

# Utjecaj 2-metoksi-1,4-naftokinona na klijavost bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) i rotkvice (*Raphanus sativus* L.)

---

Fajdetić, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:163:425390>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-23**



Repository / Repozitorij:

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



Ana Fajdetić

**Utjecaj 2-metoksi-1,4-naftokinona na klijavost  
bijeleg gorušice (*Sinapis alba* L.) i rotkvice  
(*Raphanus sativus* L.)**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmaceutsku botaniku pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ane-Marije Domijan i dr. sc. Valerije Vujčić Bok.

*Veliko hvala mojoj dragoj mentorici prof. dr. sc. Ana-Mariji Domijan bez koje ovaj diplomski ne bi ni ugledao svjetlo dana. Hvala Vam na vremenu, podršci i brzom odgovaranju na mailove!*

*Hvala i dr. sc. Valeriji Vujčić Bok na pomoći sa statističkom obradom rezultata.*

*Hvala mojoj mami i mojoj najdražoj sekini Jeleni koja je uvijek bila tu za mene.*

*Hvala mojoj najdražoj Mariji s kojom je studiranje bilo ipak koji postotak lakše.*

*Hvala mojoj Kornii, mom velikom Mačku i mom malom Muciu koji su apsorbirali sav moj stres i negativnu energiju.*

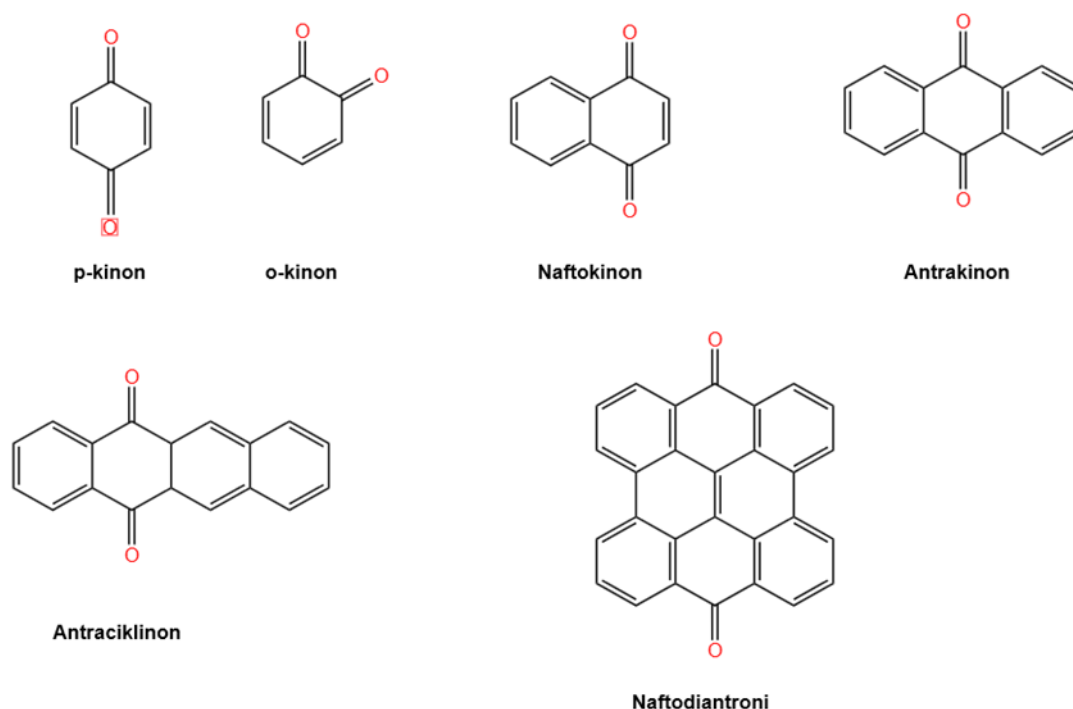
## Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1. Naftokinoni .....	2
1.1.1. 2-metoksi-1,4-naftokinon .....	3
1.2. Oksidacijski stres .....	4
1.3. Klijanje .....	5
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	6
3. MATERIJALI I METODE .....	8
3.1. Kemikalije .....	9
3.2. Oprema .....	9
3.3. Metode .....	10
3.3.1. Biološki pokus .....	10
3.3.2. Određivanje katalitičke aktivnosti SOD-a .....	14
3.4. Statistička obrada podataka .....	14
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	16
4.1. Rezultati klijavosti i duljine korjenčića bijele gorušice .....	17
4.2. Rezultati klijavosti i duljine korjenčića rotkvice .....	19
4.3. Rezultati katalitičke aktivnosti SOD-a bijele gorušice .....	21
4.4. Rezultati katalitičke aktivnosti SOD-a rotkvice .....	22
4.5. Korelacija rezultata klijavosti, duljine korjenčića i aktivnosti SOD .....	24
4.5. Analiza glavnih komponenti .....	25
5. ZAKLJUČCI .....	28
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA .....	30
7. LITERATURA .....	32
8. SAŽETAK / SUMMARY .....	35
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

## **1. UVOD**

## 1.1.Naftokinoni

Kinoni su nezasićeni ciklički diketoni. Karakteristično strukturno obilježje kinona je da njihove dvije karbonilne skupine (-CO) s ostalim ugljikovim atomima tvore ciklički sustav konjugiranih dvostrukih veza ([www.enciklopedija.hr](http://www.enciklopedija.hr)). U prirodi mogu nastati kinoni s jednom aromatskom jezgrom (benzokinoni), ali i oni koji imaju kondenziranu policikličku aromatsku strukturu. Ukoliko u strukturi imaju naftalen, zovu se naftokinoni, ako pak u strukturi imaju antracen, onda se nazivaju antrakinoni, a oni koji u strukturi imaju 1,2-benzantracen, nazivaju se antraciklinoni (Vladimir Knežević, 2018) (Slika 1).



Slika 1. Kemijske strukture kinona koje je moguće naći u prirodi (Vladimir Knežević, 2018); (nacrtano pomoću aplikacije KingDraw).

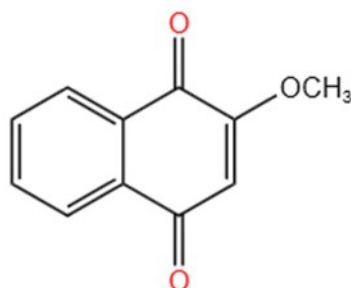
Naftokinoni su najčešća vrsta kinona u prirodi. Raznolika su skupina specijaliziranih metabolita koje sintetiziraju biljke, lišajevi i razni mikroorganizmi (Futuro i sur., 2018). Njihove funkcije su posredovanje u različitim interakcijama između samih biljaka, ali i u interakcijama tipa biljka-gljiva/insekt/mikrobiom (Meyer i sur., 2020). Skupina naftokinona neprestano se proširuje otkrivanjem novih prirodnih produkata, ali i sintezom novih spojeva putem inovativnih tehnika (Futuro i sur., 2018).

Najpoznatiji izomer naftokinona je 1,4 ili para-naftokinon. U njegove poznatije derivate ubrajaju se: loson, lapanol, juglon i menadion ([www.enciklopedija.hr](http://www.enciklopedija.hr)). Loson i juglon tvore soli i komplekse s kationima metala te se koriste kao boje. Juglon pored toga pokazuje i antibakterijska i fungicidna svojstva. Lapanol se koristi u tradicionalnoj brazilskoj medicini kao antiparazitik i antiseptik, dok je menadion poznat kao vitamin K3 (Dmitry i Polonik, 2020).

1,4-naftokinoni su bioaktivni spojevi stoga što se njihove karbonilne skupine mogu sponatno autooksidirati u prisutnosti kisika pri čemu nastaju reaktivni kisikovi spojevi (ROS, od engl. *reactive oxygen species*). ROS-ovi mogu oksidativno modificirati stanične makromolekule poput lipida i proteina uzrokujući trenutno oštećenje stanica ili dovesti do proizvodnje još štetnijih slobodnih radikala koji uzrokuju mutacije DNA. Ovisno o funkcionalnim skupinama vezanim na naftokinonski prsten, oksidirani kinon može sam stvarati adukte s reduciranim glutationom (GSH), proteinima i DNA što dovodi do iscrpljivanja staničnih zaliha glutationa i/ili oštećenja makromolekula (Meyer i sur., 2021).

### 1.1.1. 2-metoksi-1,4-naftokinon

2-metoksi-1,4-naftokinon (2-MNQ, Slika 2) derivat je 1,4-naftokinona koji na poziciji 2 ima metoksi skupinu ([pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)). Proizvode ga biljne vrste iz porodice Balsamiaceae kao što su vrtna vodenika (*Impatiens balsamina* L.) i žljezdasti neditrak (*Impatiens glandulifera* Royle) iz kojih je i izoliran. Ispitivanje provedeno s 2-MNQ izoliranim iz perikarpa plodova vrtno vodenike te listova žljezdastog neditrka pokazalo je kako 2-MNQ ima antipruritično, protuupalno, antialergijsko, antimikrobno i antikancerogeno djelovanje (Wang i sur., 2011). Njegovo antikancerogeno djelovanje uključuje modifikaciju proliferacije i diferencijacije tumorskih stanica te poticanje njihove apoptoze kao i inhibiciju angiogeneze i ravnice metastaza (Wong i sur., 2022). Posebno zanimljivo otkriće je da tretman s 2-MNQ uzrokuje inhibiciju rasta bakterije *H. Pylori* (Wang i sur., 2011). To je ukazalo na potencijal za razvoj lijeka koji bi se koristio u terapiji karcinoma želuca koji uzrokuje *H. pylori* (Wang i sur., 2011). Iako 2-MNQ ima vrlo obećavajuće djelovanje, još je potrebno napraviti mnogo istraživanja prije nego što se donesu zaključci o sigurnosti ili učinkovitosti 2-MNQ za liječenje raka ili drugih patoloških stanja kod ljudi.



Slika 2. Kemijska struktura 2-metoksi-1,4-naftokinona (2-MNQ) (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov); (nacrtano pomoću aplikacije KingDraw).

## 1.2. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres definira se kao neravnoteža između slobodnih radikala i antioksidansa. Povećana razina slobodnih radikala u organizmu dovodi do oštećenja važnih makromolekula u stanici kao što su DNA, proteini i lipidi (Parčetić-Kostelac i sur., 2016). Slobodni radikali, u koje se ubrajaju ROS-ovi i reaktivni dušikovi spojevi (RNS, od engl. *reactive nitrogen species*) povezuju se s mnogim patološkim procesima u tijelu. Kako ne bi došlo do oksidacijskog oštećenja makromolekula, organizam je razvio antioksidacijski sustav koji čine brojni enzimi i ne-enzimski antioksidansi (Parčetić-Kostelac i sur., 2016). Jedna grupa enzima koja čini antioksidacijsku obranu organizma je i skupina enzima superoksid dizmutaza (SOD). SOD je prisutna u svim aerobnim stanicama te katalizira redukciju superoksidnog aniona ( $O_2^-$ ) u molekularni kisik ( $O_2$ ) i vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i tako štiti stanice od slobodnih radikala (Younus, 2018). S obzirom na svoju važnost u obrani od slobodnih radikala, SOD se proučava za terapijsku upotrebu. Dosad je istražen njezin potencijal u protuupalnim i antikancerogenim ispitivanjima gdje su dobiveni obećavajući rezultati, no klinička upotreba pokazala je ograničenost primjene SOD-a zbog njezine nestabilnosti i imunogenosti *in vivo* (Wang i sur., 2015).



### 1.3. Klijanje

Klijanje ili germinacija (lat. *germinatio*) je proces razvoja klice u sjemenki (www.enciklopedija.hr) (Slika 3). Klijanje je početni korak u životnom ciklusu biljaka koji počinje kada neaktivno suho sjeme upije vodu, a završava izbočenjem korijena iz ovojnice sjemena. To je vrlo složen proces na koji utječu unutarnji i vanjski čimbenici. Unutarnji čimbenici uključuju mirovanje sjemena i dostupne zalihe hrane, dok voda, temperatura, kisik, svjetlost, relativna vlažnost, kemikalije u okruženju sjemena i korišteni supstrat čine vanjske čimbenike (Makhaye i sur., 2021). Sjeme ostaje u stanju mirovanja sve dok uvjeti ne budu povoljni za klijanje. Unutar ovojnice sjemena nalazi se embrionalna biljka koja se sastoji od embrionalnog korijena, stabljike i lišća. Osim toga, sjeme sadrži i zalihu hrane- endosperm, koja je prepuna hranjivih tvari. Nakon što se pojavi lišće, biljka počinje sama stvarati hranu putem fotosinteze (www.extension.wvu.edu). Na klijavost uvelike utječe i ravnoteža fitohormona, posebice omjer abscizinske kiseline (ABA) i gibberelina (GA).

Procesi uključeni u klijanje sjemena mogu se kategorizirati u tri istaknute faze:

Faza 1. Tijekom faze 1 suho sjeme upija vodu i na taj način stimulira embrij na proizvodnju fitohormona i hidrolitičkih enzima;

Faza 2. Tijekom faze 2 dolazi do metaboličke reaktivacije i posljedično hidrolize rezervi hrane u metaboličke šećere koji predstavljaju izvor energije za rast biljke;

Faza 3. Faza 3 je radikularna protruzija (Makhaye i sur., 2021).



Slika 3. Proklijale sjemenke rotkvice (*Raphanus sativus* L.); (slikala: A. Fajdetić).

## **2. OBRAZLOŽENJE TEME**

Procijenjeno je da će do 2026. godine najistraživanija skupina lijekova biti citostatici te da će se u njihovo istraživanje i razvoj uložiti čak 300 milijardi američkih dolara ([www.iqvia.com](http://www.iqvia.com)). Stoga ne čudi ogroman interes za ovo terapijsko područje i fokus znanstvenika na otkrivanje i razvijanje spojeva s antikancerogenim djelovanjem. Budući da su mnogi korišteni lijekovi upravo sintetizirani po uzoru na prirodne produkte, ne začuđuje činjenica da se spojevi uzori traže upravo u živim organizmima kao što su biljke ili morski organizmi (Perković, 2019). Jedna od zanimljivijih skupina spojeva zasigurno su i 1,4-naftokinoni koji uz antikancerogeno, pokazuju i brojna druga djelovanja (kardioprotektivno, hepatoprotektivno, antimikrobno), a koja se tek trebaju istražiti (Zhu i sur., 2022). Tako se 1,4-naftokinon, lapanol, nalazi u fazi II. kliničkih ispitivanja za liječenje mnogih vrsta raka (Dmitry i Polonik, 2020). Obećavajuće djelovanje ima i 2-MNQ te je stoga potrebno provesti daljnja istraživanja njegovog djelovanja (Ahmadi i sur., 2020).

U ovom istraživanju ispitan je utjecaj 2-MNQ na klijanje sjemenki. Cilj je bio ustanoviti djeluje li 2-MNQ stimulacijski ili inhibitorno na klijavost te je li njegovo djelovanje ovisno i o samoj biljnoj vrsti. Pored toga, htjelo se utvrditi je li oksidacijski stres uključen u mehanizam djelovanja 2-MNQ na klijavost sjemenki. Kao biljni model korištene su sjemenke dviju biljnih vrsta: bijele gorušice i rotkvice. Sjemenke su kroz 3 dana bile izložene 2-MNQ te je promatran učinak 2-MNQ na klijavost sjemenki i razinu antioksidacijske obrane sjemenki mjerenjem aktivnosti SOD-a. Proces klijanja proveden je prema OECD smjernicama (OECD, 2003). Za ispitivanje djelovanja 2-MNQ odabran je biljni model zbog svoje jednostavnosti te iz etičkih i financijskih razloga.

### **3. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. Kemikalije

Za provedbu ovoga istraživanja korištene su sljedeće kemikalije:

- 2-metoksi-1,4-naftokinon, 2-MNQ, Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD
- trikloroocetna kiselina, TCA, Kemika, Zagreb Hrvatska
- bakrov (II) sulfat,  $\text{CuSO}_4$ , Kemika, Zagreb, Hrvatska
- metanol, Lach-Ner, Neratovice, Češka
- etanol, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- komercijalni kit SOD, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, SAD.

Sve korištene kemikalije bile su *pro analysis* čistoće, a za pripremu otopina korištena je destilirana voda.

### 3.2. Oprema

Za provedbu istraživanja korištena je sljedeća oprema:

- analitička vaga, PB 303, Mettler Toledo, Švicarska
- mikropipete, Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- miješalica (vortex), Heidolph model REAX top, Heidolph Instruments, Scwabach, Njemačka
- centrifuga, Centurion Scientific, Chichester, UK
- čitač pločica, iEMS Reader MF, Labsystems, Helsinki, Finska.

Korišteni uređaji nalaze se na Zavodu za farmaceutsku botaniku Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

### 3.3. Metode

#### 3.3.1. Biološki pokus

Pokus klijavosti proveden je prema OECD smjernicama (OECD, 2003). OECD smjernice sadrže određene zahtjeve koji se moraju ispuniti prije i prilikom izvođenja samog pokusa, a odnose se na:

- 1) provjerene informacije o ispitivanoj i referentnoj supstanci (strukturna formula, čistoća, topljivost, kemijska stabilnost, biorazgradivost i sl.)
- 2) kriterijima koji su potrebni da bi se test smatrao valjanim
- 3) opis same metode koja uključuje odabir odgovarajuće podloge / supstrata za pokus, izbor vrsta koje će se koristiti te njihovu međusobnu inkorporaciju
- 4) izvođenje samog testa (ispitivane i kontrolne grupe, uvjeti u kojima se test izvodi, opservaciju i sl.).

#### Biljni model

Za ispitivanje utjecaja 2-MNQ na klijavost izabrane su sjemenke dviju biljnih vrsta: bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) i rotkvice (*Raphanus sativus* L.). Bijela gorušica je biljna vrsta koja se povijesno koristi u ovakvim testiranjima, a rotkvice je izabrana kao vrsta iz porodice Brassicaceae, kojoj pripada i bijela gorušica, čime se htjelo istražiti i postoji li korelacija između djelovanja 2-MNQ na taksonomski srodne vrste. Bijela gorušica jednogodišnja je zeljasta biljka podrijetlom iz Sredozemlja, a uzgaja se kao kultivirana biljka prvenstveno radi sjemena koje se samljeveno koristi kao začim (Grlić, 1990). Rotkvice je također jednogodišnja zeljasta biljka, porijeklom je iz južne Azije, a uzgaja se kao povrtna kultura zbog zadebljalog hipoklotila (Umeljić, 2004).

#### Probir sjemenki

Sjeme bijele gorušice korišteno u ovom istraživanju nabavljeno je u Botaničkom vrtu „Fran Kušan“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu, dok je sjeme rotkvice komercijalno nabavljeno. U prvom koraku sjemenke bijele gorušice (iz 2017. i 2018. g.) su pomiješane. Isti postupak napravljen je i sa sjemenkama rotkvice (pomiješane su sjemenke rotkvice iz više komercijalnih vrećica) kako bi se izbjegao mogući utjecaj drugih čimbenika (različita godina berbe, uvjeti skladištenja) na rezultate. Potom su izdvojene sve smežurane i

sjemenke s plijesni kako ne bi dale negativne rezultate na klijavost, a zbog predispozicije da ne prokliju. Potreban broj sjemenki za pokus izračunat je s obzirom na broj radnih otopina 2-MNQ.

### 3.3.1.1. Priprema otopina 2-MNQ

Za ispitivanje klijavosti pripremljene su otopine 2-MNQ u rasponu koncentracija 1– 40 µg/ml. Najprije je pripremljena matična (tzv. *stock*) otopina 2-MNQ koncentracije 2 mg/ml u metanolu na način da se izvagalo 20 mg 2-MNQ na analitičkoj vagi te se kvantitativno prenijelo u odmjernu tikvicu od 10 ml. Potom je odmjerna tikvica nadopunjena metanolom u kojem se 2-MNQ otopio.

Radne otopine 2-MNQ u koncentracijama od 1, 5, 10, 20, 30 i 40 µg/ml pripremljene su tako što se matična otopina 2-MNQ razrijedila metanolom. Za izračun je korištena sljedeća formula:

$$\gamma_1 \times V_1 = \gamma_2 \times V_2$$

Tablica 1. Priprema radnih otopina 2-metoksi-1,4-naftokinona (2-MNQ) za tretman sjemenki bijele gorušice (*S. alba*) i rotkvice (*R. sativus*).

Potrebna koncentracija radne otopine 2-MNQ	Volumen matične otopine konc. 2 mg/ml (ml)	Volumen dodanog metanola (ml)
1 µg/ml	0,01	19,99
5 µg/ml	0,05	19,95
10 µg/ml	0,1	19,90
20 µg/ml	0,2	19,80
30 µg/ml	0,3	19,70
40 µg/ml	0,4	19,60

Priprema radnih otopina 2-MNQ prikazana je Tablicom 1. Izračunat volumen matične otopine 2-MNQ prebačen je u odmjernu tikvicu te su one nadopunjene do 20 ml metanolom. Metanol je odabran kao otapalo kako bi se 2-MNQ bolje otopio, ali i kako bi nakon što se filter papir impregnira odgovarajućom otopinom 2-MNQ lakše ispario.

Kao negativna kontrola korištena je destilirana voda, a pozitivna kontrola bila je 0,02M otopina CuSO<sub>4</sub>. Otopina CuSO<sub>4</sub> pripremljena je tako što se 0,16 g CuSO<sub>4</sub> odvagalo na analitičkoj vagi te se kvantitativno preneslo u odmjernu tikvicu od 50 ml. Odmjerna tikvica je potom do oznake nadopunjena destiliranom vodom.

### 3.3.1.2. Provođenje pokusa klijavosti

Pokus klijavosti proveden je u Petrijevim zdjelicama u koje su stavljeni prethodno izrezani filter papiri kao podloga za sjemenke. Postupak je istovjetan i za sjemenke bijele gorušice i rotkvice. Petrijeve zdjelice su prije samog eksperimenta oprane deterdžentom i destiliranom vodom te su pošpricane tehničkim etanolom, a količina izrezanih filter papira odgovarala je broju korištenih Petrijevih zdjelica s time da se pazilo da nisu zgužvani kako bi se kasnije nanosena otopina 2-MNQ ravnomjerno rasporedila. Svaka Petrijeva zdjelica označena je ili odgovarajućom koncentracijom radne otopine 2-MNQ ili pozitivnom ili negativnom kontrolom te brojem, budući da je svaka koncentracija 2-MNQ ispitana u triplikatu. Tako pripremljene Petrijeve zdjelice s filter papirom stavljene su pod UV-lampu u inkubator 20-tak minuta kako bi se i Petrijeve zdjelice i filter papir sterilizirali.

Nakon sterilizacije, filter papir je impregniran s 2 ml odgovarajuće radne otopine 2-MNQ u koncentracijama 1, 5, 10, 20, 30 i 40 µg/ml. Petrijeve zdjelice su ponovno stavljene u inkubator kako bi metanol ispario i omogućio da filter papir bude impregniran samo s odgovarajućom koncentracijom 2-MNQ.

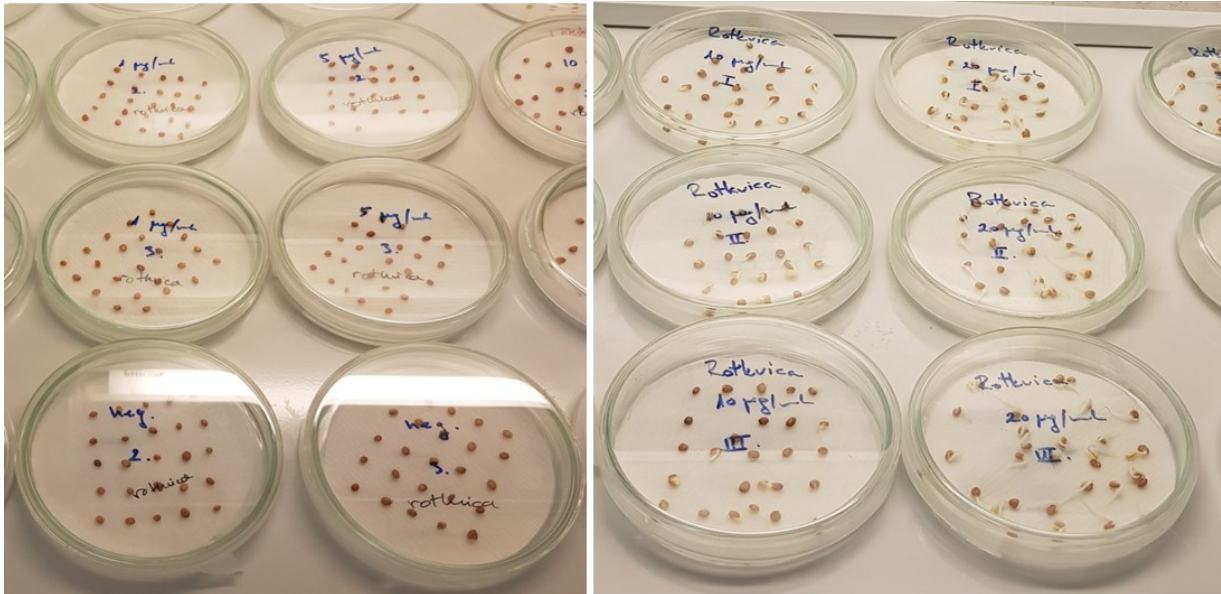
Prije stavljanja na filter papir, probrane sjemenke su isprane s 2 ml tehničkog etanola (70%-tni) te zatim tri puta s vodom kako bi ih dezinficirali (kao što je to napravljeno s Petrijevim zdjelicama i filter papirom pomoću UV-lampe u inkubatoru). U procesu ispiranja, sjemenke su prenesene u ependorfice u koje je najprije dodan tehnički etanol, potom su stavljene na vortex, višak etanola se odlio i zatim se na isti način provelo ispiranje s vodom i to tri puta kako bi bili sigurni da je sav tehnički etanol ispran.

Prije stavljanja sjemenki u Petrijeve zdjelice, na filter papir svake Petrijeve zdjelice dodano je po 2 ml deionizirane vode koja će omogućiti da se razviju klijanici. Potom su sterilizirane sjemenke stavljane na filter papir impregniran s odgovarajućom koncentracijom 2-MNQ svake Petrijeve zdjelice. U pojedinu Petrijevu zdjelicu stavljeno je po 25 sjemenki principom 5x5 (5 sjemenki u 5 redova). Petrijeve zdjelice potom su čvrsto zamotane parafilmom kako voda ne bi isparila, što bi onemogućilo sjemenkama da prokliju.



Isti postupak napravljen je i za pozitivnu (0,02 M CuSO<sub>4</sub> otopina) i negativnu (deionizirana voda) kontrolu; na sterilizirane Petrijeve zdjelice s filter papirom dodano je 2 ml 0,02 M CuSO<sub>4</sub>, odnosno 2 ml destilirane vode.

Svaka od pet ispitivanih otopina 2-MNQ napravljena je u triplikatu te su u triplikatu napravljene i pozitivna i negativna kontrola. Sjemenke su ostavljene u mraku u inkubatoru te se nakon tri dana proučavala klijavost i duljina korjenčića klijanaca (Slika 4).



Slika 4. Sjemenke rotkvice (*R. sativus*) prije (lijevo) i nakon (desno) 3-dnevne izloženosti otopini 2-metoksi-1,4-naftokinona; (slikala: A. Fajdetić).

### 3.3.1.3. Određivanje klijavosti i mjerenje duljine korjenčića

Nakon tri dana klijanja, u svakoj Petrijevoj zdjelici za obje biljne vrste određene su klijavost i duljina korjenčića.

Klijavost je određena tako da su u svakoj Petrijevoj zdjelici izbrojane proklijale sjemenke te je rezultat izražen kao broj proklijalih sjemenki na ukupan broj sjemenki u jednoj Petrijevoj zdjelici u postotku (%). Podaci su upisani u prethodno pripremljenu tablicu.

Duljina korjenčića svake proklijale sjemenke izmjerena je ravnalom te je dobiveni podatak upisan u prethodno pripremljenu tablicu. Svakom klijancu ravnalom je izmjerena duljina korjenčića (u mm).

### 3.3.2. Određivanje katalitičke aktivnosti SOD-a

#### 3.3.2.1. Priprema biološkog materijala

Za homogenizaciju biljnog tkiva klijanaca (nakon 3-dnevnog klijanja) bilo je potrebno pripremiti otopinu 5% TCA. Otopina se pripremila na način da se odvagalo 10 g TCA koja se zatim kvantitativno prenijela u odmjernu tikvicu od 200 ml. Nakon toga se tikvica nadopunila do oznake destiliranom vodom.

Klijanci iz jedne Petrijeve zdjelice najprije su odvagani te je zabilježena masa svježeg tkiva. Potom je na 100 mg svježeg tkiva dodano 0,5 ml 5%-tne otopine TCA te su klijanci homogenizirani u tarioniku s tučkom. Pripremljen homogenat je centrifugiran 10 minuta na 10000 okretaja po minuti. Potom je odvojen čisti supernatant u kojem je određena katalitička aktivnosti SOD-a.

#### 3.3.2.2. Mjerenje katalitičke aktivnosti SOD-a

Katalitička aktivnost SOD-a izmjerena je pomoću komercijalnog kita prema uputstvima proizvođača. Uzorci supernatanta biljnoga tkiva (klijanaca) nanoseni su u pločicu s 96 bunarića u duplikatu te je na njih dodan odgovarajući reagens. Nakon 30-minutne inkubacije, intenzitet apsorbancije izmjeren je na čitaču pločica pri valnoj duljini od 450 nm. Katalitička aktivnost SOD izračunata je na osnovu baždarnog pravca i izražena u U/ml.

### 3.4. Statistička obrada podataka

Dobiveni rezultati klijavosti, duljine korjenčića i katalitičke aktivnosti SOD za obje ispitivane biljne vrste prikazani su kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija (SD). Statistička analiza rezultata napravljena je pomoću računalnog programa Statistica 14.0.1.25. (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, SAD). Podaci su obrađeni na način da su se pojedinačno i međusobno usporedili kontrola i tretmani pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA test) te primjenom *Duncan's New Multiple Range Test*-a. Statistički značajnim smatrane su vrijednosti koje se razlikuju na razini  $p \leq 0,05$ .

Korelacije između izmjerenih varijabli određene su pomoću *Pearsonove* korelacije te je izračunat *Pearsonov* koeficijent korelacije (simbol malo slovo  $r$  ili  $rp$ ). Koeficijent korelacije pokazuje u kojoj su mjeri promjene vrijednosti jedne varijable povezane s promjenama vrijednosti druge varijable i kreće se u brojčanom rasponu od -1 do +1 s time da predznak ukazuje na smjer povezanosti varijabli (negativan, negativna korelacija, što znači da vrijednost jednog parametra raste dok drugog pada; i pozitivna, što znači da se oba parametra ponašaju isto, točnije njihove vrijednosti rastu ili padaju). Ako je koeficijent korelacije ( $rp$ ), neovisno o predznaku (negativna ili pozitivna), između 0,00-0,19, radi se o jako slaboj korelaciji, od 0,20-0,39 o slaboj korelaciji, od 0,40-0,59 o umjerenoj korelaciji, od 0,60-0,79 o jakoj korelaciji i od 0,80-1,00 o vrlo jakoj korelaciji.

Kako bi se dobio vizualni uvid između tri ključna parametra u ovome istraživanju: klijavosti sjemenki, dužine korjenčića i aktivnosti SOD-a, provedena je analiza glavnih komponenti (PCA, od engl. *Principal Component Analysis*). Navedena analiza temelji se na postavljanju korelacije između varijabli te grupiranju uzoraka u glavne komponente (engl. *principal components*). Rezultat je vizualni prikaz njihova odnosa iz kojeg se lako može zaključiti jesu li varijable međusobno slične ili različite. Varijable koje se nalaze zajedno (bliže), međusobno su sličnije, dok su one varijable koje se udaljenije, međusobno različite.

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Cilj ovog istraživanja bio je povezati učinak 2-MNQ sa stimulacijom ili inhibicijom klijanja te odrediti jesu li ta dva parametra u pozitivnoj ili negativnoj korelaciji, odnosno odrediti kako 2-MNQ utječe na klijavost sjemenki. Drugi cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi je li oksidacijski stres uključen u mehanizam djelovanja 2-MNQ na klijavost sjemenki. Istraživanje je provedeno na dvije biljne vrste, bijeloj gorušici (*S. alba*) i rotkvici (*R. sativus*). Najprije je određena klijavost (broj prokljalih sjemenki), zatim su izmjerene duljine korjenčića klijanaca, a potom je u homogentu klijanaca određena katalitička aktivnost enzima SOD. Klijanje sjemena je složeni proces, a u ovom istraživanju fokusiralo se na radikularnu protruziju gdje se zapažalo je li došlo do izbočenja korjenčića i potom se mjerila njegova duljina.

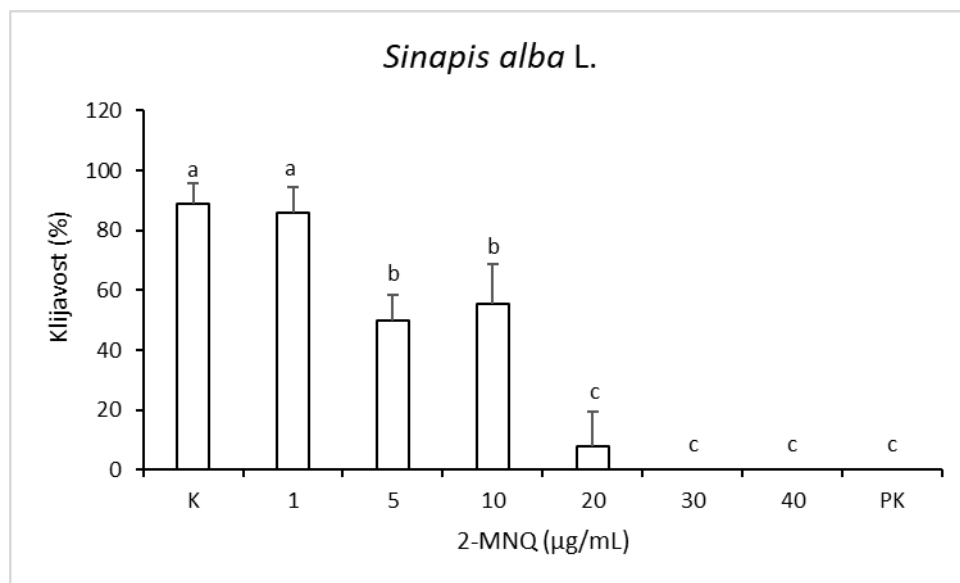
Prema definiciji, biološki pokus označava kvantitativno ili kvalitativno utvrđivanje biološke reakcije (efekta) neke tvari (kemijske, enzimske, hormonske, vitaminske, mikrobiološke i antibiotske) u osjetljivom organizmu (pokusna životinja, izolirani životinjski organ, mirkoorganizam) pri čemu se uspoređuje postignuti učinak (reakcija) s nekim određenim standardom ([www.enciklopedija.hr](http://www.enciklopedija.hr)). U ovom diplomskom radu ispitivano je kako će 2-MNQ utjecati na klijavost sjemenki dviju biljnih vrsta. Ispitivanje klijavosti sjemena jedna je od najjednostavnijih metoda ekološkog biomonitoringa (Di Salvatore i sur., 2008). Ova metoda razvijena je još prošlog stoljeća prvenstveno kako bi se utvrdilo kako klijavost sjemenki ovisi o uzorku tekućine s kojima se one tretiraju te kako bi se utvrdilo je li taj uzorak tekućine onečišćen, tj. toksičan za sjeme (OECD, 2003).

#### **4.1. Rezultati klijavosti i duljine korjenčića bijele gorušice**

Rezultati klijavosti bijele gorušice prikazani su grafički na Slici 5. Rezultati su prikazani kao postotak prokljalih sjemenki u odnosu na ukupan broj sjemenki u jednoj Petrijevoj zdjelici. Za pojedini tretman s 2-MNQ rezultati su prikazani kao aritmetička sredina  $\pm$  SD.

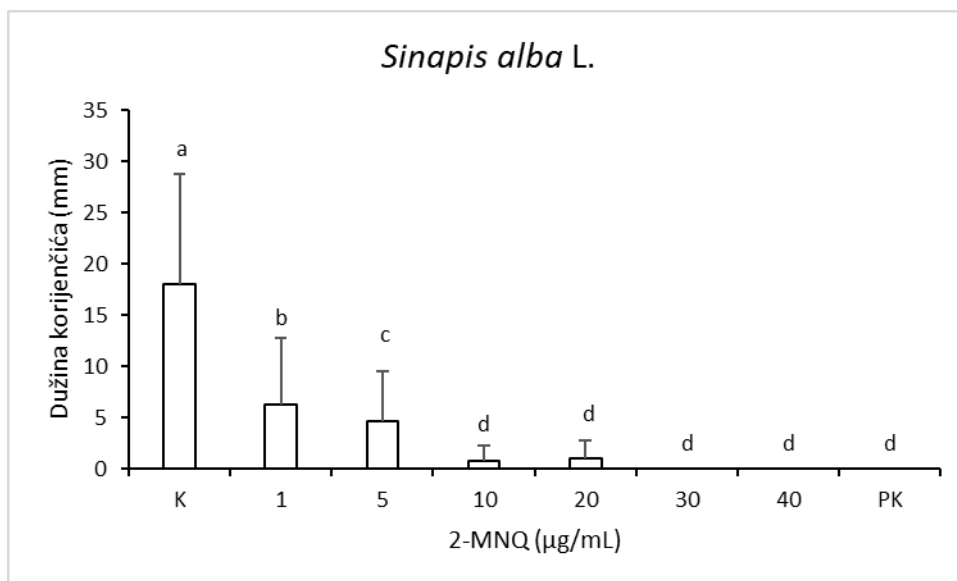
Kako je vidljivo iz grafičkog prikaza, negativna kontrola (tretman s destiliranom vodom) imao je najveći broj prokljalih sjemenki te je klijavost iznosila 89,0%. Broj prokljalih sjemenki u Petrijevoj zdjelici opadao je s porastom koncentracije 2-MNQ u odnosu na negativnu kontrolu. Kod koncentracije 2-MNQ od 1  $\mu$ g/ml postotak prokljalih sjemenki iznosio je 86,0% te se nije značajnije razlikovao od negativne kontrole. Značajan pad klijavosti sjemenki bijele gorušice zabilježen je nakon tretmana s 2-MNQ u koncentraciji 5  $\mu$ g/ml te je postotak klijavosti iznosio 50,0%. Veće koncentracije 2-MNQ (10 i 20  $\mu$ g/ml) također su

značajno inhibirale klijavosti te je klijavost iznosila svega 55,5% i 8,0%. Očito je dakle da 2-MNQ na neki način inhibira klijanje sjemenki, tj. interferira s procesima potrebnim za razvoj klice. Taj mehanizam potrebno je istražiti. Koncentracije 2-MNQ od 30 i 40  $\mu\text{g/ml}$ , kao i pozitivna kontrola u potpunosti su inhibirale klijavost sjemenki. Dobivene vrijednosti SD su dosta velike (veće od 17%) za koncentracije 2-MNQ 5 – 20  $\mu\text{g/ml}$  te samim time izračunata prosječna klijavost tj. aritmetička sredina, ne predstavlja „dobro“ rezultate intervala, ali se to može pripisati tome što su rasponi između samih koncentracija očito dosta veliki te ispitivana biljna vrsta vrlo osjetljivo reagira i na male promjene u koncentracijama 2-MNQ.



Slika 5. Klijavost bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) nakon 3-dnevnog tretmana s 2-metoksi-1,4-naftokinonom (2-MNQ) u koncentracijskom rasponu 1 – 40  $\mu\text{g/ml}$ . Stupići označeni različitim slovom međusobno su statistički značajno različiti.

Na Slici 6. prikazani su rezultati duljine korjenčića klijanaca bijele gorušice. Sukladno rezultatima klijavosti i duljina korjenčića padala je s povećanjem koncentracije 2-MNQ. Pri ispitivanju duljine korjenčića već je koncentracija 2-MNQ od 1  $\mu\text{g/ml}$  značajno smanjila duljinu korjenčića u odnosu na negativnu kontrolu. 2-MNQ u koncentracijama 30 i 40  $\mu\text{g/ml}$  kao i pozitivna kontrola u potpunosti su inhibirali klijanje (Slika 5), što je u direktnoj vezi sa potpunom inhibicijom rasta korjenčića (Slika 6). Stoga duljinu korjenčića pri tim tretmanima nije bilo moguće izmjeriti (ona je iznosila 0 mm).

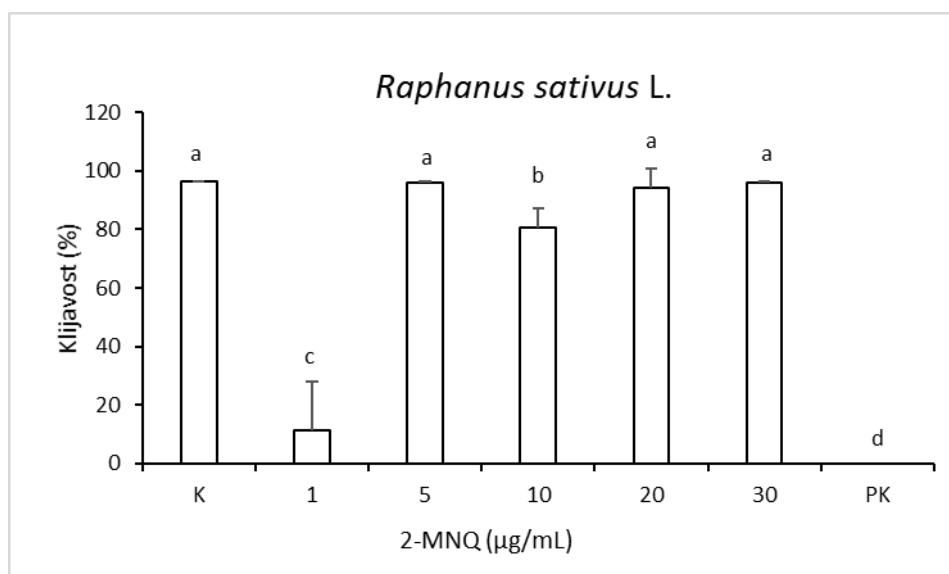


Slika 6. Duljine korjenčića sjemenki bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) nakon 3-dnevnog tretmana s 2-metoksi-1,4-naftokinonom (2-MNQ) u koncentracijskom rasponu 1 – 40 µg/ml. Stupići označeni različitim slovom međusobno su statistički značajno različiti.

#### 4.2. Rezultati klijavosti i duljine korjenčića rotkvice

Rezultati klijavosti rotkvice prikazani su grafički na Slici 7. Ono što se prije svega uočava jest kako pri svakoj vrijednosti koncentracije 2-MNQ postoji određena klijavost, za razliku od rezultata dobivenih kod bijele gorušice. Klijavost je najveća pri koncentracijama od 5, 20 i 30 µg/ml te iznosi 94,4 – 96,1%. Iz ovog se odmah nameće zaključak kako 2-MNQ čak ni u najvećoj koncentraciji ne inhibira klijanje sjemenki rotkvice. Vrijednosti prosječne klijavosti za svaku koncentraciju 2-MNQ blizu su ili istovjetne vrijednostima negativne kontrole (96,3%), izuzev vrijednosti pri koncentraciji od 1 i 10 µg/ml, što možemo pripisati biološkom pokusu. Kao i u pokusu s bijelom gorušicom, i u ovom pokusu je otopina CuSO<sub>4</sub> (pozitivna kontrola) u potpunosti inhibirala klijavost. Na temelju dobivenih rezultata može se reći kako 2-MNQ nema inhibitorski utjecaj na klijavost sjemenki, čak suprotno tome, moguć je određen stimulacijski učinak. Dobivene niske vrijednosti SD-a potvrđuju te rezultate. Moguć stimulacijski učinak ispitan je na način da se pokus klijavosti još jednom ponovio, pri čemu su dobiveni rezultati po vrijednostima bili slični onima iz prvog provedenog eksperimenta.

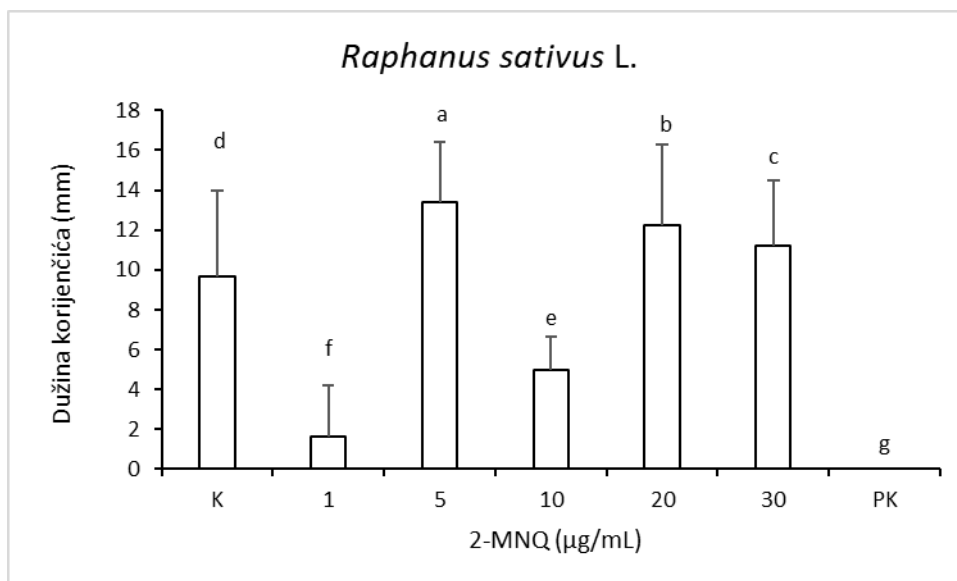
Mehanizam navedene tvrdnje tek se treba istražiti te daje uvid kako biljne vrste, čak i srodne taksonomski, reagiraju drugačije na različite stimulanse iz okoline.



Slika 7. Klijavost rotkvice (*Raphanus sativus* L.) nakon 3-dnevnog tretmana s 2-metoksi-1,4-naftokinonom (2-MNQ) u koncentracijskom rasponu 1 – 30 µg/ml. Stupići označeni različitim slovom međusobno su statistički značajno različiti.

Rezultati duljine korjenčića klijanaca rotkvice prikazani su grafički Slikom 8. Dobivene vrijednosti duljine korjenčića prate rezultate klijavosti te su najveće izmjerene duljine upravo one pri koncentracijama 5, 20 i 30 µg/ml te iznose 13,2 mm, 12,3 mm i 11,0 mm. Ono što se na temelju navedenih vrijednosti jasno uočava, a što možda nije bilo toliko jasno izraženo kod klijavosti, jest da su duljine korjenčića za spomenute vrijednosti dulje i od negativne kontrole (9,7 mm), što znači da 2-MNQ ne samo da nema utjecaja na duljinu korjenčića, već je ona moguće i stimulirajuća. Prosječna vrijednost duljine korjenčića kod koncentracije 10 µg/ml pokazuje određeno odstupanje, no to odstupanje možemo pripisati tome što je ovo ipak biološki pokus te su određene nepravilnosti dozvoljene. Potpuna inhibicija rasta korjenčića zabilježena je kod pozitivne kontrole te duljinu korjenčića nije bilo moguće izmjeriti (iznosila je 0 mm).

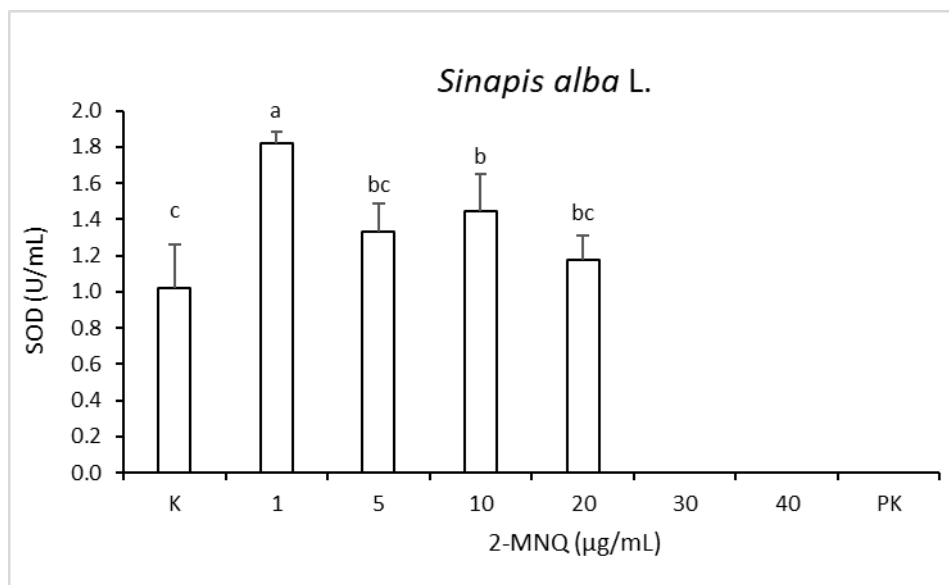




Slika 8. Dužine korjenčića rotkvice (*Raphanus sativus* L.) nakon 3-dnevnog tretmana s 2-metoksi-1,4-naftokinonom (2-MNQ) u koncentracijskom rasponu 1 – 30 µg/ml. Stupići označeni različitim slovom međusobno su statistički značajno različiti.

#### 4.3. Rezultati katalitičke aktivnosti SOD-a bijele gorušice

Na Slici 9. prikazani su rezultati katalitičke aktivnosti SOD-a u homogenatu tkiva klijanaca bijele gorušice. Iz grafičkog prikaza lako se može uočiti kako je aktivnost SOD-a, a samim time i razina oksidacijskog stresa dosta visoka pri većini ispitivanih koncentracija 2-MNQ. Raspon aktivnosti SOD-a kreće se između 1,02 i 1,82 U/ml. Najmanja aktivnost SOD-a izmjerena je kod negativne kontrole, a najveća aktivnost SOD-a izmjerena je pri koncentracijama otopine 2-MNQ od 1 i 10 µg/ml. Iz navedenog se može zaključiti kako je biljka tada bila izložena najvećem oksidacijskom stresu te je bilo potrebno proizvesti veliku količinu SOD-a kako bi se od njega obranila i samim time omogućila sjemenkama da prokliju. Aktivnost enzima ista je pri koncentracijama 2-MNQ od 5 i 20 µg/ml. S obzirom da sjemenke bijele gorušice nisu proklijale nakon tretmana s 2-MNQ pri koncentraciji od 30 i 40 µg/ml te kod pozitivne kontrole, nije bilo moguće izmjeriti aktivnost enzima.



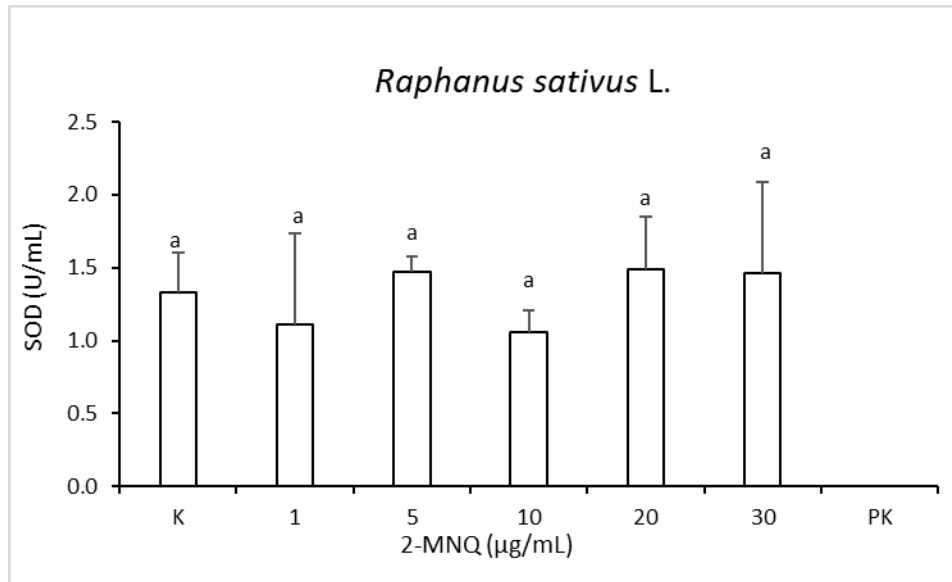
Slika 9. Katalitička aktivnost superoksid dizmutaze (SOD) klijanaca bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) nakon 3-dnevnog tretmana s 2-metoksi-1,4-naftokinonom (2-MNQ) u koncentracijskom rasponu 1 – 40 µg/ml. Stupići označeni različitim slovom međusobno su statistički značajno različiti.

U istraživanju u kojem je ispitan učinak 2-MNQ u koncentracijskom rasponu 1 – 40 µg/ml i 3-dnevnoj izloženosti na parametre oksidacijskog stresa bijele gorušice uočen je porast GSH s porastom koncentracije 2-MNQ te pad malondialdehida (MDA), pokazatelja oksidacijskog oštećenja lipida (Kenfelj, 2022). U tom istraživanju zaključeno je da izloženost 2-MNQ uzrokuje oksidacijski stres u klijanaca bijele gorušice. Rezultati ovoga istraživanja u sukladnosti su s navedenim istraživanjem.

#### 4.4. Rezultati katalitičke aktivnosti SOD-a rotkvice

Rezultati aktivnosti SOD-a u homogenatu tkiva klijanaca rotkvice prikazani su grafički na Slici 9. Izmjerena aktivnost SOD-a nalazi se u rasponu od 1,11 do 1,49 U/ml. Sjemenke koje su tretirane s CuSO<sub>4</sub> (pozitivna kontrola) nisu prokljale te u njima katalitičku aktivnost SOD nije bilo moguće odrediti. Razina oksidacijskog stresa u klijanaca rotkvice tretiranim svim ispitivanim koncentracijama otopine 2-MNQ i negativnoj kontroli je približno ista te nisu uočena značajnija odstupanja. Iz navedenog se može zaključiti kako 2-MNQ nije djelovao

toliko „stresno“ na rotkvicu, kao na bijelu gorušicu gdje su izmjerene puno veće vrijednosti aktivnosti samog enzima. Dobiveni rezultati pokazuju kako biljne vrste očito ne reagiraju isto na izloženost 2-MNQ što se vidi i po rezultatima za aktivnost SOD-a.



Slika 10. Katalitička aktivnost superoksid dizmutaze (SOD) klijanaca rotkvice (*Raphanus sativus* L.) nakon 3-dnevnog tretmana s 2-metoksi-1,4-naftokinonom (2-MNQ) u koncentracijskom rasponu 1– 30 µg/ml. Stupići označeni različitim slovom međusobno su statistički značajno različiti.

U istraživanju koje je proveo Kraljević (2022) praćena je razina antioksidansa antocijanina i GSH te MDA u klijancima rotkvice nakon tretmana s 2-MNQ (u koncentracijskom rasponu 1 – 30 µg/ml kroz 3 dana). U tom istraživanju tretman s 2-MNQ uzrokovao je pad razine GSH, ali i pad MDA. To bi moglo ukazivati na činjenicu da je 2-MNQ u ispitivanim koncentracijama aktivirao antioksidacijsku obranu, što je rezultiralo sa smanjenjem oksidacijskog oštećenja lipida. U ovome istraživanju nije zabilježena značajna promjena u aktivnosti SOD-a nakon tretmana rotkvice s 2-MNQ, no blagi porast katalitičke aktivnosti SOD-a se može primijetiti. Takvi rezultati ukazuju da je 2-MNQ moguće aktivirao antioksidacijsku obranu u klijanaca rotkvice.

#### 4.5. Korelacija rezultata klijavosti, duljine korjenčića i aktivnosti SOD

Za svaku biljnu vrstu dobiveni rezultati klijavosti, duljine korjenčića i aktivnosti SOD-a međusobno su uspoređeni korištenjem *Pearsonove* korelacije (izračunavanjem *Pearsonovog* koeficijenta) (Tablica 2 i Tablica 3). Lako se može uočiti kako su korelacije između biljnih vrsta za određene parametre jako različite. I bijela gorušica i rotkvice pokazale su jaku i vrlo jaku korelaciju između klijavosti i duljine korjenčića, što je i bilo za očekivati. Kod bijele gorušice koeficijent korelacije između izmjerenih vrijednosti za aktivnosti SOD-a i klijavosti iznosi 0,29, a između aktivnosti SOD-a i duljine korjenčića iznosi -0,40 te se može reći da su aktivnost SOD-a i duljina korjenčića u jako slaboj korelaciji te negativnoj umjerenoj korelaciji koja nije statistički značajna. Kod rotkvice su pak rezultati u potpunosti drugačiji. Jak koeficijent korelacije postoji između vrijednosti za aktivnost SOD-a i klijavosti te iznosi 0,67, dok je između aktivnosti SOD-a i duljine korjenčića ta korelacija još jača i koeficijent korelacije iznosi 0,94.

Tablica 2. Korelacije rezultata za klijavost, duljinu korjenčića i katalitičku aktivnost superoksid dizmutaze (SOD) dobivene za klijanke bijele gorušice (*S. alba*) nakon 3-dnevnog tretmana s 2-metoksi-1,4-naftokinonom (2-MNQ) u koncentracijskom rasponu 1 – 40 µg/ml.

Varijable	Klijavost	Dužina korijenčića	SOD
Klijavost	1,00	0,71	0,29
Dužina korijenčića	0,71	1,00	-0,40
SOD	0,29	-0,40	1,00

Crveno označene vrijednosti su statistički značajne pri  $p < 0,05$ ,  $N=5$

Tablica 3. Korelacije rezultata za klijavost, duljinu korjenčića i katalitičku aktivnost superoksid dizmutaze (SOD) dobivene za klijanke rotkvice (*R. sativus*) nakon 3-dnevnog tretmana s 2-metoksi-1,4-naftokinonom (2-MNQ) u koncentracijskom rasponu 1 – 30 µg/ml.

Varijable	Klijavost	Dužina korijenčića	SOD
Klijavost	1,00	0,86	0,67
Dužina korijenčića	0,86	1,00	0,94
SOD	0,67	0,94	1,00

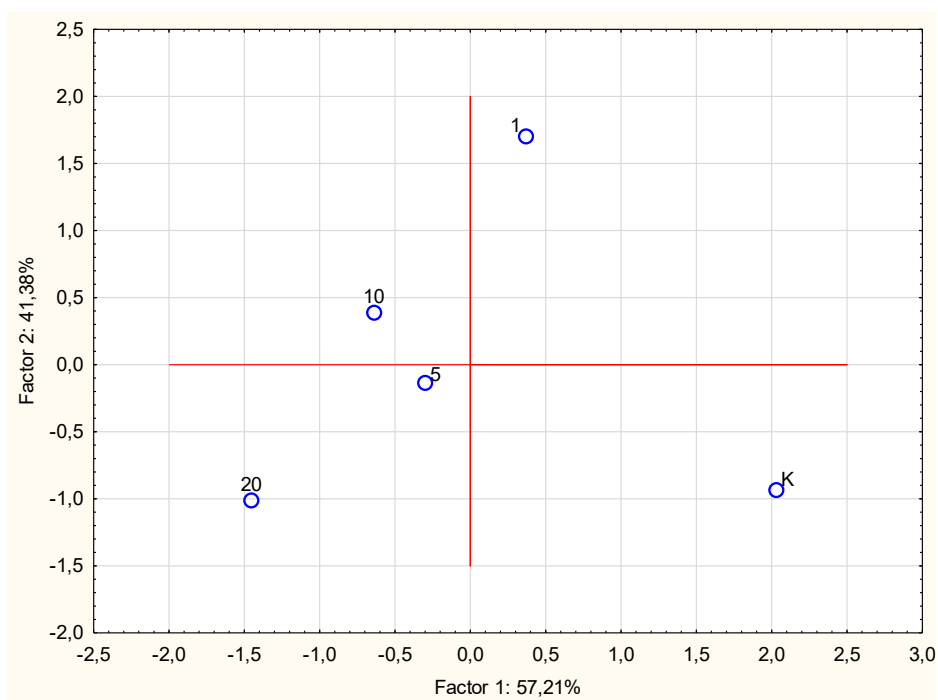
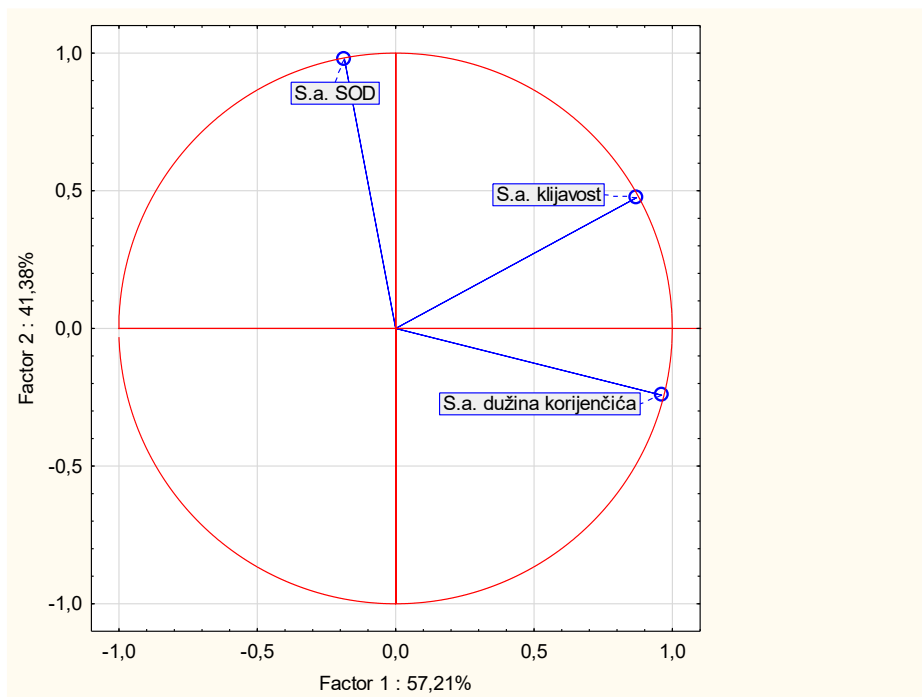
Crveno označene vrijednosti su statistički značajne pri  $p < 0,05$ ,  $N=6$

#### 4.5. Analiza glavnih komponenti

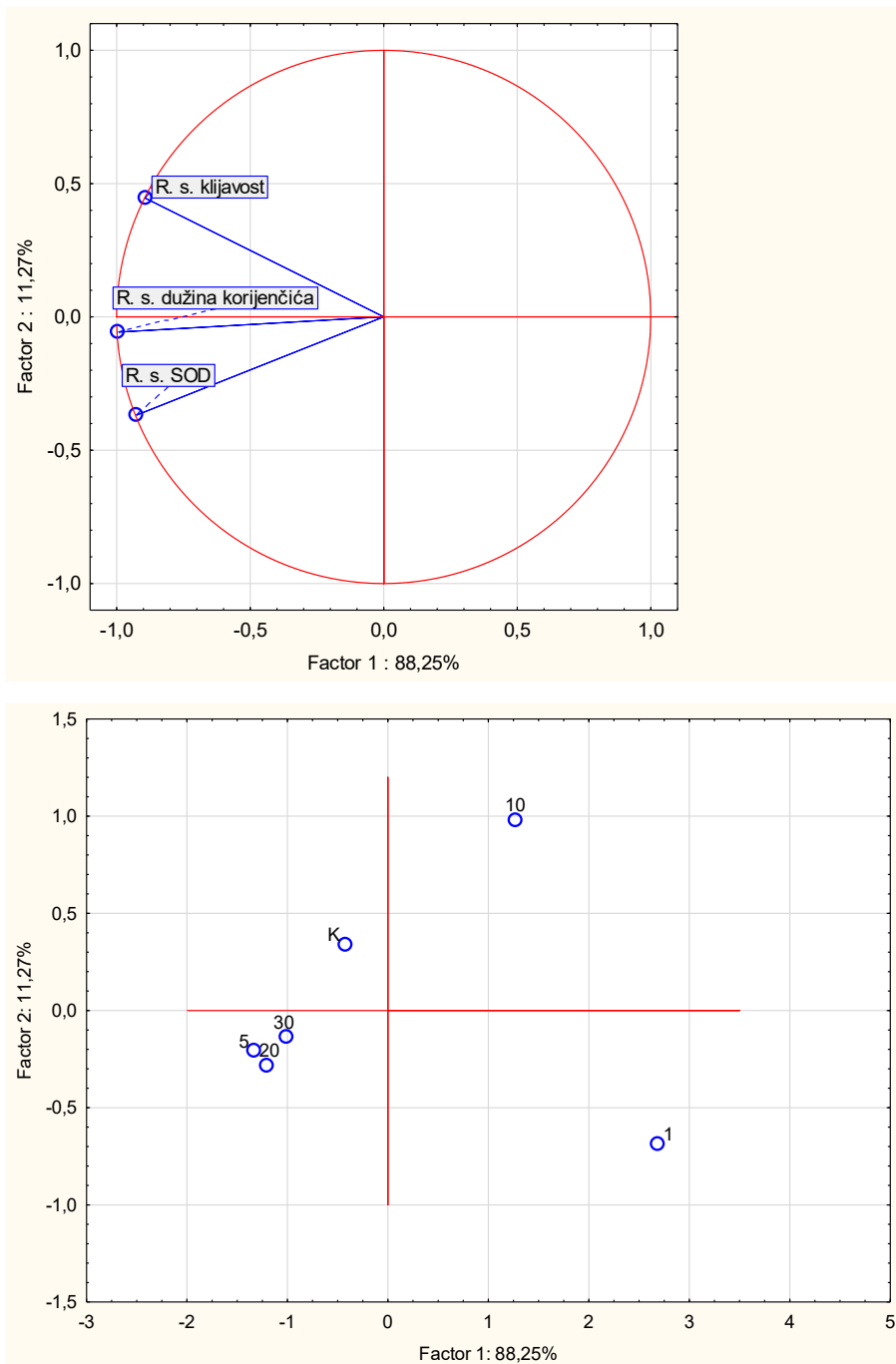
Kako bi se dobio vizualni uvid u odnose između parametara koji su izmjereni u ovome istraživanju: klijavosti sjemenki, dužina korjenčića klijanaca i aktivnost SOD-a, provedena je analiza glavnih komponenti, PCA. Navedena analiza temelji se na postavljanju korelacije između varijabli te grupiranju uzoraka u glavne komponente. Rezultat je vizualni prikaz njihova odnosa iz kojeg se lako može zaključiti jesu li varijable međusobno slične ili različite. Varijable koje su zajedno, međusobno su sličnije, dok su one udaljenije međusobno različite (Vujčić Bok i sur., 2022; Vujčić Bok i sur., 2023).

PCA-analize za bijelu gorušicu i rotkvicu prikazane su Slikama 11. i 12. Prva (faktor 1) i druga (faktor 2) glavna komponenta kod bijele gorušice opisuju 57,21% i 41,38%, a kod rotkvice prva (faktor 1) i druga (faktor 2) glavna komponenta opisuju 88,25% i 11,27% varijance što zajedno predstavlja 98,59% ukupne varijabilnosti podataka za bijelu gorušicu i 99,52% ukupne varijabilnosti podataka za rotkvicu. Kod bijele gorušice varijable klijavosti i duljine korjenčića su međusobno sličnije, nego s varijablom SOD-a. Varijable klijavosti i duljine korjenčića kod rotkvice su međusobno slične, kao i navedene varijable sa SOD-om. Sličnost je veća između SOD-a i duljine korjenčića kod rotkvice.

Za bijelu gorušicu iz PCA dijagrama je vidljivo da su uzorci negativne kontrole najudaljeniji od uzoraka sa najvećom koncentracijom 2-MNQ što upućuje na njihovu različitost dok je najmanja međusobno udaljenost zabilježena u uzorcima koncentracije 5 i 10  $\mu\text{g/ml}$  te upućuje na njihovu sličnost. Uzorci negativne kontrole kod rotkvice najudaljeniji (najrazličitiji) su od uzoraka sa najmanjom koncentracijom 2-MNQ, a najmanja udaljenost zabilježena je između uzoraka koncentracije 5, 20 i 30  $\mu\text{g/ml}$  2-MNQ što upućuje na njihovu sličnost. Uzorak koncentracije 1  $\mu\text{g/ml}$  2-MNQ najbliži je varijabli SOD i varijabli klijanje dok je uzorak negativne kontrole najbliži varijablama klijanja i dužine korjenčića kod bijele gorušice. Kod rotkvice uzorci koncentracije 5, 20 i 30  $\mu\text{g/ml}$  2-MNQ najbliži su varijablama klijanja i dužine korjenčića. Iz navedenih podataka je vidljivo da bijela gorušica i rotkvica imaju drugačiji odgovor na 2-MNQ te da je bijela gorušica osjetljivija na 2-MNQ.



Slika 11. Rezultati analize glavnih komponenti (PCA) za bijelu gorušicu (*Sinapis alba* L.) nakon 3-dnevnog tretmana s 2-metoksi-1,4-naftokinonom (2-MNQ) u koncentracijskom rasponu 1 – 40  $\mu\text{g/ml}$ .



Slika 12. Rezultati analize glavnih komponenti (PCA) za rotkvicu (*Raphanus sativus* L.) nakon 3-dnevnog tretmana s 2-metoksi-1,4-naftokinonom (2-MNQ) u koncentracijskom rasponu 1 – 30  $\mu\text{g/ml}$ .

## **5. ZAKLJUČCI**



Cilj ovoga istraživanja bilo je ispitati utjecaj 2-MNQ na klijavost bijele gorušice (*S. alba*) i rotkvice (*R. sativus*). Na temelju statistički obrađenih rezultata, jasno se može zaključiti kako je utjecaj na klijavost različit te ovisi i o koncentraciji 2-MNQ i o samoj biljnoj vrsti. Bijela gorušica osjetljivija je na djelovanje 2-MNQ, dok 2-MNQ u ispitivanim koncentracijama nije imao značajniji utjecaja na klijavost rotkvice. Mehanizam toksičnog učinka 2-MNQ može se povezati s oksidacijskim stresom s obzirom da je tretman s 2-MNQ doveo do promjene aktivnosti SOD-a u osjetljivijoj ispitivanoj vrsti (bijeloj gorušici). Ipak, točan mehanizam djelovanja 2-MNQ se tek treba istražiti. Ovime je pokazano kako i najjednostavniji biološki pokus itekako može dati vrijedne informacije koje će se moći iskoristiti za daljnje proučavanje 2-MNQ i njemu srodnih spojeva, a potencijalno u budućnosti i dovesti do registracije novog lijeka.

## **6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA**

ABA-*abscisic acid*, abscizinska kiselina  
DNA-deoksiribonukleinska kiselina  
GA-*gibberellic acid*, giberelinska kiselina  
GSH-glutation  
2-MNQ- 2-metoksi-1,4-naftokinon  
K-negativna kontrola  
MDA-malondialdehid  
PCA- *Principal Component Analysis*, analiza glavnih komponenti  
PK-pozitivna kontrola  
RNS-*reactive nitrogen species*, reaktivni dušikovi spojevi  
ROS- *reactive oxygen species*, reaktivni kisikovi spojevi  
SD-standardna devijacija  
SOD- superoksid dizmutaza  
TCA-trikloroocetna kiselina

## **7. LITERATURA**

- Ahmadi ES, Tajbakhsh A, Iranshahy M, Asili J, Kretschmer N, Shakeri A, Sahebkar A. Naphthoquinone derivatives isolated from plants: recent advances in biological activity. *Mini Rev Med Chem*, 2020, 20, 2019-2035.
- Biološki pokus, *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*, Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021, <http://www.enciklopedija.hr>, pristupljeno 28.2.2023.
- Di Salvatore M, Carafa AM, Carratu G. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation test: A comparison of two growth substrates. *Chemosphere*, 2008, 73, 1461-1464.
- Dmitry A, Polonik S. 1,4-naphthoquinones: some biological properties and application. *Chem Pharm Bull*, 2020, 68, 46-57.
- Futuro DO, Ferreira PG, Nicoletti CD, Borba-Santos LP, Da Silva FC, Rozental S, Ferreira VF. The antifungal activity of naphthoquinones: An integrative review. *A Bra Aca Sci*, 2018, 90, 1187-1214.
- Germinacija, *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*, Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021, <http://www.enciklopedija.hr>, pristupljeno 28.2.2023.
- Germinating seeds, 2021, <https://extension.wvu.edu/>, pristupljeno 11.2.2023.
- Global medicine spending and usage trends: Outlook to 2025, 2021, <https://www.iqvia.com/>, pristupljeno 18.2.2023.
- Grlić Lj. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. Zagreb, August Cesarec, 1990.
- Kenfelj I. Parametri oksidacijskog stresa bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) nakon tretmana s 2-metoksi-1,4-naftokinonom. Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2022.
- Kraljević S. Učinak 2-metoksi-1,4-naftokinona na parametre oksidacijskog stresa u klijanaca obične rotkvice (*Raphanus sativus* L.). Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2022.
- Lawsone methyl ether, 2-metoksi-1,4-naphthoquinone, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, pristupljeno 16.3.2023.
- Makhaye G, Mofokeng MM, Tesfay S, Aremu AO, Van Staden J, Amoo SO. Influence of plant biostimulant application on seed germination. *Aca Pre*, 2021, 109-135.
- Meyer GW, Bahamon Naranjo MA, Widhalm JR. Convergent evolution of plant specialized 1,4-naphthoquinones: metabolism, trafficking and resistance to their alleopathic effects. *J Exp Bot*, 2021, 72, 167-176.
- Naftokinoni, *Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje*, Leksikografski zavod Miroslav Krleža, 2021., <http://www.enciklopedija.hr>, pristupljeno 28.2.2023.

- OECD guideline for the testing of chemicals, Terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test, 2003, <https://www.oecd.org/>, pristupljeno 18.2.2023.
- Parčetić-Kostelac I, Bešlo D, Šperanda M, Jović T, Đidara M, Kopačin T, Jozinović A. Oksidacijski stres u uvjetima intenzivnog fizičkog napora u ljudi i životinja. *Stočarstvo*, 2016, 70, 71-92.
- Perković I. Traženje spoja uzora. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2019.
- Umeljić V. U svijetu cvijeća i pčela: atlas medonosnog bilja, Split, Ilija Broković, 2004.
- Vladimir Knežević S, Aromatski poliketidi. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2018.
- Vujčić Bok V, Gerić M, Gajski G, Gagić S, Domijan A.-M. Phytotoxicity of Bisphenol A to *Allium cepa* Root Cells Is Mediated through Growth Hormone Gibberellic Acid and Reactive Oxygen Species. *Molecules*, 2023, 28, 2046.
- Vujčić Bok V, Šola I, Rusak G. Lemon Juice Formulations Modulate *In Vitro* Digestive Recovery of Spinach Phytochemicals. *Food Technol Biotechnol*, 2022, 60, 293–307.
- Wang F, Zhang YQ. Protein and peptide nanoparticles for drug delivery. U: *Advances in protein chemistry and structural biology*, 2015.
- Wang YC, Li WY, Wu DC, Wang JJ, Wu CH, Liao JJ, Lin CK. In vitro activity of 2-methoxy-1,4-naphthoquinone and Stigmasta-7,22-diene-3 $\beta$ -ol from *Impatiens balsamina* L. against multiple antibiotic resistant *Helicobacter pylori*. *Evid-based Compl Alter Med*, 2011, 704721.
- Wong TY, Menaga S, Huang CY, Ho SHA, Gan SC, Lim YM. 2-methoxy-1,4-naphthoquinone (MNQ) regulates cancer key genes of MAPK, PI3K and NF- $\kappa$ B pathways in Raji cells. *Genomics Inform*, 2022, 20(1), e7.
- Younus H. Therapeutic potential of superoxide dismutase. *Int J Health Sci*, 2018, 12, 88-93.
- Zhu L, Li K, Liu K, Liu M, Ma S, Cai W. Anti-cancer research on *Arnebiae radix*-derived naphthoquinone in recent five years. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2022, 17, 218-230.

## **8. SAŽETAK / SUMMARY**

2-metoksi-1,4-naftokinon (2-MNQ) je prirodni derivat 1,4-naftokinona koji je u dosad provedenim ispitivanjima pokazao antipruritično, protuupalno, antialergijsko, antimikrobno i antikancerogeno djelovanje. U ovom istraživanju ispitan je utjecaj 2-MNQ na klijanje sjemenki i razinu oksidacijskog stresa u klijanaca. Kao biljni model korištene su sjemenke dviju biljnih vrsta: bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) i rotkvice (*Raphanus sativus* L.). Sjemenke su bile izložene 2-MNQ u koncentracijama 1, 5, 10, 20, 30 i 40 µg/ml kroz 3 dana. U pokus su bile uključene negativna kontrola (sjemenke izložene 3 dana destiliranoj vodi) i pozitivna kontrola (sjemenke izložene 3 dana 0,02M otopini CuSO<sub>4</sub>). Nakon 3-dnevne izloženosti, za obje biljne vrste određena je klijavost (%) i duljina korjenčića (mm) te je u homogenatu klijanaca određena katalitička aktivnost SOD (U/ml). Podaci su statistički obrađeni pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA test) te primjenom *Duncan's New Multiple Range Test*-a. Također, određena je korelacija između mjerenih parametara te analiza glavnih komponenti. Statistički značajnim smatrane su vrijednosti koje se razlikuju na razini  $p \leq 0,05$ .

Povećanjem koncentracije 2-MNQ opao je broj prokljalih sjemenki bijele gorušice i sukladno tome padala je duljina korjenčića, a 2-MNQ u koncentraciji 30 i 40 µg/ml u potpunosti je inhibirao klijavost sjemenki. To ukazuje da 2-MNQ inhibira klijanje sjemenki bijele gorušice. S druge strane 2-MNQ nije imao utjecaja na klijanje rotkvice. U klijanaca bijele gorušice s koncentracijom 2-MNQ rasla je aktivnost SOD-a te je najveća aktivnost SOD-a izmjerena pri koncentracijama 2-MNQ od 1 i 10 µg/ml. Iz navedenog se može zaključiti kako je biljka tada bila izložena najvećem oksidacijskom stresu te je bilo potrebno proizvesti veliku količinu SOD-a kako bi se od njega obranila i samim time omogućila sjemenkama da prokliju. Katalitička aktivnost SOD-a u klijanaca rotkvice pri svim koncentracijama otopine 2-MNQ bila je približno ista te nisu uočena odstupanja.

Utjecaj 2-MNQ na klijavost sjemenki je različit te ovisi i o koncentraciji 2-MNQ i o samoj biljnoj vrsti. Bijela gorušica osjetljivija je na djelovanje 2-MNQ, dok 2-MNQ u ispitivanim koncentracijama nije imao utjecaja na klijavost rotkvice. Mehanizam toksičnog učinka 2-MNQ može se povezati s oksidacijskim stresom s obzirom da je tretman s 2-MNQ doveo do promjene aktivnosti SOD-a u bijeloj gorušici.



2-methoxy-1,4-naphthoquinone (2-MNQ) is a natural derivative of 1,4-naphthoquinone which has shown antipruritic, anti-inflammatory, anti-allergic, antimicrobial and anti-cancer effects. In this study the influence of 2-MNQ on seed germination and the level of oxidative stress was investigated. As a plant model the seeds of two plant species were used: white mustard (*Sinapis alba* L.) and radish (*Raphanus sativus* L.). The seeds were exposed to 2-MNQ in concentrations of 1, 5, 10, 20, 30 and 40 µg/ml for 3 days. The study included a negative control (seeds exposed to distilled water for 3 days) and a positive control (seeds exposed to 0.02M CuSO<sub>4</sub> solution for 3 days). After a 3-day exposure, germination (%) and root length (mm) were measured, and in seedlings homogenate catalytic activity of SOD (U/ml) was determined. Data were statistically processed using one-way analysis of variance (ANOVA test) and Duncan's New Multiple Range Test as well as tested for correlation and Principal Component Analysis. Significance level was set at  $p \leq 0.05$ .

With the increase of 2-MNQ concentration the number of germinated seeds of white mustard decreased and 2-MNQ in concentrations of 30 and 40 µg/ml completely ceased germination of white mustard. In parallel the decrease in the length of the radicle with the increase of 2-MNQ concentration was recorded. Thus, 2-MNQ inhibits the germination of white mustard seeds. On contrary, 2-MNQ had no impact on germination of radish. In white mustard seedlings with the increase of 2-MNQ concentration the increase of SOD activity is observed, and the highest SOD activity is recorded at 2-MNQ concentrations 1 and 10 µg/ml. Therefore, it can be concluded that the plant was then exposed to the greatest oxidative stress, and it was necessary to produce a large amount of SOD in order to defend against it and at the same time enable germination. In radish seedlings the catalytic activity of SOD at all concentrations of the 2-MNQ was approximately the same, with no deviations.

The impact of 2-MNQ on the seed germination is different and depends on the concentration of 2-MNQ and the plant species itself. White mustard is more sensitive to 2-MNQ, while 2-MNQ in tested concentrations had no impact on radish. The mechanism of the toxic effect of 2-MNQ can be related to oxidative stress, considering that treatment with 2-MNQ led to a change in SOD activity in white mustard.

**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

### UTJECAJ 2-METOKSI-1,4-NAFTOKINONA NA KLIJAVOST BIJELE GORUŠICE (*Sinapis alba* L.) I ROTKVICE (*Raphanus sativus* L.)

Ana Fajdetić

2-metoksi-1,4-naftokinon (2-MNQ) je prirodni derivat 1,4-naftokinona koji je u dosad provedenim ispitivanjima pokazao antipruritično, protuupalno, antialergijsko, antimikrobno i antikancerogeno djelovanje. U ovom istraživanju ispitan je utjecaj 2-MNQ na klijanje sjemenki i razinu oksidacijskog stresa u klijanaca. Kao biljni model korištene su sjemenke dviju biljnih vrsta: bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) i rotkvice (*Raphanus sativus* L.). Sjemenke su bile izložene 2-MNQ u koncentracijama 1, 5, 10, 20, 30 i 40  $\mu\text{g/ml}$  kroz 3 dana. U pokus su bile uključene negativna kontrola (sjemenke izložene 3 dana destiliranoj vodi) i pozitivna kontrola (sjemenke izložene 3 dana 0,02M otopini  $\text{CuSO}_4$ ). Nakon 3-dnevne izloženosti, za obje biljne vrste određena je klijavost (%) i duljina korjenčića (mm) te je u homogenatu klijanaca određena katalitička aktivnost SOD (U/ml). Podaci su statistički obrađeni pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA test) te primjenom *Duncan's New Multiple Range Test*-a. Također, određena je korelacija između mjerenih parametara te analiza glavnih komponenti. Statistički značajnim smatrane su vrijednosti koje se razlikuju na razini  $p \leq 0,05$ . Povećanjem koncentracije 2-MNQ opao je broj proklijalih sjemenki bijele gorušice i sukladno tome padala je duljina korjenčića, a 2-MNQ u koncentraciji 30 i 40  $\mu\text{g/ml}$  u potpunosti je inhibirao klijavost sjemenki. To ukazuje da 2-MNQ inhibira klijanje sjemenki bijele gorušice. S druge strane 2-MNQ nije imao utjecaja na klijanje rotkvice. U klijanaca bijele gorušice s koncentracijom 2-MNQ rasla je aktivnost SOD-a te je najveća aktivnost SOD-a izmjerena pri koncentracijama 2-MNQ od 1 i 10  $\mu\text{g/ml}$ . Iz navedenog se može zaključiti kako je biljka tada bila izložena najvećem oksidacijskom stresu te je bilo potrebno proizvesti veliku količinu SOD-a kako bi se od njega obranila i samim time omogućila sjemenkama da prokliju. Katalitička aktivnost SOD-a u rotkvici pri svim koncentracijama otopine 2-MNQ približno je bila ista te nisu uočena odstupanja. Utjecaj 2-MNQ na klijavost sjemenki je različit te ovisi i o koncentraciji 2-MNQ i o samoj biljnoj vrsti. Bijela gorušica osjetljivija je na djelovanje 2-MNQ, dok 2-MNQ u ispitivanim koncentracijama nije imao utjecaja na klijavost rotkvice. Mehanizam toksičnog učinka 2-MNQ može se povezati s oksidacijskim stresom s obzirom da je tretman s 2-MNQ doveo do promjene aktivnosti SOD-a u bijeloj gorušici.

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

Rad sadrži: 37 stranica, 12 grafičkih prikaza, 3 tablice i 27 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: 2-MNQ, bijela gorušica, rotkvica, klijavost, duljina korjenčića, oksidacijski stres

Mentori: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redoviti profesor i **dr. sc. Valerija Vujčić Bok**, suradnik Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-Biokemijski fakultet.

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

**Dr. sc. Valerija Vujčić Bok**, suradnik Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Suzana Inić**, izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: ožujak 2023.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### EFFECT OF 2-METHOXY-1, 4-NAPHTHOQUINONE ON GERMINATION OF WHITE MUSTARD (*Sinapis alba* L.) AND RADISH (*Raphanus sativus* L.)

Ana Fajdetić

2-metoxi-1,4-naphtoquinone (2-MNQ) is a natural derivate of 1,4-naphtoquinone which has shown antipruritic, anti-inflammatory, anti-allergic, antimicrobial and anti-cancer effects. In this study, the influence of 2-MNQ on seed germination and the level of oxidative stress was investigated. As a plant model the seeds of two plant species were used: white mustard (*Sinapis alba* L.) and radish (*Raphanus sativus* L.). The seeds were exposed to 2-MNQ in concentrations of 1, 5, 10, 20, 30 and 40  $\mu\text{g/ml}$  for 3 days. The study included a negative control (seeds exposed to distilled water for 3 days) and a positive control (seeds exposed to 0.02M  $\text{CuSO}_4$  solution for 3 days). After a 3-day exposure, germination (%) and root length (mm) were measured, and in seedlings homogenate catalytic activity of SOD (U/ml) was determined. Data were statistically processed using one-way analysis of variance (ANOVA test) and Duncan's New Multiple Range Test as well as tested for correlation and Principal Component Analysis. Significance level was set at  $p \leq 0.05$ . With the increase of 2-MNQ concentration the number of germinated seeds of white mustard decreased and 2-MNQ in concentrations of 30 and 40  $\mu\text{g/ml}$  completely ceased germination of white mustard. In parallel the decrease in the length of the radicle with the increase of 2-MNQ concentration was recorded. Thus, 2-MNQ inhibits the germination of white mustard seeds. On contrary, 2-MNQ had no impact on germination of radish. In white mustard seedlings with the increase of 2-MNQ concentration the increase of SOD activity is observed, and the highest SOD activity is recorded at 2-MNQ concentrations 1 and 10  $\mu\text{g/ml}$ . Therefore, it can be concluded that the plant was then exposed to the greatest oxidative stress, and it was necessary to produce a large amount of SOD in order to defend against it and at the same time enable germination. In radish seedlings the catalytic activity of SOD at all concentrations of the 2-MNQ was approximately the same, with no deviations. The impact of 2-MNQ on the seed germination is different and depends on the concentration of 2-MNQ and the plant species itself. White mustard is more sensitive to 2-MNQ, while 2-MNQ in concentrations tested had no impact on radish. The mechanism of the toxic effect of 2-MNQ can be related to oxidative stress, considering that treatment with 2-MNQ led to a change in SOD activity in white mustard.

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

Thesis includes: 37 pages, 12 figures, 3 tables and 27 references. Original is in Croatian language.

Keywords: 2-MNQ, white mustard, radish, germination, root length, oksidacijski stres

Mentors: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Full Professor, and **Valerija Vujčić Bok, Ph.D.** Teaching Associate, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Valerija Vujčić Bok, Ph.D.** Teaching Associate, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Suzana Inić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: March, 2023.