godine EFSA je održala sastanak o nacrtu znanstvenog mišljenja o ponovnoj procjeni rizika prisutnosti BPA u

prehrambenim proizvodima za javno zdravlje. Usvajanje konačnog mišljenja se očekuje u prosincu 2022. godine (www.efsa.europa.eu).

1.2 Oksidacijski stres i ROS-ovi

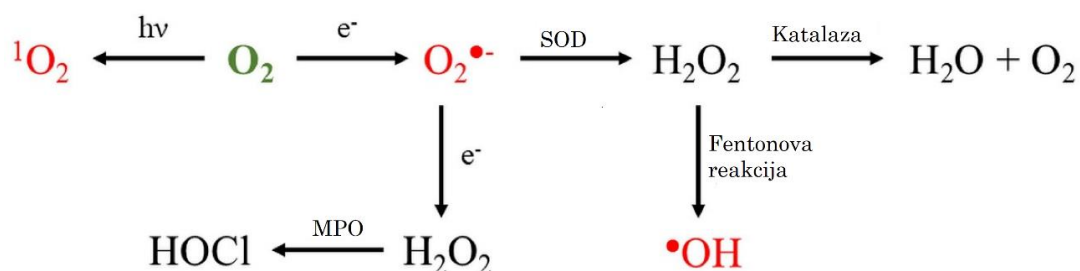
Oksidacijski stres je složeni fizikalno-kemijski fenomen koji je rezultat neravnoteže pro-oksidacijskih i antioksidacijskih čimbenika u korist pro-oksidacijskih čimbenika (Demidchik, 2015; Birben i sur., 2012). Oksidacijski stres nastaje uslijed prekomjerne proizvodnje i nakupljanja ROS-ova kao odgovor na različite biotičke i abiotičke čimbenike poput UV-zračenja, rendgenskog zračenja, toksičnih kemikalija i ksenobiotika (Demidchik, 2015; Štefan i sur., 2007). ROS-ovi, ali i reaktivni dušikovi (engl. *Reactive Nitrogen Species*, RNS) i ugljikovi (engl. *Reactive Carbon Species*, RCS) spojevi mogu također nastati unutar stanice tijekom uobičajenih staničnih procesa (Rahman i sur., 2012; Birben i sur., 2012; Štefan i sur., 2007). ROS-ovi su izrazito reaktivne molekule koje stupaju u interakciju s ugljikohidratima, proteinima, nukleinskim kiselinama i lipidima čime dovode do oštećenja, ali i posljedične promjene ili pak gubitka funkcije navedenih staničnih struktura. Usprkos razvoju enzimskih i neenzimskih antioksidacijskih sustava čija je osnovna uloga uklanjanje ROS-ova i blokiranje štetnog učinka istih, pod djelovanjem različitih biotičkih i abiotičkih čimbenika i u patološkim stanjima, može doći do poremećaja normalne funkcije i preopterećenja antioksidacijskog sustava čime stanica podliježe negativnom učinku ROS-ova (Hasanuzzaman i Fujita, 2022; Demidchik, 2015). Oksidacijski stres se nalazi u pozadini brojnih bolesti i patoloških stanja poput karcinoma, ateroskleroze, hipertenzije, astme, KOPB-a, dijabetesa, hepatitisa, poremećaja reproduktivnog sustava te bubrežne funkcije i neurodegenerativnih bolesti primjerice Parkinsonove i Alzheimerove bolesti (Birben i sur., 2021; Rahman i sur., 2012).

1.2.1 Reaktivni kisikovi spojevi – ROS-ovi

ROS-ovi su spojevi koje sadrže jedan ili više aktiviranih atoma kisika, a možemo ih podijeliti na slobodne radikale i neradikalne intermedijare (Demidchik, 2015; Burton i Jauniaux, 2011). Pojam ROS-ovi uključuje vrste kao što su vodikov peroksid (H_2O_2), hipokloritna kiselina ($HClO$), ozon (O_3), singletni kisik (1O_2), ali i slobodni kisikovi radikali kao što su hidroperoksilni (HO_2^{\bullet}), alkoksilni (RO^{\bullet}), peroksilni (ROO^{\bullet}), hidroksilni (OH^{\bullet}) te superoksidni radikal ($O_2^{\bullet -}$). Slobodni radikali su kemijske vrste koje sadrže jedan ili više

nesparenih elektrona koji su izvor njihove visoke reaktivnosti. Ekscitacijom molekuskog kisika (O_2) nastaje singletni kisik, a prijenosom jednog do tri elektrona (e^-) redom nastaju superoksidni radikal ($O_2^{\bullet -}$), vodikov peroksid (H_2O_2) te hidroksilni radikal (OH^\bullet) (Mittler, 2002).

Kao neizbježni nusprodukti aerobnog metabolizma ROS-ovi nastaju u procesu respiracije na mitohondrijima i fotosinteze na kloroplastima, ali i u peroksisomima te djelovanjem brojnih membranski vezanih i citosolnih enzima kao što su NADPH-oksidaza, amin-oksidaza i peroksidaza, superoksid dismutaza, ksantin oksidaza, mijeloperoksidaza, ciklooksigenaza i druge oksidaze (Mhamdi i Van Breusegem, 2018; Rahman i sur., 2012; Štefan i sur., 2007; Mittler, 2002). Slobodni metali poput bakra i željeza također potiču produkciju ROS-ova i to pretežito hidroksilnog radikala iz vodikovog peroksida. Ta se reakcija naziva Fentonova reakcija (Rahman i sur., 2012; Štefan i sur., 2007). Velike količine ROS-ova nastaju u stanicama imunskog sustava (neutrofili, monociti i makrofagi) procesom zvanim „oksidativni prasak“, čiji je osnovni cilj uništavanje patogena. Tako djelovanjem NADPH-oksidaze nastaju superoksidni anion ($O_2^{\bullet -}$), vodikov peroksid (H_2O_2) te hidroksilni radikal (OH^\bullet), ali i hipokloritna kiselina uz prisutnost kloridnih iona djelovanjem mijeloperoksidaze. Na slici 2 prikazan je nastanak ROS-ova.



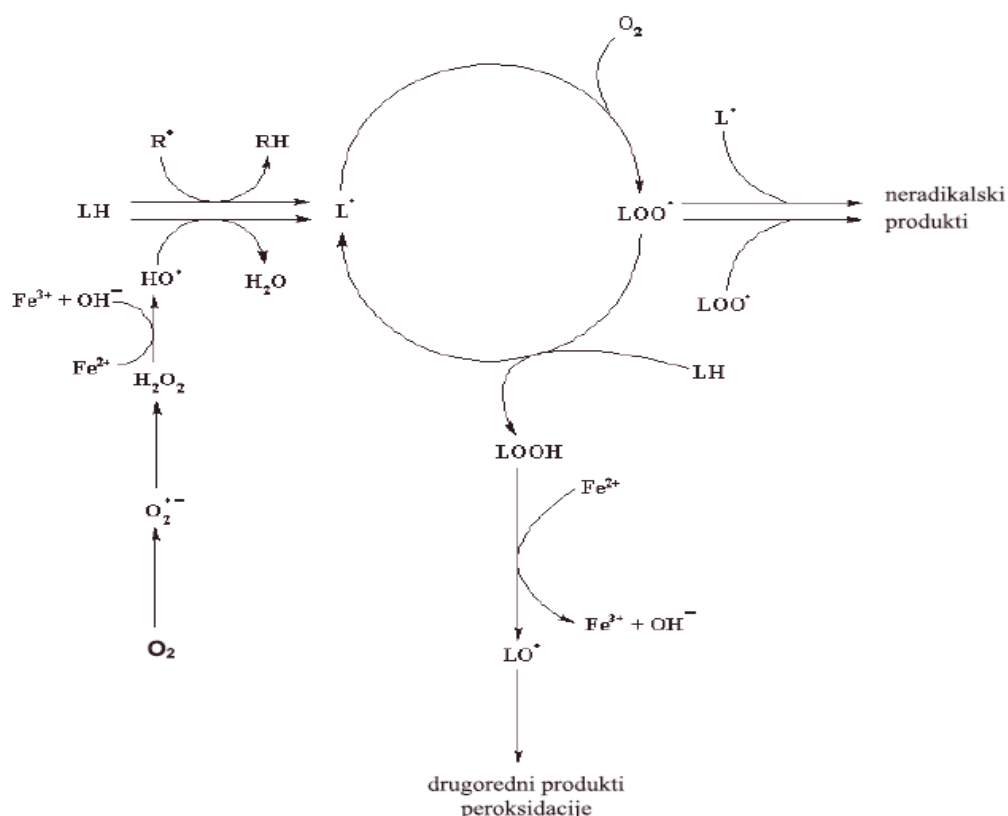
Slika 2. Nastajanje ROS-ova redukcijom i ekscitacijom molekuskog kisika (preuzeto iz: Čapek i Roušar, 2021 i prilagođeno); Kratice: SOD - superoksid dismutaza, MPO - mijeloperoksidaza i $h\nu$ – zračenje. Crveno obojenje označuje slobodne radikale kisika

ROS-ovi kao i ostali reaktivni spojevi i slobodni radikali potiču oksidacijski stres kroz oksidaciju staničnih struktura (Demidchik, 2015). Premda ROS-ove pretežito smatramo štetnima i povezujemo ih s različitim patološkim stanjima, istraživanja su pokazala da ROS-ovi imaju važnu fiziološku ulogu (Bardaweel i sur., 2018). U normalnim fiziološkim uvjetima sadržaj ROS-ova je reguliran antioksidacijskim obrambenim mehanizmima te ROS-ovi služe kao važne signalne molekule uključene u brojne procese kao što su programirana stanična smrt, proliferacija te imunski odgovor (Brieger i sur., 2012). U životnom ciklusu biljke, ROS-ovi

utječu na rast i razvoj biljke, odgovor biljke na biotičke i abiotičke stresove te prilagodbu organizma na promjenu životnih uvjeta, odnosno na stjecanje tolerancija (Mhamdi i Van Breusegem, 2018; Demidchik, 2015).

1.2.2 Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija je lančana reakcija u kojoj molekule lipida oksidiraju do lipidnih peroksida (Cai, 2005). Proces lipidne peroksidacije odvija se u tri koraka: inicijacija, propagacija i terminacija (slika 3).



Slika 3. Peroksidacija lipida (preuzeto iz: Štefan i sur., 2007 i prilagođeno); Kratice: O_2 - molekulski kisik, $O_2^{\bullet -}$ - superoksidni radikal, OH^- - hidroksidni anion, HO^\bullet - hidroksilni radikal, H_2O_2 - vodikov peroksid, LH - lipidna molekula, R^\bullet - prooksidans, L^\bullet - lipidni radikal, LOO^\bullet - lipidni peroksilni radikal, LO^\bullet - lipidni alkoksilni radikal, $LOOH$ -lipidni hidroperoksid

Za inicijaciju su odgovorni slobodni radikali poput OH^\bullet , HO_2^\bullet , RO^\bullet i ROO^\bullet . Napadom ROS-ova koji su sposobni izdvojiti atom vodika iz metilenske skupine ($-CH_2$) dolazi do inicijacije peroksidacijskog niza pri čemu nastaje slobodni lipidni radikal (L^\bullet). Za razliku od nezasićenih masnih kiselina i masnih kiselina s jednom dvostrukom vezom, višestruko nezasićene masne kiseline (PUFA) izrazito su podložne oksidaciji. Nastali slobodni lipidni

radikal se nastoji stabilizirati reorganizacijom molekule formirajući konjugirani dien koji reakcijom s molekulskim kisikom daje peroksilni radikal (LOO[•]). Peroksilni radikal ima tendenciju eliminirati atom vodika (H⁺) iz drugih organskih molekula. Ako je ta organska molekula lipid, dolazi do stvaranja lipidnog hidroperoksida (LOOH) i reaktivnog ugljikovog radikala koji nastavljaju reakciju slobodno radikalskim mehanizmom. Opisana faza se naziva faza propagacije. Nastali lipidni hidroperoksid se može podvrgnuti reduktivnom cijepanju uz reducirane prijelazne metale (Fe²⁺, Cu⁺) i formirati lipidni alkoksilni radikal (LO[•]), koji je vrlo reaktivan i potiče reinicijalizaciju, odnosno daljnju prolongaciju (Demidchik, 2015). Kao konačni produkti peroksidacije lipida mogu nastati kratkolančani produkti poput hidroksilnih kiselina, aldehida, ketona, ugljikovodika i epoksida. Navedeni su produkti također reaktivni te u interakciji s drugim molekulama unutar stanice mogu dovesti do njihova oštećenja. Oštećenjem lipida uslijed lipidne peroksidacije dolazi do gubitka fluidnosti i povećanja permeabilnosti membrane, smanjenja membranskog potencijala, smanjenja i gubitka funkcije stanične membrane te u konačnosti do smrti stanice (Štefan i sur., 2007).

Malondialdehid (MDA) je jedan od produkata lipidne peroksidacije. Iako stabilan, MDA može izazvati oštećenja staničnih struktura kao što su proteini i nukleinske kiseline. Uz 4-hidroksinonenal (HNE), izoprostan i druge produkte lipidne peroksidacije, MDA je često korišteni biomarker peroksidacije lipida i oksidacijskog oštećenja stanice, a njegov se sadržaj može odrediti spektrofotometrijski u reakciji s tiobarbituratnom kiselinom (Demidchik, 2015).

1.2.3 Oksidirani proteini

Visoke razine ROS-ova dovode do oksidacije staničnih komponenti, uključujući proteine (Tola i sur., 2021). Proteini su glavne komponente većine bioloških sustava te su stoga prvi na udaru ROS-ova (Davies, 2016). Modifikacije proteina posredovane ROS-ovima daju široki spektar post-translacijskih modifikacija (PTM) bočnih ogranaka, ali i okosnice proteina, a jedna od njih je karbonilacija proteina (Tola i sur., 2021; Davies, 2016).

Karbonilacija proteina je najčešća ireverzibilna PTM koju karakterizira uvođenje aldehidnih i ketonskih karbonilnih skupina u bočne ogranke aminokiselina (Tola i sur., 2021). Razlikuju se dvije glavne vrste karbonilacije proteina, primarna i sekundarna (Tola i sur., 2021; Demidchik, 2015). Primarna karbonilacija podrazumijeva metalom kataliziranu oksidaciju bočnih ogranaka aminokiselina (lizina, prolina, arginina, treonina, triptofana), dok sekundarna karbonilacija uključuje adiciju RCS (reaktivnih karbonilnih vrsta) na bočne ogranke cisteina, histidina i lizina. RCS-ovi su elektrofilni spojevi koji nastaju peroksidacijom PUFA-e, a

uključuju različite kemijske spojeve poput α,β -nezasićenih aldehida (akrolein), ketoaldehida, dialdehida (MDA, glioksal), izoketala i ciklopentanona (Tola i sur., 2021). Karbonilacija RCS-ovima povećava hidrofobnost proteina čime oni postaju skloniji agregaciji i posljedičnoj indukciji apoptoze (Tola i sur., 2021; Demidchik, 2015).

Modifikacije izazvane ROS-ovima dovode do povećanja hidrofilnosti bočnih ogranaka aminokiselina, fragmentacije bočnih ogranaka i okosnice, agregacije proteina te gubitka metaboličke, strukturne, transportne i regulacijske funkcije proteina (Davies, 2016; Demidchik, 2015). Premda karbonilacija dovodi do brojnih negativnih učinaka na karakteristike proteina, studije su uputile na važnost karbonilacije proteina u fiziološkim procesima (Tola i sur., 2021). Povećanje karbonilacije proteina povezano je s povećanjem stanične razine ROS-ova u uvjetima stresa, što karbonilirane proteine čini dobrim pokazateljem staničnog oksidativnog stresa.

1.2.4 Obrana biljke od oksidacijskog stresa

Kako bi se zaštitile od stresa i regulirale razinu ROS-ova, biljke su tijekom evolucije razvile kompleksni obrambeni sustav koji se sastoji od antioksidacijskih enzima i neenzimskih antioksidansa (Zhang i sur., 2016). Antioksidansi su molekule različitog porijekla koje u malim koncentracijama, u odnosu prema oksidansima, sprečavaju oksidacijski stres u stanicama i tkivima inhibicijom oksidacije i pretjerane produkcije ROS-ova (Meli i sur., 2020; Štefan i sur., 2007).

Neenzimski antioksidacijski sustav uključuje spojeve niske molekulske mase kao što su askorbinska kiselina (vitamin C), glutation (GSH), fenolni spojevi, karotenoidi, flavonoidi, alkaloidi, α -tokoferol (vitamin E) te slobodne aminokiseline (prolin, betain). U enzimski antioksidacijski sustav ubrajaju se enzimi superoksid dismutaza, katalaza, peroksidaze, askorbat peroksidaza, monodehidroaskorbat i dehidroaskorbat reduktaza, glutation-reduktaza, glutation transferaza, glutation-peroksidaza, polifenol oksidaza, peroksiredoksini te tioredoksin (Hasanuzzaman i sur., 2021). Glavni enzimski antioksidansi, koji pokazuju visoki afinitet prema specifičnim ROS-ovima, uključuju citosolnu, mitohondrijsku i kloroplastnu superoksid dismutazu, katalaze, peroksidaze, peroksiredoksine, tioredoksine i glutaredoksine, dok enzimi kao što su monodehidroaskorbat reduktaza, tioredoksin reduktaza, glutation-reduktaza i glutation-S-transferaza smanjuju razinu oksidiranih antioksidansa te održavaju funkciju antioksidacijskog sustava (Demidchik, 2015).

Osim toga, u obrani stanica važnu ulogu imaju tvari koje smanjuju katalitičku aktivnost prijelaznih metala, a to su metalotioneini, fitokelatini, pektini i drugi polisaharidi stanične stijenke te strukturni proteini. Zaštiti od stresa doprinosi i sinteza izoformnih proteina i lipida koji su manje osjetljivi na oksidaciju, ali i nakupljanje slojeva mrtvih stanica koji pružaju zaštitu od agresivnih tvari i infekcije (Demidchik, 2015).

1.2.5 Glutation

GSH je u vodi topljivi neenzimski antioksidans građen od glutamata, cisteina i glicina. Za biološku i biokemijsku aktivnost ovoga tripeptida odgovorna je tiolna skupina cisteina. Sintaza GSH odvija se u dva koraka koji su katalizirani enzimima γ -glutamylcistein sintetazom (γ -ECS) i glutathion sintazom (GSHS) (Hasanuzzaman i sur., 2017). Razlikuju se slobodni i molekularno vezani GSH. Slobodni glutathion postoji u dva oblika, oksidiranom i reduciranom. U reduciranom obliku GSH je monomer sa slobodnom sulfhidrilnom skupinom (-SH), a u oksidiranom stanju postoji kao disulfidni dimer (GSSG) (Dorion i sur., 2021). U odsutnosti stresa, ukupna koncentracija GSH je visoka i postiže milimolarne (mM) vrijednosti u gotovo svim staničnim odjeljcima pri čemu prevladava reducirani oblik (Dorion i sur., 2021; Hasanuzzaman i sur., 2017). Ravnotežu oksidiranog i reduciranog glutathiona održavaju enzimi glutathion-peroksidaza (GPx) i glutathion-reduktaza (GR), a vrlo je važan i askorbat-glutathionski ciklus (Dorion i sur., 2021). Omjer GSH/GSSG glavna je odrednica oksidativnog stresa (Birben i sur., 2012).

GSH postiže antioksidativni učinak na više načina. Igra važnu ulogu u regeneraciji drugih neenzimskih antioksidansa kao što su vitamin C i E (Birben i sur., 2012). GSH štiti stanice od oksidacijskog stresa direktnom reakcijom s NO , $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} , i ONOO^- (Aoyama, 2021). Uklanja vodikov peroksid i lipidne perokside djelovanjem GPx pri čemu GSH kao donor elektrona indirektno reducira H_2O_2 do H_2O i O_2 , a nastali se GSSG reducira djelovanjem GR uz utrošak NAD(P)H kao donora elektrona (Birben i sur., 2012). GSH je kofaktor glutathion-S-transferaze (GST) što ga čini važnim u detoksifikaciji elektrofilnih ksenobiotika (Aoyama, 2021).

Osim izravne i neizravne zaštite stanice od ROS-ova, GSH ima važnu ulogu u skladištenju i transportu reduciranog sumpora, u staničnoj signalizaciji i genskoj ekspresiji, rastu i razvoju biljaka u normalnim fiziološkim uvjetima, ali i u stanju stresa. Važan je čimbenik u razvoju tolerancije na abiotičke stresove te zaštiti stanice od teških metala i ksenobiotika (Hasanuzzaman i sur., 2017; Birben i sur., 2012).

2. Obrazloženje teme

BPA je sintetski organski spoj koji se koristi u proizvodnji polikarbonatne plastike, epoksidnih smola, termalnog papira, ambalaže za prehrambene proizvode i brojnih drugih komercijalnih proizvoda (Frankowski i sur., 2020). Zbog svoje masovne primjene BPA se nakuplja u okolišu te predstavlja veliki problem za okoliš, ali i za ljudsko zdravlje. Najznačajniji izvori izloženosti čovjeka BPA su prehrambeni proizvodi pakirani u plastičnu ili plastificiranu ambalažu (Janda i sur., 2021). Izloženost ljudi BPA povezana je s brojnim patološkim i patofiziološkim stanjima uključujući razvoj tumora, kardiovaskularne, metaboličke i neurorazvojne poremećaje, poremećaje imunskog sustava te neurodegenerativne bolesti (Rebolledo-Solleiro i sur., 2021). Kao mogući mehanizam djelovanja BPA utvrđen je njegov utjecaj na endokrini i reproduktivni sustav. Također, kao jedan od mogućih mehanizama toksičnosti BPA koji je zabilježen kod ljudi, životinja i biljaka izloženih BPA navodi se oksidacijski stres (Zaborowska i sur., 2021; Meli i sur., 2020).

Unazad nekoliko godina provedena su brojna istraživanja o toksičnosti i mehanizmima toksičnog učinka BPA na okoliš i čovjeka, no usprkos tome, djelovanje BPA je još uvijek nedovoljno istraženo, a mehanizmi toksičnosti nisu u potpunosti razjašnjeni. Stoga je cilj ovog diplomskog rada istražiti fitotoksični utjecaj BPA na korjenčićima luka (*A. cepa*) i parametre oksidacijskog stresa uz pretpostavku da će BPA inducirati proizvodnju ROS-ova koji će dovesti do oštećenja makromolekula (proteina i lipida) te promjene razine antioksidansa (GSH). U ovom istraživanju kao modelni organizam korišten je obični luk (*A. cepa*), kako zbog jednostavnosti u provođenju pokusa i visoke osjetljivosti, tako i zbog dobre korelacije s drugim testnim sustavima čime je omogućena ekstrapolacija dobivenih rezultata na čovjeka (Leme i Marin-Morales, 2009).

Istraživanje je provedeno tako što su korjenčići luka nakon dvodnevnog naklijavanja izloženi ili otopinama BPA koncentracijskog raspona 1-50 mg/l ili destiliranoj vodi (negativna kontrola). Nakon trodnevnog tretmana, izvagana je masa svježeg tkiva korjenčića te je pripremljen homogenat biljnog tkiva korjenčića u kojem su izmjereni sadržaj antioksidansa (GSH) te parametri oksidacijskog oštećenja proteina i lipida (sadržaj proteinskih karbonila i MDA).

3. Materijali i metode

3.1 Materijali

3.1.1 Kemikalije

U istraživanju su korištene sljedeće kemikalije:

- 2,4-dinitrofenilhidrazin, DNPH (Kemika, Zagreb, Hrvatska),
- 2-tiobarbituratna kiselina, TBA (Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD),
- 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeva kiselina), DTNB (Acros Organics, Geel, Belgija),
- 96 % etanol (Lach-Ner, Češka),
- bisfenol A, BPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD),
- dikalijev hidrogenfosfat, K_2HPO_4 (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- etilacetat (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD),
- etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA (Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD),
- kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4 (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- klorovodična kiselina, HCl (Kemika, Zagreb, Hrvatska),
- trikloroctena kiselina, TCA (Kemika, Zagreb, Hrvatska),
- urea (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD).

Sve kemikalije korištene u ovom istraživanju bile su *pro analysi* čistoće. Za pripremu otopina korištena je destilirana voda.

3.1.2 Oprema

U ovom istraživanju korištena je sljedeća oprema:

- analitička vaga, PB303 Delta Range (Mettler Toledo, Columbus, SAD)
- centrifuga, Frontier 5706 (Ohaus, Greifensee, Švicarska),
- magnetski miješać s grijačem, MSH-A (Witeg, Wertheim, Njemačka)
- miješalica, Vortex-Heidolph model REAX top (Heidolph Instruments, Schwabach,
- mikropipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)
- pH metar, HI 9025 (Hanna instruments, Woonsocket, SAD),
- termostat, TMA (Termo-medicinski aparati, Dugo selo, Hrvatska),
- UV-VIS spektrofotometar T70 (PG Instruments Ltd, Lutterworth, UK),
- kiveta, Open-top UV-quartz cell (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD).

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

3.1.3 Biljni model – obični luk (*Allium cepa* L.)

Obični luk (*Allium cepa* L.) je dvogodišnja zeljasta jednosupnica iz porodice *Amaryllidaceae* (www.plantea.com.hr). Porijeklom iz jugozapadne Azije, luk je jedna od najčešće konzumiranih i uzgojenih kultura s velikom komercijalnom vrijednosti (Dorrigiv i sur., 2021; Teshika i sur., 2019). Svojim karakterističnim mirisom, okusom i aromom ključan je začim u mnogim jelima. Ovisno o boji, razlikujemo crveni, ljubičasti, žuti i bijeli luk, a na temelju okusa razlikujemo sladak i nesladak (Sagar i sur., 2022; Kianian i sur., 2021). Za osebujan okus i miris te boju odgovorni su organosumporni spojevi i flavonoidi (Sagar i sur., 2022; Teshika i sur., 2019). Luk se u prehrani koristi u raznim oblicima, uključujući svježi sok, sirove lukovice, pržen ili pečen, ali i sušen, dehidriran. Osim kulinarskog značaja, luk se ističe svojim ljekovitim svojstvima. Tradicionalno se koristi za liječenje različitih bolesti kao što su astma, kašalj uzrokovan bronhitisom, ulkusne rane, keloidi, bol i oteklina nakon uboda, upalnih poremećaja te dizenterije (Kianian i sur., 2021). Istraživanja su pokazala brojne farmakološke učinke luka, uključujući hipoglikemijsko, hipolipemijsko, antiagregacijsko, neuroprotektivno, antisklerotsko, antikonvulzivno, antihipertenzivno, diuretičko i hepatoprotektivno djelovanje (Kianian i sur., 2021). Isto tako, luk je pokazao antioksidativna, protuupalna, antikancerogena i imunoprotektivna svojstva, antiastmatičke, antimikrobne i analgetske učinke te pozitivne učinke na sniženje mokraćne kiseline u krvi (Sagar i sur., 2022; Dorrigiv i sur., 2021; Teshika i sur., 2019). Za farmakološke učinke luka odgovorne su brojne fitomolekule među kojima su eterična ulja, tiocijanat, vlakna, tiopropionat aldehid, fitoestrogeni, vitamini, minerali, lektin, flavonoidi, organosumporni spojevi i alicin, fenolni spojevi, lipofilni antioksidansi, antocijani, saponini i fistulozin (Kianian i sur., 2021; Teshika i sur., 2019). Izraziti antioksidativni učinak pokazali su flavonoidi i organosumporni spojevi.

Luk je pogodan modelni organizam zbog jednostavnog načina čuvanja i rukovanja te niske cijene (Fiskesjö, 1985). Luk kao testni sustav (test se još i naziva *Allium* test) je pokazao visoku osjetljivost i dobru korelaciju s drugim testnim sustavima kao što su sisavci, alge i ljudski limfociti što omogućuje ekstrapolaciju rezultata dobivenih *Allium* testom na životinjske vrste te na čovjeka (Leme i Marin-Morales, 2009). U *Allium* testu korijenje luka raste u izravnom kontaktu s ispitivanim spojem što ga čini izvrsnim *in vivo* modelom za analizu

citotoksičnosti i genotoksičnosti pri različitim koncentracijama i vremenima (Tedesco i Laughinghouse, 2012).

U ovom je istraživanju kao modelni organizam korišten luk sorte Argentea koji za Hrvatsku distribuira Planta Prelesje d.o.o (slika 4).



Slika 4. Obični luk (*Allium cepa* L.) sorte Argentea (preuzeto s url: http://www.planta-prelesje.si/shop/product.php?id_product=153 i prilagođeno)

3.2 Metode

3.2.1 Biološki pokus

Priprema otopina BPA

Za pripremu matične otopine izvagano je 2,0 g krutog BPA koji se prebacio u odmjernu tikvicu od 10 ml. S obzirom da BPA nije topljiv u vodi, otopljen je u 96 %-tnom etanolu uz zagrijavanje na grijaćoj ploči. Nakon potpunog otapanja BPA, odmijerna tikvica je nadopunjena etanolom do oznake s 96 % etanolom. Tako pripremljena otopina BPA ima koncentraciju 2×10^5 mg/l, odnosno 200 g/l.

Iz matične otopine BPA pripremljene su radne otopine u koncentracijama 1 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l i 50 mg/l. Radne otopine pripremljene su razrjeđivanjem matične otopine destiliranom vodom prema formuli:

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

Tako je za pripremu 250 ml (V_2) radne otopine koncentracije 5 mg/l (c_2) uzet alikvot (V_1) od 6,25 μ l matične otopine koncentracije 2×10^5 mg/l (c_1). Volumeni matične otopine potrebni za izradu 250 ml radne otopine željene koncentracije BPA prikazani su u tablici 1.

Tablica 1. Priprema radnih otopina BPA iz matične otopine BPA koncentracije 2×10^5 mg/l

Koncentracija radne otopine BPA (mg/l)	Volumen matične otopine BPA koncentracije 2×10^5 mg/l (μ l)
1	1,25
5	6,25
10	12,5
25	31,25
50	62,5

Priprema otopine kontrole

Za pripremu otopine negativne kontrole u odmjernu tikvicu od 250 ml dodano je 62,5 μ l 96 %-tnog etanola i razrijeđeno je destiliranom vodom do oznake. Dodani volumen etanola odgovara volumenu etanola u radnoj otopini BPA koncentracije 50 mg/l. Dodatkom etanola isključuje se mogući učinak etanola na korjenčiće običnog luka.

Provođenje biološkog pokusa

Za provođenje biološkog pokusa odabrane su lukovice luka podjednake veličine bez naznake truljenja, plijesni, zelenih listova i sušenja. Lukovice su nakon uklanjanja osušenih korjenčića s baze i vanjskih ljusaka koje su se počele ljuštiti stavljene na dvodnevno naklijavanje u epruvete ispunjene destiliranom vodom. Lukovice su postavljene na vrh staklene epruvete bazom uronjene u destiliranu vodu (slika 5). Tako pripremljene epruvete su ostavljene dva dana na mjestu zaštićenom od izravnog sunčevog zračenja pri temperaturi od oko 20 °C.



Slika 5. Lukovice luka na početku dvodnevnog naklijavanja u destiliranoj vodi

Nakon dvodnevnog naklijavanja korjenčići lukovica postavljeni su na trodnevni tretman. Odabrane su one lukovice koje su proklijale i imale pravilno korijenje. Lukovice s iznimno kratkim i dugim korijenjem nisu uključene u pokus. Za tretman, lukovice su nasumično podijeljene u 6 skupina od po 10 lukovica (n=10). Lukovice su prebačene u epruvete ispunjene pripremljenim otopinama BPA koncentracijskog raspona 1-50 mg/l ili otopinom negativne kontrole (destilirana voda) te stavljene na mjesto zaštićeno od izravnog sunčevog zračenja na temperaturi od oko 20 °C.

3.2.2 Određivanje mase svježeg tkiva korjenčića

Nakon trodnevnog tretmana destiliranom vodom (negativna kontrola) ili otopinama BPA (koncentracijski raspon 1-50 mg/l) izvagana je masa korjenčića svake lukovice. Vaganje je provedeno na način da se jedna po jedna lukovica izvadila iz epruvete te korjenčići osušili papirnatim ručnikom kako bi se izbjeglo povećanje mase zbog zaostale otopine. Nakon uklanjanja viška otopine korjenčići pojedine lukovice su odvojeni pomoću skalpela i izvagani. Postupak je ponovljen za svaku lukovicu iz svih 6 skupina lukovica.

3.2.3 Priprema homogenata biljnog tkiva

Za pripremu 5 %-tne otopine TCA potrebne za pripremu homogenata, izvagano je 10,0 g TCA koja je kvantitativno prenesena u odmjernu tikvicu od 200 ml, a tikvica je potom nadopunjena do oznake destiliranom vodom.

Za pripremu homogenata biljnog tkiva izvagani korjenčići prebačeni su u tarionik u koji je dodan odgovarajući volumen 5 %-tne otopine TCA. Tako je za izvaganih 347 mg korjenčića luka potrebno 1,74 ml 5 %-tne otopine TCA. Biljno tkivo je homogenizirano mehanički korištenjem tučka. Homogenat je prebačen u Falcon epruvetu za centrifugu, a tarionik je ispran ostatkom volumena 5 %-tne otopine TCA. Homogenat korjenčića lukovica je potom centrifugiran 10 minuta na 7000 RPM-a kako bi se dobio što čišći i bistriji supernatant u kojemu se kasnije određuju biokemijski parametri oksidacijskog stresa (MDA i GSH).

3.2.4 Određivanje sadržaja GSH

Princip metode

Određivanje sadržaja GSH u uzorku temelji se na reakciji tiolne skupine GSH, ali i drugih neproteinskih tiola s kromogenom 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzojevom kiselinom, poznatijom kao Ellmanov reagens (Eyer i sur., 2003). U reakciji, tiolna skupina stehiometrijski reducira disulfidnu vezu Ellmanovog reagensa te nastaju 2-nitro-5-merkaptobenzojeva kiselina (TNB) i miješani disulfidi. Pri neutralnim i blago alkalnim uvjetima TNB prelazi u žuto obojeni anionski oblik TNB^{2-} čiji se intenzitet mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini apsorpcijskog maksimuma od 412 nm prema slijepoj probi (Sonia i Sharma, 2014). Mjerenjem apsorpcije žuto obojenog uzorka indirektno dobivamo informacije o koncentraciji GSH. Sadržaj GSH u uzorku određuje se pomoću Beer-Lambertova zakona i poznavanja molarnog apsorpcijskog (ekstinkcijskog) koeficijenta TNB-a ($14,15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Priprema 1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7,4

1 M kalij-fosfatni pufer pH 7,4 dobiven je miješanjem 1 M otopina KH_2PO_4 i KH_2HPO_4 . Za pripremu 1 M otopina KH_2PO_4 i KH_2HPO_4 potrebno je izračunati masu tvari primjenom jednadžbe za množinu tvari ($n = m/M$; n – množina tvari, m – masa tvari, M – molarna masa), a molarna masa tvari (M) se računa korištenjem periodnog sustava elemenata. Tako je za pripremu 1M otopine KH_2HPO_4 , prema izračunatoj vrijednosti, izvagano 17,418 g krute tvari koja je kvantitativno prenijeta u odmjernu tikvicu od 100 ml koja je nadopunjena do oznake destiliranom vodom. Isti postupak je ponovljen za izradu 1M otopine KH_2PO_4 samo što je prema izračunu potrebno izvagati 13,609 g krutine.

Za pripremu puferske otopine pH 7,4 pomiješane su 1 M otopine KH_2PO_4 i KH_2HPO_4 , a uz pomoć pH-metra postignuta je željena pH-vrijednost. U 100 ml priređene otopine pufera dodano je 0,0037 g etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) čime je postignuti molaritet EDTA u otopini od 0,1 mM. Izvagana količina EDTA koja se dodala u puferisku otopinu određena je korištenjem jednadžbe za množinu. EDTA ima ulogu kelatora metala te na taj način sprečava autooksidaciju GSH u uzorku, dok kalij-fosfatni pufer ima ulogu otapala i medija za izvođenje pokusa pri stalnom pH.

Priprema 1 mM otopine DTNB-a

Za pripremu 1 mM otopine DTNB-a koja se koristila kao reagens za dokazivanje GSH prvotno je priređena 10 mM otopina vaganjem 0,0396 g DTNB-a. Krutina je kvantitativno

prenesena u odmjernu tikvicu od 10 ml koja je potom nadopunjena do oznake 1 M otopinom kalij-fosfatnog pufera pH 7,4. Pripremljena je otopina potom razrijeđena 10 puta do konačne koncentracije DTNB od 1 mM. Navedenim postupkom, prvotnim priređivanjem koncentriranije otopine te njezinim razrjeđivanjem, postignuta je veća preciznost odvage.

Postupak izvođenja mjerenja

Nakon centrifugiranja homogenata biljnog tkiva, opisano u poglavlju 3.2.3, u supernatantu homogenata korjenčića određen je sadržaj GSH. Postupak određivanja je shematski prikazan u tablici 2.

Tablica 2. Shematski prikaz postupka određivanja GSH

SLIJEPA PROBA	UZORAK
100 μ l 5 % TCA + 900 μ l 1 mM DTNB	100 μ l supernatanta homogenata + 900 μ l 1 mM DTNB
Inkubacija 15 minuta pri sobnoj temperaturi.	
Mjerenje apsorbancije na valnoj duljini od 412 nm.	

Sadržaj GSH izračunat je poznavanjem molarnog apsorpcijskog koeficijenta TNB-a iz jednadžbe za Beer-Lambertov zakon:

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

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

gdje je:

ΔA – razlika izmjerene apsorbancije uzorka i slijepe probe pri 412 nm

ε – apsorpcijski koeficijent (14,15 mM⁻¹ cm⁻¹)

l – dužina optičkog puta (1 cm).

3.2.5 Određivanje sadržaja MDA

Princip metode

Određivanje sadržaja MDA kao pokazatelja lipidne peroksidacije temelji se na reakciji kondenzacije dvije molekule TBA s jednom molekulom MDA (Khoubnasabjafari i sur., 2015). Reakcija se odvija u kiselim uvjetima pri povišenoj temperaturi, a kao produkt nastaje adukt Schiffove baze (TBA₂-MDA adukt) crvenog obojenja čiji se intenzitet obojenja mjeri spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 532 nm (Weitner i sur., 2016). Sadržaj MDA u uzorku se može izračunati pomoću Beer-Lambertova zakona i poznavanjem ekstincijskog koeficijenta ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Priprema 0,6 % otopine TBA

Za pripremu 0,6 %-tne otopine TBA na analitičkoj vagi se odvaži 0,6 g krute TBA koja se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 ml i nadopuni do oznake destiliranom vodom. Otapanje je potaknuto zagrijavanjem na grijaču uz miješanje. Priređena otopina 0,6 %-tne TBA korištena je kao reagens u određivanju MDA.

Postupak izvođenja mjerenja

Nakon centrifugiranja homogenata biljnog tkiva, opisano u poglavlju 3.2.3, u supernatantu homogenata korjenčića određen je sadržaj MDA. Tablica 3 shematski prikazuje postupak određivanja MDA.

Tablica 3. Shematski prikaz postupka određivanja MDA

SLIJEPA PROBA	UZORAK
200 μl destilirane vode + 800 μl 0,6 % TBA	200 μl supernatanta homogenata + 800 μl 0,6 % TBA
Zagrijavanje 30 minuta na 90 °C.	
Zaustavljanje reakcije naglim hlađenjem na ledu.	
Centrifugiranje na 7000 RPM-a 10 minuta.	
Mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini od 532 nm.	

Sadržaj MDA u uzorcima izračunat je pomoću jednadžbe za Beer-Lambertov zakon uz poznati molarni ekstinkcijski koeficijent nastalog TBA₂-MDA adukta:

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

gdje je:

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

ε – molarni ekstinkcijski koeficijent (155 mM⁻¹cm⁻¹)

l – dužina optičkog puta (1 cm).

3.2.6 Određivanje sadržaja oksidiranih proteina

Princip metode

Određivanje sadržaja proteinskih karbonila temelji se na spektrofotometrijskoj metodi prema Leavine i sur. (1990) koja se zasniva na derivatizaciji karbonilnih skupina proteina s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) pri čemu nastaje stabilni 2,4-dinitrofenilhidrazonski (DNP) produkt žutog obojenja. Intenzitet obojenja nastalog DNP adukta mjeri se spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 370 nm (Purdel i sur., 2014), a sadržaj oksidiranih proteina se izračuna pomoću Beer-Lambertove jednadžbe i poznatog ekstinkcijskog koeficijenta čija je vrijednost 22 mM⁻¹ cm⁻¹.

Priprema 10 % TCA

Za pripremu 10 %-tne otopine TCA na analitičkoj vagi je izvagano 10 g krute TCA koja je kvantitativno prenijeta u odmjernu tikvicu od 100 ml te nadopunjena destiliranom vodom do oznake. Pripremljena otopina služi za taloženje proteina u slijepoj probi i uzorcima.

Priprema 2 N HCl

Za pripremu 2 N otopine klorovodične kiseline 17 ml 36,5 %-tne HCl je razrijeđeno destiliranom vodom u odmjenoj tikvici od 100 ml. Dobivena otopina služi za pripremu reagensa (0,2 % 2,4-DNPH).

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

Reagens je pripremljen vaganjem i kvantitativnim prenošenjem 0,2 g krutog 2,4-DNPH u odmjernu tikvicu od 100 ml. Tikvica je nadopunjena do oznake prethodno pripremljenim 2 N HCl.

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

Za pripremu otopine etanola i etil-acetata (1:1) u menzuri je izmjeren jednak volumen pojedinog otapala, 50 ml etanola i 50 ml etil-acetata, koja se potom miješaju staklenim štapićem u čaši od 150 ml. Pripremljena smjesa otapala služila je za ispiranje nevezanog reagensa (DNPH).

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

Prvotno je priređen kalij-fosfatni pufer otapanjem 0,1361 g krutog KH_2PO_4 u 40 ml destilirane vode u odmjernoj tikvici od 50 ml. U tikvicu je potom dodano i otopljeno 18,02 g uree, a tikvica je nadopunjena do oznake destiliranom vodom. Otopina 6 M uree u kalij-fosfatnom puferu pH 2,4 je korištena za otapanje proteinskog taloga uzorka i slijepe probe.

Postupak izvođenja mjerenja

Za svaki su uzorak priređene tri epruvete, jedna za slijepu probu te dvije za duplikat uzorka u kojima se odvija reakcija s DNPH. U određivanju sadržaja proteinskih karbonila korišten je talog homogenata biljnog tkiva dobivenog nakon centrifugiranja (postupak opisan u poglavlju 3.2.3.). Talog je prije samog izvođenja pokusa razrijeđen 5 %-tnom trikloroocetnom kiselinom. U odmrznute taloge homogenata biljnog tkiva dodano je po 5 ml 5 %-tne TCA. Postupak određivanja sadržaja oksidiranih proteina prikazan je shematski u tablici 4.

Tablica 4. Shematski prikaz postupka određivanja proteinskih karbonila

SLIJEPA PROBA	UZORAK 1	UZORAK 2
500 μl uzorka (razrijeđenog taloga homogenata) + 500 μl 10% TCA		
Miješanje na Vortex miješalici.		
Centrifugiranje 15 minuta na 15000 RPM.		
Dekantiranje supernatanta.		
talog + 300 μl 2 N HCl	talog + 300 μl 0,2% 2,4-DNPH u 2 N HCl	

Miješanje na Vortex miješalici.
Stajanje reakcijske smjese 1 sat sklonjeno od svjetlosti.
Miješanje na Vortex miješalici.
Reakcijska smjesa + 200 µl 10 % TCA
Miješanje na Vortex miješalici.
Centrifugiranje 15 minuta na 15000 RPM.
Dekantiranje supernatanta.
Talog + 500 µl etanol:etil-acetat (1:1)
Miješanje na Vortex miješalici.
Centrifugiranje 10 min na 15000 RPM.
Dekantiranje supernatanta.
Ponoviti ispiranje taloga 2 puta.
Talog + 2 ml 6 M uree u K-fosfatnom puferu pH 2,4
Miješanje na Vortex miješalici.
Otapanje taloga tijekom noći.
Miješanje na Vortex miješalici.
Centrifugiranje 10 minuta pri 15000 RPM.
Mjerenje apsorbancije pri valnoj duljini od 370 nm.

Sadržaj oksidiranih proteina određen je pomoću Beer-Lambertova zakona uz poznavanje ekstinkcijskog koeficijenta za hidrazonski produkt:

$$\text{Sadržaj proteinskih karbonila} = \frac{A_{370}}{\varepsilon \times l} [\mu\text{M}]$$

gdje je:

A – apsorbancija uzorka na 370 nm

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

l – dužina optičkog puta (1 cm).

3.3 Statistička obrada rezultata

Modelni organizam, obični luk, tretiran je u 10 replika po tretmanu: negativna kontrola (destilirana voda) i test-otopine BPA koncentracijskog raspona 1-50 mg/l. Biokemijski parametri (GSH, MDA i oksidirani proteini) su za svaku repliku izmjereni u duplikatu. Rezultati mase svježeg tkiva kao i biokemijskih parametara (GSH, MDA i oksidirani proteini) za svaki tretman prikazani su kao srednja vrijednost 10 replika \pm standardna devijacija. Za statističku obradu podataka korišten je računalni program *Excel (MS Office)* u kojem je korištenjem studentovog t-testa napravljena usporedba dobivenih rezultata između tretmana destiliranom vodom (negativna kontrola) i tretmana otopinama BPA koncentracijskog raspona 1-50 mg/l. Kao statistički značajna razlika postavljena je vrijednost $P \leq 0,05$.

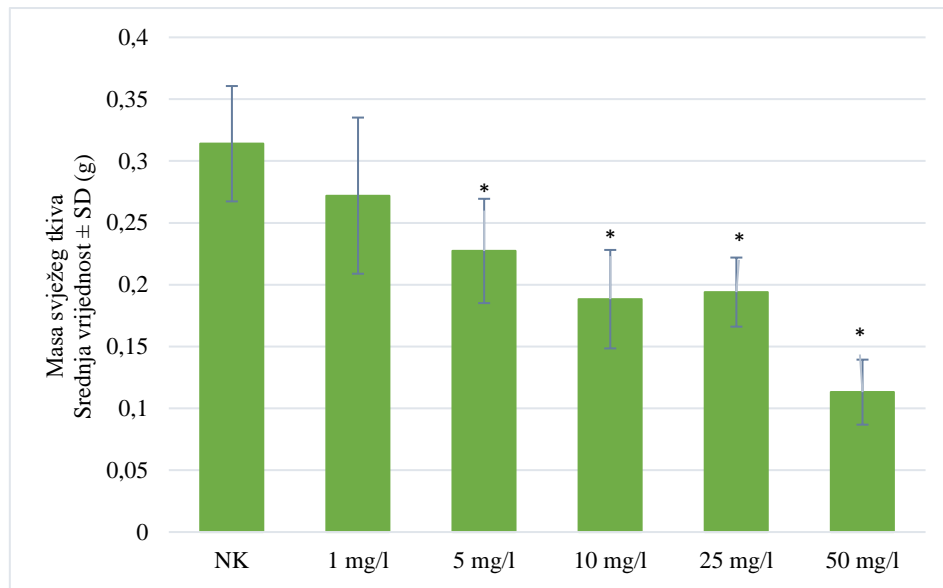
4. Rezultati i rasprava

U ovom diplomskom radu istražena je fitotoksičnost i oksidacijski stres kao mogući mehanizam toksičnosti BPA provođenjem *Allium* testa. Nakon dvodnevnog naklijavanja, korjenčići lukovica običnog luka (n=10) bili su izloženi tri dana otopinama BPA koncentracijskog raspona 1-50 mg/l ili destiliranoj vodi (negativna kontrola). Nakon trodnevne izloženosti korjenčića BPA za utvrđivanje fitotoksičnosti BPA izvagana je masa svježeg tkiva korjenčića, a u homogenatu svježeg biljnog tkiva korjenčića izmjeren je sadržaj biokemijskih parametara (GSH, MDA, oksidirani proteini) u svrhu utvrđivanja oksidacijskog stresa kao mogućeg mehanizma toksičnosti BPA.

4.1 Masa svježeg tkiva korjenčića

Nakon trodnevnog tretmana destiliranom vodom (negativna kontrola) ili otopinama BPA koncentracijskog raspona 1-50 mg/l, korjenčići su odvojeni od lukovice te je izvagana masa svježeg tkiva korjenčića. Uz postotak klijavosti sjemena, duljinu i težinu izdanka, broja i površine listova te broja, duljine i promjera korijena, masa svježeg tkiva korijena jedan je od značajnijih parametara rasta biljaka (Pandey i sur., 2017). Stoga mjerenje mase svježeg tkiva korjenčića luka predstavlja važan izvor podataka za procjenu toksičnosti nekog spoja. Rezultati odvaganih masa svježeg tkiva korjenčića prikazani su na slici 6.

Iz dobivenih rezultata se može iščitati pad mase svježeg tkiva korjenčića izloženih otopinama BPA u odnosu na negativnu kontrolu (destiliranu vodu) koja predstavlja normalne fiziološke uvjete rasta lukovica (Sacramento i sur., 2020; Fiskesjö, 1985). Masa svježeg tkiva korjenčića luka nakon trodnevne izloženosti otopini BPA koncentracije 1 mg/l iznosila je $0,272 \pm 0,063$ g što je niže od mase negativne kontrolne skupine $0,314 \pm 0,047$ g, ali nije statistički značajno ($P=0,238$). Statistički značajno smanjenje mase svježeg biljnog tkiva korjenčića ($P < 0,05$) u odnosu na negativnu kontrolu uočava se nakon izloženosti lukovica otopini BPA koncentracije 5 mg/l gdje je masa svježeg tkiva korjenčića iznosila $0,227 \pm 0,042$ g. Značajno smanjenje mase svježeg tkiva korjenčića može se uočiti i kod tretmana otopina BPA koncentracije 10 i 25 mg/l, no najveći pad mase svježeg tkiva korjenčića u odnosu na negativnu kontrolu zabilježen je nakon tretmana lukovica otopinom BPA koncentracije 50 mg/l pri čemu je masa iznosila svega $0,113 \pm 0,026$ g.



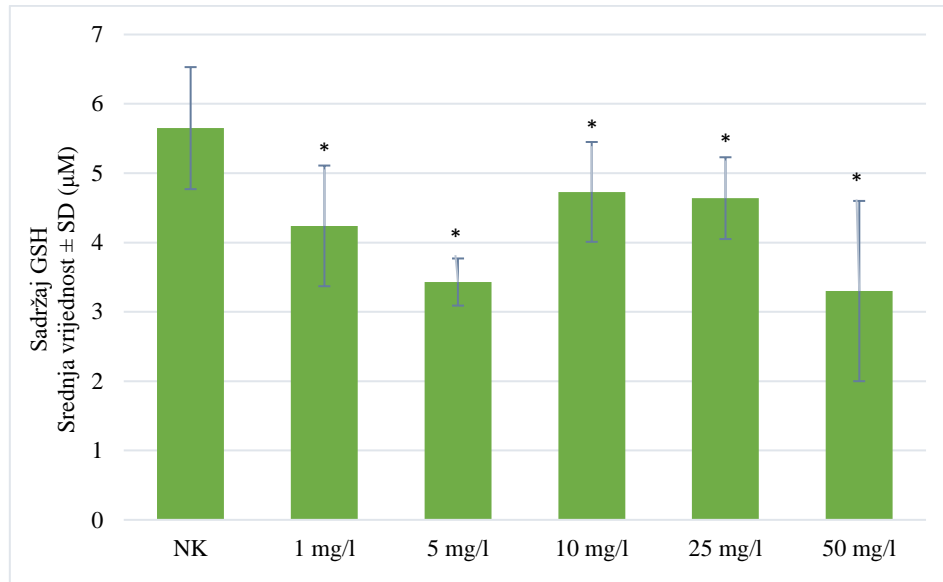
Slika 6. Masa svježeg tkiva korjenčića luka nakon trodnevnog tretmana otopinama BPA u rasponu koncentracija 1-50 mg/l; NK - negativna kontrola (korjenčići izložene destiliranoj vodi); * - statistički značajno različito od kontrole, $P \leq 0,05$

4.2 GSH

GSH je tripeptidni tiolni spoj niske molekulske mase koji pripada skupini neenzimskih antioksidansa. GSH je važan u izravnoj i neizravnoj zaštiti stanice od ROS-ova. Izloženost biotskom i abiotskom stresu ima snažan učinak na oksidacijsko stanje GSH, ali i na koncentraciju GSH u biljnoj stanici (Dorion i sur., 2021). Iako oksidacijsko stanje i koncentracija GSH nisu nužno zavisni, izloženost biljnog organizma oksidacijskom stresu dovodi do povećane potrošnje GSH i stvaranja GSSG, što predstavlja pozitivan signal za *de novo* sintezu GSH (Dorion i sur., 2021). Rezultati dobiveni mjerenjem sadržaja GSH u supernatantu homogenata svježeg tkiva korjenčića luka nakon trodnevne izloženosti BPA prikazani su na slici 7.

Nakon trodnevnog tretmana otopinama BPA nižih koncentracija (1 mg/l i 5 mg/l) sadržaj GSH se statistički značajno smanjio u odnosu na negativnu kontrolu ($4,24 \pm 0,87 \mu\text{M}$ i $3,43 \pm 0,36 \mu\text{M}$ vs. $5,65 \pm 0,88 \mu\text{M}$) koja predstavlja normalne fiziološke uvjete rasta biljke. Nakon izloženosti korjenčića otopinama BPA koncentracije 10 mg/l i 25 mg/l došlo je do povećanja sadržaja GSH u odnosu na niže koncentracije BPA, ali je sadržaj GSH i dalje značajno niži od koncentracije GSH negativne kontrole (destilirana voda). Nadalje, znatno smanjenje koncentracije GSH zabilježeno je i pri trodnevnom tretmanu otopinom BPA koncentracije 50 mg/l, a iznosilo je $3,30 \pm 1,3 \mu\text{M}$. Prvotno smanjenje sadržaja GSH ukazuje

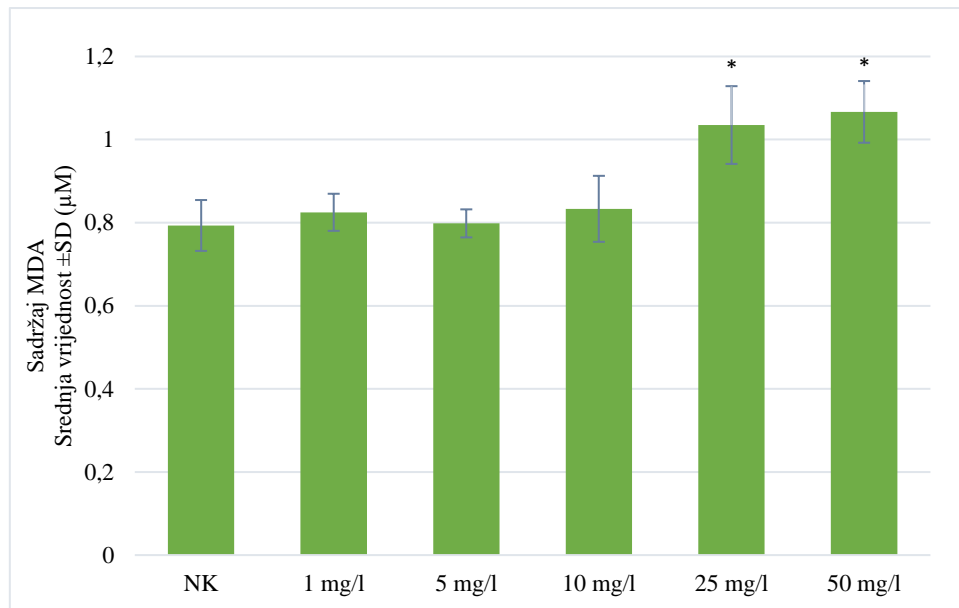
na trošenje zalihe antioksidansa u prvoj fazi stresa, dok povećanje koncentracije GSH tijekom druge faze (iako još uvijek ispod kontrolne vrijednosti) upućuje na *de novo* sintezu GSH kako bi se biljka obranila od oksidacijskog stresa i oštećenja izazvanih njime.



Slika 7. Sadržaj GSH u supernatantu homogenata korjenčića luka nakon trodnevnog tretmana otopinama BPA u rasponu koncentracija 1-50 mg/l; NK - negativna kontrola (korjenčići izložene destiliranoj vodi); * - statistički značajno različito od kontrole, $P \leq 0,05$

4.3 MDA

Tijekom lipidne peroksidacije nastaju brojni nestabilni produkti koji stupaju u interakciju s proteinima i nukleinskim kiselinama čime dovode do oštećenja stanice. Jedan od tih spojeva je i MDA (Štefan i sur., 2007). MDA je najviše proučavani produkt peroksidacije lipida koji se ujedno koristi kao biomarker u kvantifikaciji iste te ukazuje na izloženost organizma oksidacijskom stresu (Khoubnasabjafari i sur., 2015). Dobiveni rezultati mjerenja sadržaja MDA u supernatantu homogenata svježeg tkiva korjenčića luka nakon trodnevnog tretmana prikazani su na slici 8.



Slika 8. Sadržaj MDA u supernatantu homogenata korjenčića luka nakon trodnevnog tretmana otopinama BPA u rasponu koncentracija 1-50 mg/l; NK - negativna kontrola (korjenčići izložene destiliranoj vodi); * - statistički značajno različito od kontrole, $P \leq 0,05$

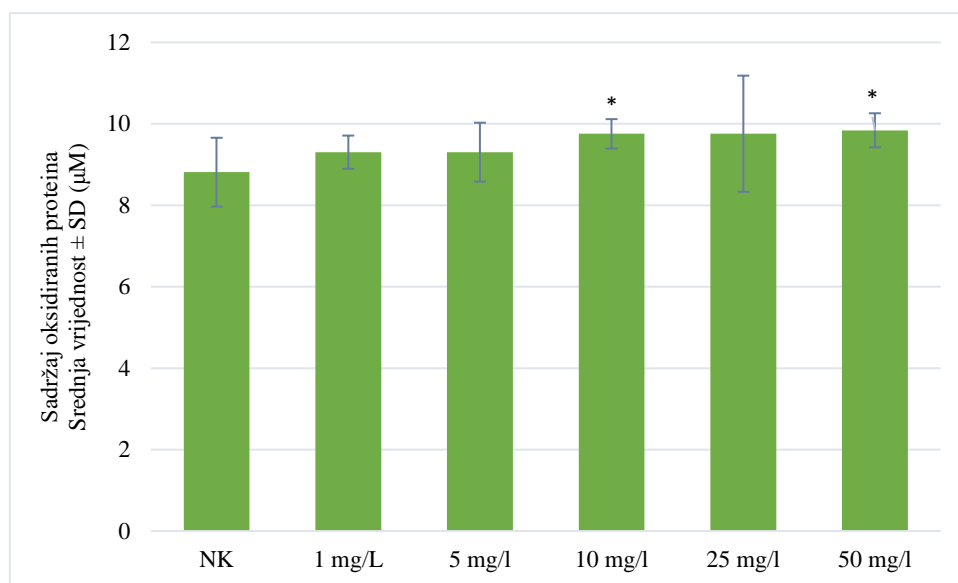
Kako je vidljivo na slici 8, s povećanjem koncentracije otopine BPA, povećava se sadržaj MDA u odnosu na negativnu kontrolu (destiliranu vodu). Pri izloženosti korjenčića nižim koncentracijama otopine BPA (1-10 mg/l) povećanje sadržaja MDA u odnosu na negativnu kontrolu ($0,793 \pm 0,061 \mu\text{M}$) nije statistički značajno. Nakon trodnevnog tretmana, statistički značajno povećanje MDA je zabilježeno pri izloženosti korjenčića otopinama BPA koncentracije 25 mg/l i 50 mg/l, a sadržaj MDA je iznosio $1,035 \pm 0,093 \mu\text{M}$ i $1,067 \pm 0,074 \mu\text{M}$ ($P < 0,05$). Povećanje sadržaja MDA kao biomarkera lipidne peroksidacije upućuje na to da je u korjenčićima luka došlo do oštećenja stanične membrane uslijed izloženosti oksidacijskom stresu pri čemu su PUFA razgrađene do toksičnih produkata među kojima je i MDA.

4.4 Oksidirani proteini

Karbonilacija predstavlja najčešću nepovratnu PTM proteina koja rezultira promjenom u strukturi, a time i funkciji proteina te patofiziološkim učincima (Tola i sur.,2021; Demidchik, 2015). Mjerenje proteinskih karbonila jedna je od najčešće korištenih metoda za određivanje oksidacijskog oštećenja proteina pri čemu je povećanje sadržaja proteinskih karbonila povezano s povećanom izloženosti stanica oksidacijskom stresu (Tola i sur., 2021; Davies,

2016). Rezultati mjerenja sadržaja proteinskih karbonila u uzorcima nakon trodnevne izloženosti prikazani su na slici 9.

Najniži sadržaj proteinskih karbonila zabilježen je kod trodnevne izloženosti korjenčića negativnoj kontroli (destilirana voda), a iznosio je $8,813 \pm 0,845 \mu\text{M}$. Iz prikazanih rezultata vidljivo je da je povećanjem koncentracije BPA u otopini kojoj su izloženi korjenčići tijekom tri dana, rastao i sadržaj oksidiranih proteina. Statistički značajan porast sadržaja zabilježen je kod izloženosti korjenčića otopini BPA koncentracije 10 mg/l i 50 mg/l pri čemu je sadržaj proteinskih karbonila iznosio $9,755 \pm 0,360 \mu\text{M}$ ($P = 0,005$) i $9,841 \pm 0,418 \mu\text{M}$ ($P = 0,003$). Dobiveni rezultati upućuju na povećanje oksidativnog oštećenja proteina uslijed tretmana korjenčića otopinama BPA različitih koncentracija. Također, može se primijetiti da je sadržaj proteinskih karbonila u korjenčićima luka porastao nakon izloženosti otopini BPA koncentracije 10 mg/l, dok je sadržaj MDA porastao tek nakon izloženosti otopini BPA koncentracije 25 mg/l.



Slika 9. Sadržaj oksidiranih proteina u homogenatu korjenčića luka nakon trodnevnog tretmana otopinama BPA u rasponu koncentracija 1-50 mg/l; NK - negativna kontrola (korjenčići izložene destiliranoj vodi); * - statistički značajno različito od kontrole, $P \leq 0,05$

Brojna istraživanja pokazala su da fitotoksični učinak BPA znatno ovisi o dozi, ali i o vremenu izloženosti. Tako je u istraživanju koje su proveli Ferrara i sur. (2006) uočeno da izloženost otopinama BPA koncentracije 10 i 50 mg/l tijekom 6 dana nije pokazala značajan utjecaj na klijavost te duljinu korijena i izdanka, dok je nakon 21-dnevne izloženosti zabilježen

značajan utjecaj na morfologiju, duljinu te masu svježeg i suhog tkiva korijena i izdanka rajčice (*Solanum lycopersicum* L.), durum pšenice (*Triticum durum* Desf.) i salate (*Lactuca sativa* L.), ali ne i boba (*Vicia faba* L.). U ovom je istraživanju BPA imao fitotoksični učinak na korijenčiće luka već u koncentraciji 5 mg/l nakon trodnevne izloženosti te se može zaključiti da je luk puno osjetljiviji modelni organizam za istraživanje od rajčice, durum pšenice, salate i boba. To dodatno potvrđuje da se dobiveni rezultati istraživanja koja se provode na luku mogu ekstrapolirati na čovjeka. U istraživanju koje su proveli Pan i sur. (2013) niže koncentracije BPA (1 – 5 μ M; što odgovara 0,23 – 1,14 mg/l) dovele su do povećanja duljine korijena, mase svježeg tkiva te formiranja bočnog korijenja sadnica *Arabidopsis thaliana*, a više koncentracije (10 – 25 μ M; što odgovara 2,28 – 5,71 mg/l) su pokazale inhibitorni učinak. Slični su rezultati dobiveni u istraživanju koje su proveli Qin i sur. (2013) na klijanicama soje. Bahmani i sur. (2019) su zabilježili smanjenje mase svježeg tkiva i duljine glavnog korijena vrste *A. thaliana* pri izloženosti BPA u koncentraciji 10 ppm (10 mg/l).

U normalnim fiziološkim uvjetima proizvodnja i uklanjanje ROS-ova je u dinamičkoj ravnoteži. U nepovoljnim uvjetima, djelovanjem biotičkih i abiotičkih čimbenika različitim mehanizmima, povećano se stvaraju ROS-ovi i poremećeni je rad antioksidacijskog sustava čime je ravnoteža narušena. BPA je jedan od spojeva čiji je učinak povezan s razvojem oksidacijskog stresa. Premda mehanizmi učinka BPA na oksidacijski stres nisu u potpunosti proučeni i razjašnjeni, brojna *in vitro* i *in vivo* istraživanja su potvrdila pro-oksidacijski učinak BPA (Gassman, 2017; Meli i sur., 2020).

U istraživanju koje su proveli Kabuto i sur. (2003) na miševima, aktivnost antioksidacijskog enzima superoksid dismutaze je porasla, a aktivnost katalaze i glutathion-peroksidaze je smanjena dok je sadržaj GSSG porastao nakon 5 dana primjene BPA u dozi od 25 i 50 mg/kg/dan. Rezultati su uputili na to da BPA izaziva prekomjernu proizvodnju vodikovog peroksida, tj. pojačava oksidativni stres. Uočeno je povećanje sadržaja GSH+GSSG u mozgu, bubrezima, testisima i jetri miša, a smanjenje sadržaja GSH je zamijećeno u testisima. Pretpostavljeno je da je povećanje produkcije H₂O₂ i njegova pretvorba u hidroksilni radikal, koji je neutraliziran reduciranim GSH, posljedično dovelo do smanjenja sadržaja GSH. Hassan i suradnici (2012) proučavali su indukciju oksidacijskog stresa u jetri štakora nakon oralne primjene BPA koncentracijskog raspona 0,1 – 50 mg/kg/dan kroz 4 tjedna. Uočeni je utjecaj BPA na biomarkere oksidativnog i nitrozativnog stresa. Sadržaj GSH se smanjio u cijelom rasponu doza, a značajno smanjenje je zabilježeno pri dozi od 50 mg/kg/dan. Ta doza je uzrokovala značajan porast produkata lipidne peroksidacije i NO_x kao markera oštećenja staničnih struktura, ali i smanjenje aktivnosti antioksidacijskih enzima, glutathion peroksidaze,

katalaze, glutation-reduktaze, glutation-S-transferaze i superoksid dismutaze. U tom istraživanju je potvrđeno da izloženost visokim dozama BPA povećava razine slobodnih radikala te smanjuje sposobnost detoksifikacije ROS-ova, odnosno da BPA uzrokuje oksidacijski stres narušavanjem ravnoteže oksidansa i antioksidansa. Kaya i sur. (2016) pratili su učinak BPA na antioksidacijski sustav izoliranih jetrenih stanica vrste *Alburnus Tarichi*. Stanice su bile izložene BPA u koncentracijskom rasponu 25 – 200 μM tijekom 24 sata. Visoka koncentracija BPA (200 μM) je pokazala izrazitu toksičnost. Povećana je aktivnost superoksid dismutaze i glutation-S-transferaze, a aktivnost glutation-peroksidaze je fluktuirala, dok je sadržaj reduciranog GSH smanjen u usporedbi s kontrolom. Zabilježen je blagi porast sadržaja MDA koji nije statistički značajan, a takvi rezultati mogu biti posljedica prekratke izloženosti. U tom je istraživanju zaključeno da BPA ima toksični učinak na izolirane hepatocite ribe remeteći ravnotežu pro-oksidansa i antioksidansa.

Utjecaj BPA na antioksidacijski sustav pratili su i Zhang i sur. (2016) u korijenju soje (*Glycine max* L.) u različitim fazama životnog ciklusa biljke. Praćena je razina ROS-ova, sastav masnih kiselina lipidne membrane, peroksidacija lipida i antioksidacijski sustavi nakon sedmodnevne izloženosti modelnog organizma otopinama BPA koncentracijskog raspona 1,5 – 12 mg/l. Zaključeno je da se učinak BPA na razinu ROS-ova, peroksidaciju membranskih lipida i antioksidativne sustave pogoršava s povećanjem doze izloženosti BPA, ali slabi u višim fazama životnog ciklusa biljke.

GSH, kao istaknuti ne-enzimski antioksidans, predstavlja važan biomarker u procjeni izloženosti stresu. U ovom je istraživanju u korjenčićima lukovica luka nakon trodnevne izloženosti BPA sadržaj GSH značajno smanjen pri svim koncentracija u odnosu na negativnu kontrolu. Značajan pad sadržaja GSH zabilježen je već pri izloženosti najnižoj koncentraciji BPA (1 mg/l). Pri toj koncentraciji BPA zabilježena je niža masa svježeg tkiva korjenčića, no ona nije bila značajna. Taj rezultat govori da je izloženost BPA u koncentraciji 1 mg/l dovela do aktivacije antioksidacijske obrane, odnosno trošenja GSH na obranu od oksidacijskog stresa što je spriječilo značajniji fitotoksični učinak BPA. BPA je u višim koncentracijama (10 i 25 mg/l) doveo do blagog porasta sadržaja GSH u odnosu na niže i više koncentracije BPA. Takvo povećanje sadržaja GSH može se povezati s reakcijom organizma na stres uslijed čega dolazi do *de novo* sinteze GSH s ciljem neutralizacije suvišnih ROS-ova, ali i drugih vrsta koje dovode do oštećenja unutar stanice. Usprkos povećanju vrijednosti GSH, uzevši u obzir rastuće vrijednosti parametara oksidacijskog oštećenja lipida i proteina (MDA i proteinski karbonili), antioksidacijski sustav pri višim koncentracijama BPA (iznad 10 mg/l) nije uspio spriječiti oksidacijsko oštećenje proteina i lipida. Također, s obzirom da je oksidacijsko oštećenje

proteina u korjenčićima luka zabilježeno pri nižoj koncentraciji (10 mg/l) u odnosu na oštećenje lipida koje je zabilježeno tek pri višoj koncentraciji (25 mg/l), može se zaključiti da je BPA uzrokovao oštećenje proteini pri nižim koncentracijama. S obzirom na značajno smanjenje sadržaja GSH već kod koncentracije BPA od 1 mg/l može se zaključiti da je modelni organizam u cijelom ispitivanom rasponu koncentracija BPA bio izložen povećanoj razini ROS-ova.

Povećana proizvodnja i potrošnja BPA dovela je do njegove velike zastupljenosti u prehrambenim i drugim proizvodima, zraku, tlu i vodi. Detektirane koncentracije BPA u otpadnim i površinskim vodama variraju između nanogramskih i mikrogramskih količina po mililitru uzorka (Kaya i sur., 2016). Tako je u površinskim vodama u Nizozemskoj i Njemačkoj zabilježena koncentracija BPA bila 21 $\mu\text{g/l}$ i 0,41 $\mu\text{g/l}$, a u procjednim vodama smetlišta u Japanu zabilježena je koncentracija BPA od 17,2 mg/l (Zhang i sur., 2016). U istraživanju provedenom u Srbiji koncentracija BPA u pitkoj vodi ruralnog središta varirala je između 2,6 i 6,2 ng/l, dok se u urbanim središtima koncentracijski raspon kretao između 2,5 i 35,6 ng/l (Janda i sur., 2021). Koncentracije BPA u tlu variraju nekoliko redova veličine ($< 0,01\text{-}1000 \mu\text{g/kg}$). U poljoprivrednim poljima zabilježene su koncentracije BPA manje od 10 $\mu\text{g/kg}$, a u tlu reciklažnog dvorišta i odlagališta u Kini zabilježene su razine BPA veće od 100 $\mu\text{g/kg}$. Nadalje, u urbanim područjima Indije, Kine, Japana, Novog Zelanda i Sjedinjenih Američkih Država, zabilježene razine BPA u zraku su se kretale od 0,004 do 17 ng/m^3 , dok je u ruralnim područjima Kine i Njemačke razina BPA varirala između 0,005 do 0,2 ng/m^3 (Corrales i sur., 2015). Prema Zhang i sur. (2016) u istraživanju provedenom na soji odabrane su tri koncentracije otopina BPA: BPA u koncentraciji od 1,5 mg/l predstavlja sigurnu dozu u vodi za piće i gornju sigurnosnu granicu za pojedince koju je odredila Agencija za zaštitu okoliša Sjedinjenih Američkih Država; koncentracije od 6,0 i 12,0 mg/l predstavljaju sadržaj BPA u tlu, riječnom sedimentu i procjednim vodama odlagališta otpada. Iz navedenih podataka može se uočiti da su koncentracije BPA u ovom istraživanju značajno više od okolišnih. No, uzimajući u obzir veliku potražnju i uporabu BPA kao i sve veće zagađenje okoliša, može se utvrditi da niže koncentracije BPA (posebice 1 mg/l) predstavljaju okolišno relevantnu koncentraciju. Također, treba uzeti u obzir i akumulaciju BPA u okolišu te da su biljke u okolišu izložene nižim koncentracijama BPA u dužem razdoblju.

Na osnovi dostupnih literaturnih podataka i dobivenih rezultata u istraživanju, možemo potvrditi da je obični luk dobar modelni organizam za ispitivanje štetnog učinka ksenobiotika. Nadalje, rezultati istraživanja dobiveni u sklopu ovog diplomskog rada u skladu su s navedenim istraživanjima čime je utvrđeni fitotoksični učinak BPA na korjenčice luka u ispitivanom rasponu koncentracija, ali i oksidacijski stres kao mogući mehanizam toksičnosti BPA. Osim

izravnog učinka na biljni organizam, zbog dobre korelacije *Allium* testa s drugim testnim sustavima, dobivene je rezultate moguće ekstrapolirati i na ljudski organizam. Vođeni činjenicom da je BPA sveprisutna molekula kojoj je živi svijet svakodnevno izložen i koja ima veliki potencijal akumulacije u organizmu, rezultate dobivene u sklopu ovog diplomskog rada bi svakako trebalo uvažiti pri daljnjim istraživanjima o toksičnosti ovog nadasve poznatog endogenog disruptora.

5. Zaključci

Nakon provedenog istraživanja u kojem su ispitani fitotoksični učinak (masa svježeg tkiva korjenčića) i učinak BPA na parametre oksidacijskog stresa modelnog organizma običnog luka (*A. cepa*) te usporedbom s dostupnim literaturnim podacima, može se zaključiti sljedeće:

1. Trodnevna izloženost otopinama BPA u koncentracijama 1-50 mg/l dovela je do smanjenja mase svježeg tkiva korjenčića običnog luka u odnosu na kontrolu (destilirana voda) te se može zaključiti da BPA ima fitotoksično djelovanje na modelni organizam.
2. Zabilježeni porast sadržaja MDA, pokazatelja lipidne peroksidacije, kao i porast sadržaja oksidiranih proteina te smanjenje sadržaja GSH potvrđuje da je BPA u modelnom organizmu izazvao oksidacijski stres te se može zaključiti da je oksidacijski stres jedan od mehanizama toksičnog učinka BPA.
3. Fluktuacije u sadržaju GSH kao važnog neenzimskog antioksidansa dovode do zaključka da je tretman u postavljenim eksperimentalnim uvjetima u modelnom organizmu prouzročio trošenje, ali i sintezu novih zaliha antioksidansa u borbi protiv oksidacijskog stresa.
4. Značajni pad sadržaja GSH zabilježen pri najnižoj koncentraciji BPA od 1 mg/l pokazuje da BPA već kod okolišno relevantnih koncentracija dovodi do oksidacijskog stresa.

6. Popis kratica

BPA – bisfenol A

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

DNPH - 2,4-dinitrofenilhidrazin

DTNB - 5,5 -ditio-bis-(2-nitrobenzojeva kiselina)

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina

EFSA - Europska agencija za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*)

FDA - Američka agencija za hranu i lijekove (engl. *The Food and Drug Administration*)

GSH - reducirani glutation

GSSG - oksidirani glutation

KOPB – kronična opstruktivna plućna bolest

MBP - 4-metil-2,4-bis(4-hidroksifenil)pent-1-en

MDA - malondialdehid

NADPH - nikotinamid-adenin-dinukleotida fosfata

PUFA - polinezasićene masne kiseline (engl. *Polyunsaturated fatty acids*)

RCS - reaktivni ugljikovi spojevi (engl. *Reactive carbonyl species*)

RNS - reaktivni dušikovi spojevi (engl. *Reactive nitrogen species*)

ROS - reaktivni kisikovi spojevi (engl. *Reactive oxygen species*)

RPM - okretaji u minuti

SOD - superoksid dismutaza

TBA - 2-tiobarbituratna kiselina

HNE - 4-hidroksinonenal

PTM – post-translacijska modifikacija

GPx – glutation-peroksidaza

GR – glutation-reduktaza

GST – glutation-S-transferaza

NOx – dušikovi oksidi

TCA - trikloroctena kiselina

TNB - 2-nitro-5-merkaptobenzojeva kiselina

7. Literatura

Aoyama K. Glutathione in the Brain. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(9), 5010.

Atkinson A, Roy D. In vivo DNA adduct formation by bisphenol A. *Environ Mol Mutagen*, 1995, 26, 60-66.

Bahmani R, Kim D, Modareszadeh M, Thompson AJ, Park JH, Yoo HH, Hwang S. The mechanism of root growth inhibition by the endocrine disruptor bisphenol A (BPA). *Environmen Poll*, 2019, 257, 113516.

Bardaweel SK, Gul M, Alzweiri M, Ishaqat A, ALSalamat HA, Bashatwah RM. Reactive Oxygen Species: the Dual Role in Physiological and Pathological Conditions of the Human Body. *Eurasian J Med*, 2018, 50(3), 193-201.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J*, 2012, 5(1), 9-19.

Bisphenol A, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bisphenol-A>, pristupljeno 22.10.2020

Bisphenol A, <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol>, pristupljeno 20.10.2022.

Bocharnikova EN, Tchaikovskaya ON, Bazyl OK, Artyukhov VY, Mayer GV. Theoretical study of bisphenol A photolysis. U: *Advances in Quantum Chemistry*. Ruud K, Brändas EJ, urednici, Academic Press, 2020, 191-217.

Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*, 2012, 142, w13659.

Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2011, 25(3), 287-299.

Cai Z. Lipid Peroxidation. U: *Encyclopedia of Toxicology (Second Edition)*. Wexler P, urednik, Elsevier, 2005, 730-734.

Canesi L, Fabbri E. Environmental Effects of BPA: Focus on Aquatic Species. *Dose-Response*, 2015, 13(3), 1559325815598304.

Cimmino I, Fiory F, Perruolo G, Miele C, Beguinot F, Formisano P, Oriente F. Potential Mechanisms of Bisphenol A (BPA) Contributing to Human Disease. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(16), 5761.

Corrales J, Kristofco LA, Steele WB, Yates BS, Breed CS, William ES, Brooks BW. Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation. *Dose Response*, 2015, 13(3), 1559325815598308.

Crtnje strukture bisfenola A, <https://chem-space.com/search>, pristupljeno 15.10.2022.

Crveni luk, <https://www.plantea.com.hr/crveni-luk/>, pristupljeno 15.10.2022.

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.

Dorion S, Ouellet JC, Rivoal J. Glutathione Metabolism in Plants under Stress: Beyond Reactive Oxygen Species Detoxification. *Metabolites*, 2021, 11(9), 641.

Dorrigiv M, Zareiyani A, Hosseinzadeh H. Onion (*Allium cepa*) and its Main Constituents as Antidotes or Protective Agents against Natural or Chemical Toxicities: A Comprehensive Review. *Iran J Pharm Res*, 2021, 20(1), 3-26.

Edlow AG, Chen M, Smith NA, Lu C, McElrath TF. Fetal bisphenol A exposure: concentration of conjugated and unconjugated bisphenol A in amniotic fluid in the second and third trimesters. *Reprod Toxicol*, 2012, 34(1), 1-7.

Eyer P, Worek F, Kiderlen D, Sinko G, Stuglin A, Simeon-Rudolf V, Reiner E. Molar absorption coefficients for the reduced Ellman reagent: reassessment. *Anal Biochem*, 2003, 312(2), 224-227.

Ferrara G, Loffredo E, Senesi N. Phytotoxic, clastogenic and bioaccumulation effects of the environmental endocrine disruptor bisphenol A in various crops grown hydroponically. *Planta*, 2006, 223(5), 910-916.

Fiskesjö G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas*, 1985, 102, 99-112.

Frankowski R, Zgoła-Grześkowiak A, Smulek W, Grześkowiak T. Removal of Bisphenol A and Its Potential Substitutes by Biodegradation. *Appl Biochem Biotechnol*, 2020, 191(3), 1100-1110.

Gassman NR. Induction of oxidative stress by bisphenol A and its pleiotropic effects. *Environ Mol Mutagen*, 2017, 58(2), 60-71.

Global Bisphenol A Market Report 2018: Analysis 2013-2017 & Forecasts 2018-2023, <https://www.prnewswire.com/news-releases/global-bisphenol-a-market-report-2018-analysis-2013-2017--forecasts-2018-2023-300757673.html>, pristupljeno 20.10.2022.

Hasanuzzaman M, Fujita M. Plant Oxidative Stress: Biology, Physiology and Mitigation. *Plants*, 2022, 11(9), 1185.

Hasanuzzaman M, Nahar K, Anee TI, Fujita M. Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiol Mol Biol Plants*, 2017, 23(2), 249-268.

Hasanuzzaman M, Raihan MRH, Masud AAC, Rahman K, Nowroz F, Rahman M, Nahar K, Fujita M. Regulation of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Salinity. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17), 9326.

Hassan ZK, Elobeid MA, Virk P, Omer SA, ElAmin M, Daghestani MH, AlOlayan EM. Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012, 194829.

Huang YQ, Wong CKC, Zheng JS, Bouwman H, Barra R, Wahlström B, Neretin L, Wong, MH. Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environ Int*, 2012, 42, 91–99.

Hwang KA, Choi KC. Endocrine-Disrupting Chemicals with Estrogenicity Posing the Risk of Cancer Progression in Estrogen-Responsive Organs. U: *Advances in Molecular Toxicology*. Fishbein JC, Heilman JM, urednici, Elsevier, 2015, 1-33.

Inadera H. Neurological Effects of Bisphenol A and its Analogues. *Int J Med Sci*, 2015, 12(12), 926-936.

Iwano H, Inoue H, Nishikawa M, Yokota H, Fujiki J. Biotransformation of Bisphenol A and Its Adverse Effects on the Next Generation. U: Endocrine Disruptors. Ahmed G, urednik, London, IntechOpen, 2018.

Jalal N, Surendranath AR, Pathak JL, Yu S, Chung CY. Bisphenol A (BPA) the mighty and the mutagenic. *Toxicol Rep*, 2017, 5, 76-84.

Janda R, Ukić Š, Mikulec N, Vitale K. Bisphenol A – an Environmental and Human Threat. *Agricul Conspe Sci*, 2021, 86, 295-304.

Juan DA, Hasan HA, Muhamad MH, Abdullah SRS, Abu Bakar SNH, Buhari J. Physico-chemical and Biological Techniques of Bisphenol A Removal in an Aqueous Solution. *J Ecol Eng*, 2021, 22(9), 136-148.

Kabuto H, Hasuike S, Minagawa N, Shishibori T. Effects of bisphenol A on the metabolisms of active oxygen species in mouse tissues. *Environ Res*, 2003, 93(1), 31-35.

Kaya Ö, Kaptaner B. Antioxidant defense system parameters in isolated fish hepatocytes exposed to bisphenol A - Effect of vitamin C. *Acta Biol Hung*, 2016, 67(3), 225-235.

Khoubnasabjafari M, Ansarin K, Jouyban A. Reliability of malondialdehyde as a biomarker of oxidative stress in psychological disorders. *Bioimpacts*, 2015, 5(3), 123-127.

Kianian F, Marefati N, Boskabady M, Ghasemi SZ, Boskabady MH. Pharmacological Properties of *Allium cepa*, Preclinical and Clinical Evidences: A Review. *Iran J Pharm Res*, 2021, 20(2), 107-134.

Kim KY, Lee E, Kim Y. The Association between Bisphenol A Exposure and Obesity in Children - A Systematic Review with Meta-Analysis. *Int J Environ Res Public Health*, 2019, 16(14), 2521.

Koestel ZL, Backus RC, Tsuruta K. Bisphenol A (BPA) in the serum of pet dogs following short-term consumption of canned dog food and potential health consequences of exposure to BPA. *Sci Total Environ.*, 2017, 579, 1804-1814.

Konieczna A, Rutkowska A, Rachoń D. Health risk of exposure to Bisphenol A (BPA). *Roczniki Panst Zakl Hig*, 2015, 66(1), 5–11.

Leme DM, Marin-Morales MA. Allium cepa test in environmental monitoring: a review on its application. *Mutat Res*, 2009, 682, 71-81.

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.

Meli R, Monnolo A, Annunziata C, Pirozzi C, Ferrante MC. Oxidative Stress and BPA Toxicity: An Antioxidant Approach for Male and Female Reproductive Dysfunction. *Antioxidants*, 2020, 9(5), 405.

Mhamdi A, Van Breusegem F. Reactive oxygen species in plant development. *Development*, 2018, 145(15), dev164376.

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

Pan WJ, Xiong C, Wua QP, Liu JX, Liao HM, Chen W, Liu YS, Zheng L. Effect of BPA on the germination, root development, seedling growth and leaf differentiation under different light conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Chemosphere*. 2013, 93(10), 2585-2592.

Pandey R, Paul V, Das M, Meena M, Meena R. Plant growth analysis. U: Physiological Techniques to Analyze the Impact of Climate Change on Crop Plants. New Delhi, IARI, 2017, 103–107.

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

Qiu Z, Wang L, Zhou Q. Effects of bisphenol A on growth, photosynthesis and chlorophyll fluorescence in above-ground organs of soybean seedlings. *Chemosphere*, 2013, 90(3), 1274-1280.

Quiroga B. Strategies to Protect Dialysis Patients against Bisphenol A. *Biomolecules*, 2021, 11(9), 1375.

Rahman T, Hosen I, Islam M, Shekhar H. Oxidative stress and human health. *Adv Biosci Biotechnol*, 2012, 3, 997-1019.

Rebolledo-Solleiro D, Castillo Flores LY, Solleiro-Villavicencio H. Impact of BPA on behavior, neurodevelopment and neurodegeneration. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2021, 26(2), 363-400.

Sacramento EB, Azevedo CA, Abreu ST, Borba HR, Lima VM. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic potential of waters of the Paraíba do Sul River Basin - RJ through the *Allium cepa* test system. *Rev Ambient Água*, 2020, 15, 3-10.

Sagar NA, Pareek S, Benkeblia N, Xiao J. Onion (*Allium cepa* L.) bioactives: Chemistry, pharmacotherapeutic functions, and industrial applications. *Food Frontiers*, 2022, 3, 380-412.

Schönemann, AM, Moreno Abril SI, Diz AP, Beiras R. The bisphenol A metabolite MBP causes proteome alterations in male *Cyprinodon variegatus* fish characteristic of estrogenic endocrine disruption. *Environ Pollut*, 2022, 300, 118936.

Sonia TA, Sharma CP. Experimental techniques involved in the development of oral insulin carriers, U: Oral Delivery of Insulin. Sonia TA, Sharma CP, urednici, Cambridge, Woodhead Publishing, 2014, 169-217

Štefan L, Tepšić T, Zavidčić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Med Flum*, 2007, 43(2), 84-93.

Tedesco SB, Laughinghouse HD. Bioindicator of Genotoxicity: The *Allium cepa* Test U: Srivastava J, urednik, Environmental Contamination, IntechOpen, 2012, doi:10.5772/31371.

Teshika JD, Zakariyyah AM, Zaynab T, Zengin G, Rengasamy KR, Pandian SK, Fawzi MM. Traditional and modern uses of onion bulb (*Allium cepa* L.): a systematic review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2019, 59(1), 39-70.

Tola AJ, Jaballi A, Missihoun TD. Protein Carbonylation: Emerging Roles in Plant Redox Biology and Future Prospects. *Plants*, 2021, 10(7), 1451.

Weitner T, Inić S, Jablan J, Gabričević M, Domijan A. Spectrophotometric Determination of Malondialdehyde in Urine Suitable for Epidemiological Studies. *Croat Chem Acta*, 2016, 89(1), 133-139.

Yokota H, Iwano H, Endo M, Kobayashi T, Inoue H, Ikushiro S, Yuasa A. Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem J*, 1999, 340(2), 405–409.

Zaborowska M, Wyszowska J, Borowik A, Kucharski J. Bisphenol A - A Dangerous Pollutant Distorting the Biological Properties of Soil. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(23), 12753.

Zhang J, Li X, Zhou L, Wang L, Zhou Q, Huang X. Analysis of effects of a new environmental pollutant, bisphenol A, on antioxidant systems in soybean roots at different growth stages. *Sci Rep*, 2016, 6, 23782.

Zhang J, Wang L, Zhou Q, Huang X. Reactive oxygen species initiate a protective response in plant roots to stress induced by environmental bisphenol A. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 154, 197-205.

Zielińska M, Wojnowska-Baryła I, Cydzik-Kwiatkowska A. Sources and properties of BPA. U: Bisphenol A removal from water and wastewater. Cham, Springer, 2019, 3–28.

8. Sažetak / Summary

Cilj ovog rada bio je ispitati fitotoksičnost i oksidacijski stres kao mehanizam toksičnosti bisfenola A (BPA) u korjenčićima običnog luka (*Allium cepa* L.). Korjenčići lukovica luka (n = 10) bili su izloženi ili destiliranoj vodi (negativna kontrola) ili otopinama BPA (koncentracijski raspon 1-50 mg/l) kroz tri dana. Nakon trodnevne izloženosti, izvagana je masa svježeg tkiva korjenčića svake od lukovica te je pripremljen homogenat korjenčića luka u 5 % TCA (100 mg tkiva u 0,5 ml 5 % TCA). U supernatantu tako pripremljenog homogenata određeni su parametri oksidacijskog stresa: sadržaj reduciranog glutationa (GSH) i malondialdehida (MDA), a u talogu homogenata određen je sadržaj proteinskih karbonila. Sadržaj GSH određen je metodom prema Ellmanu (1959), MDA tiobarbituratnim testom, a proteinski karbonili metodom prema Levinu i sur. (1990), derivatizacijom karbonilne skupine proteina uz DNPH. Dobiveni rezultati statistički su obrađeni studentovim t-testom (*Excel, MS Office*).

Masa svježeg tkiva korjenčića luka tretiranih otopinama BPA (1-50 mg/l) bila je niža u odnosu na negativnu kontrolu te je značajno smanjenje mase zabilježeno već nakon izloženosti BPA u koncentraciji 5 mg/l. Pad mase svježega tkiva s povećanjem koncentracije BPA ukazuje na fitotoksično djelovanje BPA na korjenčiće običnog luka. Sadržaj GSH bio je značajno niži u odnosu na kontrolu nakon izloženosti BPA u koncentraciji 1 mg/l. Značajan porast u odnosu na negativnu kontrolu sadržaja proteinskih karbonila zabilježen je nakon izloženosti BPA u koncentraciji 10 mg/l, a MDA nakon izloženosti 25 mg/l. Pad razine antioksidansa (GSH) i porast razine parametara oksidacijskog oštećenja lipida i proteina (MDA i proteinski karbonili) upućuju na to da je BPA izazvao oksidacijski stres u modelnom organizmu. Dobiveni rezultati pokazuju da BPA uzrokuje oksidacijsko oštećenje staničnih struktura te se može zaključiti da je oksidacijski stres jedan od mehanizama toksičnog učinka BPA.

The aim of this study was to explore phytotoxicity and oxidative stress as a mechanism of bisphenol A (BPA) toxicity in onion roots (*Allium cepa* L.). Roots of onion bulbs (n = 10) were exposed to either distilled water (negative control) or BPA solutions (concentration range 1-50 mg/l) for three days. After a three-day exposure, the fresh root weight of each bulb was weighed, and in 5% TCA a homogenate of onion roots was prepared (100 mg of tissue in 0.5 ml of 5% TCA). In the supernatant of prepared homogenate oxidative stress parameters: the content of reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) was determined, and in the homogenate's precipitate the content of protein carbonyls was assessed. The GSH content was determined based on the Ellman method (1959), MDA by using the thiobarbiturate test and the content of protein carbonyls was determined according to Levin et al. (1990), by derivatization of the proteins' carbonyl group with DNPH. The obtained results were statistically analysed by student's t-test (*Excel, MS Office*).

The fresh tissue weight of onion roots treated with BPA (in concentration range 1-50 mg/l) was lower compared to the negative control, and a significant decrease in roots fresh weight was recorded already after exposure to BPA in concentration of 5 mg/l. The decrease in fresh tissue weight with increasing BPA concentration indicates that BPA had phytotoxic effect on onion roots. The exposure to BPA in concentration of 1 mg/l significantly decreased the content of GSH compared to the control. A significant increase compared to the negative control in the content of protein carbonyls was recorded after exposure to BPA in concentration of 10 mg/l, and MDA after exposure to BPA in concentration of 25 mg/l. A decrease in the level of antioxidants (GSH) and an increase in the level of lipid and protein oxidative damage parameters (MDA and protein carbonyls) indicate that BPA caused oxidative stress in the model organism. The obtained results imply that BPA caused oxidative damage to cellular structures, thus can be concluded that oxidative stress is one of the mechanisms of BPA toxicity.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

Utjecaj bisfenola A na parametre oksidacijskog stresa u korjenčićima luka (*Allium cepa* L.)

Klara Blažeka

SAŽETAK

Cilj ovog rada bio je ispitati fitotoksičnost i oksidacijski stres kao mehanizam toksičnosti bisfenola A (BPA) u korjenčićima običnog luka (*Allium cepa* L.). Korjenčići lukovica luka ($n = 10$) bili su izloženi ili destiliranoj vodi (negativna kontrola) ili otopinama BPA (koncentracijski raspon 1-50 mg/l) kroz tri dana. Nakon trodnevne izloženosti, izvagana je masa svježeg tkiva korjenčića svake od lukovica te je pripremljen homogenat korjenčića luka u 5 % TCA (100 mg tkiva u 0,5 ml 5 % TCA). U supernatantu tako pripremljenog homogenata određeni su parametri oksidacijskog stresa: sadržaj reduciranog glutationa (GSH) i malondialdehida (MDA), a u talogu homogenata određen je sadržaj proteinskih karbonila. Sadržaj GSH određen je metodom prema Ellmanu (1959), MDA tiobarbituratnim testom, a proteinski karbonili metodom prema Levinu i sur. (1990), derivatizacijom karbonilne skupine proteina uz DNPH. Dobiveni rezultati statistički su obrađeni studentovim t-testom (*Excell, MS Office*). Masa svježeg tkiva korjenčića luka tretiranih otopinama BPA (1-50 mg/l) bila je niža u odnosu na negativnu kontrolu te je značajno smanjenje mase zabilježeno već nakon izloženosti BPA u koncentraciji 5 mg/l. Pad mase svježega tkiva s povećanjem koncentracije BPA ukazuje na fitotoksično djelovanje BPA na korjenčiće običnog luka. Sadržaj GSH bio je značajno niži u odnosu na kontrolu nakon izloženosti BPA u koncentraciji 1 mg/l. Značajan porast u odnosu na negativnu kontrolu sadržaja proteinskih karbonila zabilježen je nakon izloženosti BPA u koncentraciji 10 mg/l, a MDA nakon izloženosti 25 mg/l. Pad razine antioksidansa (GSH) i porast razine parametara oksidacijskog oštećenja lipida i proteina (MDA i proteinski karbonili) upućuju na to da je BPA izazvao oksidacijski stres u modelnom organizmu. Dobiveni rezultati pokazuju da BPA uzrokuje oksidacijsko oštećenje staničnih struktura te se može zaključiti da je oksidacijski stres jedan od mehanizama toksičnog učinka BPA.

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

Rad sadrži: 42 stranice, 9 grafičkih prikaza, 4 tablice i 71 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: bisfenol A, *Allium* test, oksidacijski stres, glutation, malondialdehid, proteinski karbonili

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redovita profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Maja Bival Štefan, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.
Dr. sc. Marijan Marijan, poslijedoktorand Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: studeni 2022.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

The effect of bisphenol A on oxidative stress parameters in onion (*Allium cepa* L.) roots

Klara Blažeka

SUMMARY

The aim of this study was to explore phytotoxicity and oxidative stress as a mechanism of bisphenol A (BPA) toxicity in onion roots (*Allium cepa* L.). Roots of onion bulbs (n = 10) were exposed to either distilled water (negative control) or BPA solutions (concentration range 1-50 mg/l) for three days. After a three-day exposure, the fresh root weight of each bulb was weighed, and in 5% TCA a homogenate of onion roots was prepared (100 mg of tissue in 0.5 ml of 5% TCA). In the supernatant of prepared homogenate oxidative stress parameters: the content of reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) was determined, and in the homogenate's precipitate the content of protein carbonyls was assessed. The GSH content was determined based on the Ellman method (1959), MDA by using the thiobarbiturate test and the content of protein carbonyls was determined according to Levin et al. (1990), by derivatization of the proteins' carbonyl group with DNPH. The obtained results were statistically analysed by student's t-test (*Excel, MS Office*). The fresh tissue weight of onion roots treated with BPA (in concentration range 1-50 mg/l) was lower compared to the negative control, and a significant decrease in roots fresh weight was recorded already after exposure to BPA in concentration of 5 mg/l. The decrease in fresh tissue weight with increasing BPA concentration indicates that BPA had phytotoxic effect on onion roots. The exposure to BPA in concentration of 1 mg/l significantly decreased the content of GSH compared to the control. A significant increase compared to the negative control in the content of protein carbonyls was recorded after exposure to BPA in concentration of 10 mg/l, and MDA after exposure to BPA in concentration of 25 mg/l. A decrease in the level of antioxidants (GSH) and an increase in the level of lipid and protein oxidative damage parameters (MDA and protein carbonyls) indicate that BPA caused oxidative stress in the model organism. The obtained results imply that BPA caused oxidative damage to cellular structures, thus can be concluded that oxidative stress is one of the mechanisms of BPA toxicity.

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

Thesis includes: 42 pages, 9 figures, 4 tables and 71 references. Original is in Croatian language.

Keywords: bisphenol A, *Allium* test, oxidative stress, glutathione, malondialdehyde, protein carbonyls

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 Bival Štefan, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.
Marijan Marijan, Ph.D. Postdoctoral researcher, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

The thesis was accepted: November 2022.

