

Aktivnost superoksid dismutase u klijanaca bijele gorušice (*Siapis alba* L.) i rotkvice (*Raphanus sativus* L.) nakon izloženosti žljezdastom nedirku (*Impatiens glandulifera* Royle)

Borković, Ivor

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:084888>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-12**



Repository / Repozitorij:

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



Ivor Borković

**Aktivnost superoksid dismutaze u klijanaca bijele
gorušice (*Sinapis alba* L.) i rotkvice (*Raphanus
sativus* L.) nakon izloženosti žljezdastom nedariku
(*Impatiens glandulifera* Royle)**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen 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. Ane-Marije Domijan.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Ana-Mariji Domijan na iznimnoj dostupnosti, strpljenju i pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Isto tako se zahvaljujem i svojoj obitelji i svim prijateljima i kolegama koji su vjerovali u mene i davali mi podršku kad god mi je bila potrebna, ali najviše se zahvaljujem Heleni koja je uspjela uz mene preživjeti svakakve prepreke tijekom studiranja, uvijek bila spremna motivirati i nikad nije prestala vjerovati u mene.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Oksidacijski stres	2
1.1.1. ROS-ovi i nastajanje superoksidnih radikala	2
1.1.2. Antioksidacijski sustavi biljaka	3
1.2. Alelopatija i alelokemikalije	5
1.2.1. <i>Impatiens glandulifera</i> Royle – žljezdasti neditrak	6
2. OBRAZLOŽENJE TEME	8
3. MATERIJALI I METODE	10
3.1. Kemikalije	11
3.2. Oprema	11
3.3. Biološki pokus	12
3.3.1. Provođenje pokusa	12
3.3.2. Priprema homogenata za mjerenje aktivnosti SOD	13
3.4. Metoda određivanja aktivnosti SOD enzima	14
3.4.1. Princip metode određivanja aktivnosti SOD	14
3.4.2. Određivanje aktivnosti SOD	15
3.4.2.1. Priprema supernatanta uzoraka biljnoga tkiva	15
3.4.2.2. Priprema otopina	15
3.4.2.3. Mjerenje aktivnosti SOD	16
3.5. Statistička obrada rezultata	18
4. REZULTATI I DISKUSIJA	19
4.1. Optimiziranje metode za određivanje aktivnosti SOD u homogenatu biljnoga tkiva	20
4.1.1. Ispitivanje linearnosti metode	21

4.1.2. Optimiziranje uvjeta za mjerenja aktivnosti SOD	22
4.2. Određivanje aktivnosti SOD u klijanaca bijele gorušice i rotkvice nakon tretmana s ekstraktom žljezdastog nendirka	23
4.2.1. Aktivnost SOD u klijanaca bijele gorušice	24
4.2.2. Aktivnost SOD u klijanaca rotkvice	26
5. ZAKLJUČCI	30
6. LITERATURA	32
7. SAŽETAK.....	37
8. PRILOG	40
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD .	42

1. UVOD

1.1. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres prisutan je u svim živim bićima i očituje se povećanim stvaranjem slobodnih radikala, prvenstveno reaktivnih kisikovih vrsta (ROS, eng. *reactive oxygen species*) te predstavlja disbalans u ravnoteži između oksidativnih i antioksidativnih spojeva. Prilikom nastajanja oksidativnog stresa u organizmu, povećava se razina oksidativnih spojeva i smanjuje se njihova detoksikacija antioksidansima. Pokretači oksidativnog stresa mogu biti razni: zagađenje zraka, temperatura, suša, UV-zračenje, dostupnost nutrijenata u okolišu (u manjku se povećava razina ROS-ova) i prisutnost teških metala (Pizzino i sur., 2017.). Osim ROS-ova, reaktivnih kisikovih spojeva, u slobodne radikale ubrajaju se i reaktivni dušikovi spojevi (RNS eng. *reactive nitrogen species*) (Mittler, 2002.).

U biljnoj stanici ROS-ovi oksidiraju mikro i makromolekule, poput DNA, proteina i lipida (Foyer i Noctor, 2009.). Njihovom oksidacijom ROS-ovi uzimaju jedan elektron, a oksidirana molekula gubi svoju inicijalnu strukturu i funkciju (Halliwell, 2006.). Ukoliko su molekule podložene povećanoj oksidaciji, dolazi do ireverzibilnog oštećenja tih molekula, a s povećanjem broja oštećenja makromolekula, dolazi do oštećenja stanice. U konačnici to dovodi do smrti stanica, a time i do trajnog oštećenja organizma. Dakle, povećano stvaranje ROS i/ili RNS te smanjena mogućnost njihove detoksikacije dovodi do smrti stanice i posljedično do smrti organizma. U svrhu što bolje detoksifikacije oksidansa, biljke su evolucijski razvile mehanizme obrane od slobodnih radikala, odnosno antioksidanse.

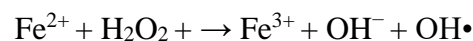
1.1.1. ROS-ovi i nastajanje superoksidnih radikala

U ROS-ove spadaju različiti oblici kisikovih spojeva, poput: singlet kisika ($^1\text{O}_2$), vodikovog peroksida (H_2O_2), superoksidnog radikala ($\text{O}_2^{\bullet-}$) te hidroksilnog radikala (OH^{\bullet}) (Thannickal i Fanburg, 2000.). U biljaka ROS-ovi primarno nastaju u kloroplastima, mitohondrijima te peroksisomima. U procesu fotosinteze, kao temeljne reakcije u biljaka, ROS-ovi nastaju kao nusprodukti (Tripathy i Oelmüller, 2012.) iz 1-2% kisika koje biljka koristi u reakciji fotosinteze (Bhattacharjee, 2005.). ROS-ovi mogu nastati i preko NADPH oksidaza koje su smještene na staničnim membranama (Marino i sur., 2012.).

Najzastupljeniji ROS u biljkama je superoksidni radikal, $\text{O}_2^{\bullet-}$. Kod biljaka se superoksidni radikali generiraju konstantno u kloroplastima zbog parcijalne redukcije molekule kisika ili kao rezultat prijenosa energije na molekulu kisika. Superoksidni radikali nastaju primarno u tilakoidnim membranama tijekom ne-cikličkog prijenosa elektrona (ETC), no

nastaju i u drugim dijelovima biljne stanice (Khorobrykh i sur., 2020.). Nastali superoksidni radikal stupa u daljnje reakcije prilikom kojih nastaju drugi ROS-ovi (kao primjerice Fentonova reakcija). Drugi oblici ROS-ova ($^1\text{O}_2$, H_2O_2 i $\text{OH}\bullet$) pokreću kaskadu reakcija na drugim mjestima u stanici (Pizzino i sur., 2017.). Fentonovom reakcijom iz vodikovog peroksida sa reduciranim oblikom željeza (II), iz aktivnog mjesta u enzimu, nastaju hidroksilni anion, oksidirani oblik željeza i hidroksilni radikal, koji je ujedno i najtoksičniji radikal (Pinto i sur., 2003.).

Fentonova reakcija:



1.1.2. Antioksidacijski sustavi biljaka

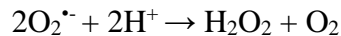
Na nastale ROS-ove djeluje antioksidacijski sustav stanice koji sprječava njihove reakcije sa staničnim mikro i makromolekulama i moguće narušavanje njihovih struktura i funkcija. Antioksidacijski sustav predstavlja svaki spoj koji može neutralizirati slobodni radikal i tako spriječiti da on napravi štetu organizmu. Antioksidacijski sustav čini enzimatski i ne-enzimatski sustav.

Enzimatski sustav u biljci su: superoksid dismutaze (SOD, eng. *superoxide dismutase*, SOD), katalaza (CAT, eng. *catalase*), glutation reduktaza (GR, eng. *glutathione reductase*), askorbatna peroksidaza (APX, eng. *ascorbat peroxidase*) i drugi. Ne-enzimatski sustav u biljci čine askorbinska kiselina (vitamin C), alfa-tokoferol (vitamin E), reducirani glutation (GSH, eng. *glutathione*), karotenoidi te flavonoidi. Enzimatski i ne-enzimatski sustavi se nalaze unutar cijele biljne stanice, gdje kontinuirano sprječavaju nastajanje oksidativnog stresa (Racchi, 2013.).

1.1.3. Superoksid dismutaze (SOD)

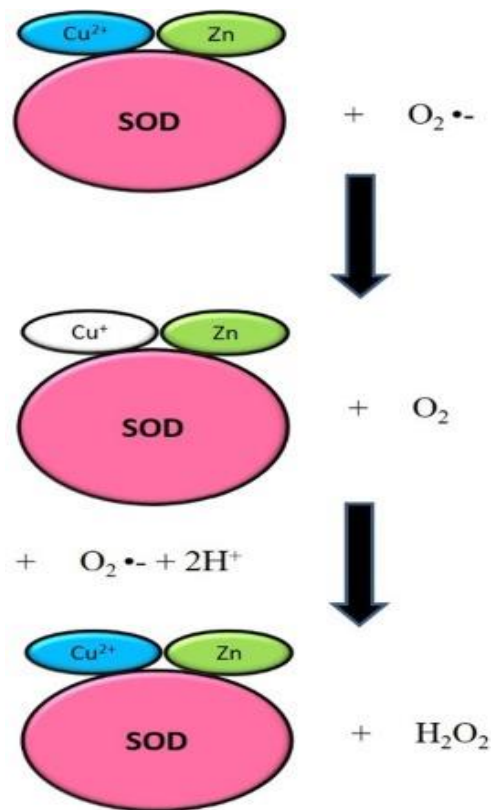
SOD su metaloenzimi koji kataliziraju reakciju stvaranja vodikovog peroksida i kisika iz superoksidnog radikala. SOD provode ključni korak u staničnoj antioksidacijskoj obrani (Malstrom i sur., 1975.). One smanjuju stvaranje $\text{OH}\bullet$ radikala koji je najtoksičniji član ROS-ova prije nego napravi veliku i nepovratnu štetu.

Prikaz reakcije preko SOD-a gdje iz superoksidnog radikala nastaju vodikov peroksid i molekularni kisik dan je sljedećom formulom:



Vodikov peroksid koji nastaje u gornjoj reakciji se pretvara dalje u vodu i kisik preko enzima katalaze.

Na slici 1 je prikazana reakcija Cu/Zn SOD sa superoksidnim radikalom te način na koji enzim prima elektron od superoksidnog radikala. U prvom koraku dolazi do redukcije bakra te oksidacije superoksidnog radikala, nastaje molekularni kisik i reducirani oblik SOD enzima. U drugom koraku dolazi do oksidacije bakra te redukcije superoksidnog radikala prilikom kojeg nastaje vodikov peroksid koji dalje ulazi u reakcije s drugim enzimima.



Slika 1. Reakcija Cu/Zn SOD-a sa superoksidnim radikalom do krajnjeg nusprodukta, vodikovog peroksida (preuzeto iz: Perry i sur., 2010.).

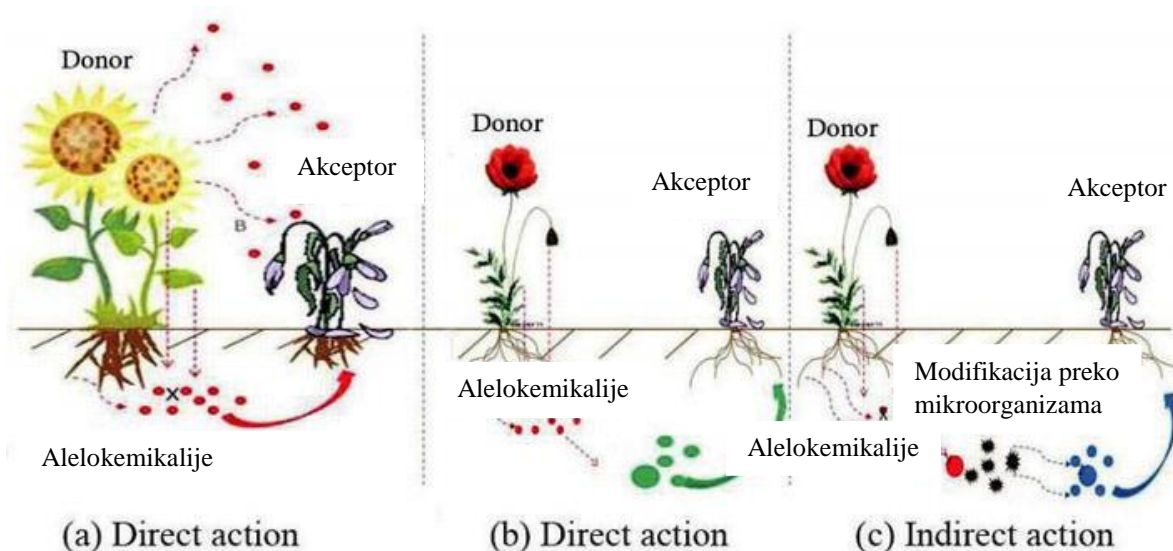
Tri su vrste SOD-a ovisno o metalu koji se nalazi u aktivnom mjestu: bakrov/cinkov (Cu/Zn), manganov (Mn) te željezov (Fe) SOD. Enzim nalazimo u cijeloj stanici, a možemo ga podijeliti s obzirom na mjesto djelovanja: citosoloni (Cu/Zn), mitohondrijski (Mn) i

kloroplastni (Fe). Također, postoji i ekstracelularni SOD koji u aktivnom mjestu može imati sve od navedenih metala (Sandstrom i sur., 1994.). Svaki od članova u obitelji enzima SOD-a ima svoj značaj u stanici. Nedostatak pojedinog se može odraziti na nefunkcionalnost stanice i njenu smrt. Važnost SOD enzima posebno je izražena kod neurodegenerativnih bolesti u životinja i ljudi, primjerice Alzheimerova, Parkinsonova i Huntingtonova bolest. Smatra se da su mutacije u genetskom slijedu za SOD enzim uzrokom otprilike 20% obiteljske amiotrofične lateralne skleroze kod ljudi (Maier i Chan, 2002.).

1.2. Alelopatija i alelokemikalije

Pojam alelopatije podrazumijeva djelovanje jedne biljke na drugu. Alelopatija može djelovati pozitivno (povećanje metabolizma, rasta i razvitka jedinke) ili negativno (inhibicija metabolizma, rasta i razvitka i moguća smrt organizma). Alelopatija se postiže oslobađanjem alelokemikalija u okoliš, na način da preko vode alelokemikalije ulaze u zemlju ili direktno u zrak u obliku plinova. Biljka (donor) sintetizira alelopatske molekule, alelokemikalije, kako bi se zaštitila od herbivora. Naziv alelopatije potječe od grčkih riječi *allelo* i *pathy*, što znači međusobna patnja ili mučenje. Prvi ju je upotrijebio austrijski znanstvenik Hans Molisch u knjizi *Utjecaj biljaka jedna na drugu* (Willis, 2010.). Alelopatija je privukla pažnju kada je shvaćeno kako mnogo vrsta šumskih drveća ima negativan alelopatski učinak na usjeve. Te biljke su identificirane, a zatim se tragalo za biljkama koje imaju pozitivan utjecaj na druge biljke. Ipak prevladava broj biljaka s negativnim učinkom na druge biljke. Biljka (donor) otpušta kemikalije te otpuštene kemikalije, alelokemikalije, mogu direktno djelovati na drugu biljku, preko zemlje ili zraka, ili se mogu transformirati u jače ili slabije kemikalije uz posredovanje mikroorganizama, što se naziva indirektnom alelopatijom (slika 2).

Alelokemikalije, kao i sintetički herbicidi nemaju uobičajeno mjesto djelovanja na biljku akceptor. Zabilježeno je da djeluju na staničnu diobu, fotosintezu, metabolizam ili funkcije enzima. Inhibicija putem alelokemikalija je kompleksna te zahvaća široku klasu kemikalija, poput fenola, flavonoida, terpena, alkaloida, steroida, ugljikohidrata i aminokiselina. Alelopatski učinak mijenja se s obzirom na broj i vrstu kemikalija, a zabilježen je i sinergistički učinak alelokemikalija. Također, fiziološki i okolišni stres, solarna radijacija, bolesti i drugi aspekti imaju utjecaj na alelopatsku supresiju biljaka (Ferguson i sur., 2013.).



Slika 2. Djelovanje alelokemikalija biljke donora na biljku akceptor (preuzeto i prilagođeno iz: Almarie, 2020.).

Alelopatija kao pojava bi mogla imati veliku primjenu u današnjoj agrikulturi kao zamjena za sintetske herbicide. Alelokemikalije imaju bolji utjecaj na okoliš jer mogu selektivno inhibirati rast nekih biljaka dok na ostale biljke ne moraju imati utjecaja. Stoga su također i sigurnije za životinjski svijet. Postoji i mogućnost da se kombiniraju sa sintetskim ili prirodnim herbicidima te bi se mogla smanjiti količina herbicida koji se koristi i na taj način smanjiti nuspojave herbicida koje imaju na okoliš. Smanjenje korova oko sadnica i povećanje usjeva uz bolju ekološku prihvatljivost je nešto čemu se danas teži (Almarie, 2020.).

1.2.1. *Impatiens glandulifera* Royle – žljezdasti nendirak

Impatiens glandulifera Royle (hrv. žljezdasti nendirak) je invazivna vrsta unesena sredinom 19. stoljeća u Europu iz Azije kao ukrasna biljka. Rod *Impatiens* ima otprilike 850 vrsti, pretežno tropskih jednogodišnjih ili trajnih zeljastih biljaka iz porodice neticaljke (Balsaminaceae). Izvorno područje rasta žljezdastog nendirka su Himalaje, Azija. Potencijal invazivnosti biljke je velik te se biljka širi sve više po Europi negativno doprinoseći bioraznolikosti prirode. Ime vrste *glandulifera* je poteklo od latinskih riječi *glandis* i *fer*, koje se odnose na žlijezde koje proizvode jestivi nektar. Prvi ju je opisao 1835. godine britanski botaničar John Forbes Royle.

Stabljika žljezdastog nendirka je uspravna i obično naraste 1-2 metra visine. Listovi su lancetasti, veliki, dugi 5-20 cm te imaju osebujan i snažan miris kada se smrve. Cvjetovi su ljubičasti i veliki, visoki 3-4 cm te upola manji u širini. Prepoznatljiva je po tobolcu koji kada sazrije puca, i na najmanji dodir raspršuje sjemenke u krugu od nekoliko metara. Cvjeta ljeti te ima jestive sjemenke, listove i izdanke. Od cvjetova se izrađuju Bachove cvjetne kapi koji djeluju anksiolitički, smirujući nemir i razdražljivost te ova biljka može imati i farmakološku primjenu (Gligić, 1953.).



Slika 3. Žljezdasti nendirak (*I. glandulifera*) (preuzeto iz: <https://lukahercigonja.wixsite.com/wildlife>, 2021.).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Tijekom metabolizma i zbog utjecaja vanjskih čimbenika (teški metali, dim cigarete) u organizmu nastaju ROS-ovi. Stoga je organizam razvio antioksidacijski sustav za obranu od ROS-ova. Uloga antioksidacijskog sustava je održavanje razine ROS-ova i ostalih prooksidansa u normalnoj, fiziološkoj razini. Poremećaj u ravnoteži između prooksidansa i antioksidansa naziva se oksidacijskim stresom. Biljke su konstantno izložene promjeni okolišnih čimbenika (temperatura, nedostatak tekućine - suša, zagađivači iz okoliša) što ima za posljedicu oksidacijski stres u biljaka.

Žljezdasti nendirak (*I.glandulifera*) invazivna je vrsta u Hrvatskoj te se brzo širi zbog velike proizvodnje sjemenki i uspješnog mehanizma rasprostranjivanja sjemenki. Također, njegovom širenju doprinosi proizvodnja i lučenje alelokemikalija koje mogu djelovati na druge biljne vrste.

Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi uzrokuje li žljezdasti nendirak oksidacijski stres u drugih biljnih vrsta, odnosno potvrditi oksidacijski stres kao mehanizam alelopatskog učinka žljezdastog nendirka. Razina oksidacijskog stresa pratit će se mjerenjem aktivnosti antioksidacijskog enzima SOD. Dvije biljne vrste, bijela gorušica i rotkvice, izložiti će se kroz 3-dana ekstraktu žljezdastog nendirka te će se kao parametar oksidacijskog stresa u biljnome tkivu pratiti aktivnost enzima SOD.

U prvom dijelu ovoga istraživanja optimizirat će se metoda mjerenja aktivnosti enzima SOD u biljnome tkivu ispitivanjem njene linearnost i ispitivanjem uvjeta pripreme uzorka za određivanje aktivnosti SOD.

U drugom dijelu istraživanja optimiziranom metodom pratit će se učinak ekstrakta žljezdastog nendirka na aktivnost SOD u klijanaca bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) i rotkvice (*Raphanus sativus* L.) koji su bili tijekom 3-dnevnog klijanja izloženi ekstraktu žljezdastog nendirka.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije

Za pripremu otopina za tretman sjemenki bijele gorušice (*S. alba*) i rotkvice (*R. sativus*) korištene su sljedeće kemikalije:

- metanol (Lach-Ner, Neratovice, Češka)
- bakrov (II) sulfat, CuSO₄ (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- destilirana voda.

Za pripremu homogenata tkiva biljnog modela korištena je:

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

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

Za određivanje aktivnosti SOD u homogenatu tkiva biljnog modela korištene su kemikalije iz kompleta za ispitivanje:

- tris (hidroksimetil) aminometan hidroklorid, Tris HCl (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI, SAD)
- dietilentriaminpentaetena kiselina, DTPA (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI, SAD)
- hipoksantin (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI, SAD)
- tetrazolijeva sol (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI, SAD)
- SOD standard (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI, SAD)
- ksantin oksidaza, XO (Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI, SAD).

Za pripremu otopina korištena je destilirana voda.

3.2. Oprema

U istraživanju je korištena sljedeća oprema:

- analitička vaga, Pb 303 Delta Range (Mettler Toledo, Švicarska)
- miješalica, Vortex-Heidolph model REAX top (Heidolph Instruments, Schwabach, Njemačka)
- centrifuga, Centurion (Centurion Scientific, Chichester, UK)
- automatske mikropipete (Eppendorf, Hamburg, Njemačka)

- čitač pločica iEMS Reader MF (Labsystems, Helsinki, Finska).

Navedeni uređaji se nalaze u prostorijama Zavoda za farmaceutsku botaniku i Zavoda za mikrobiologiju Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

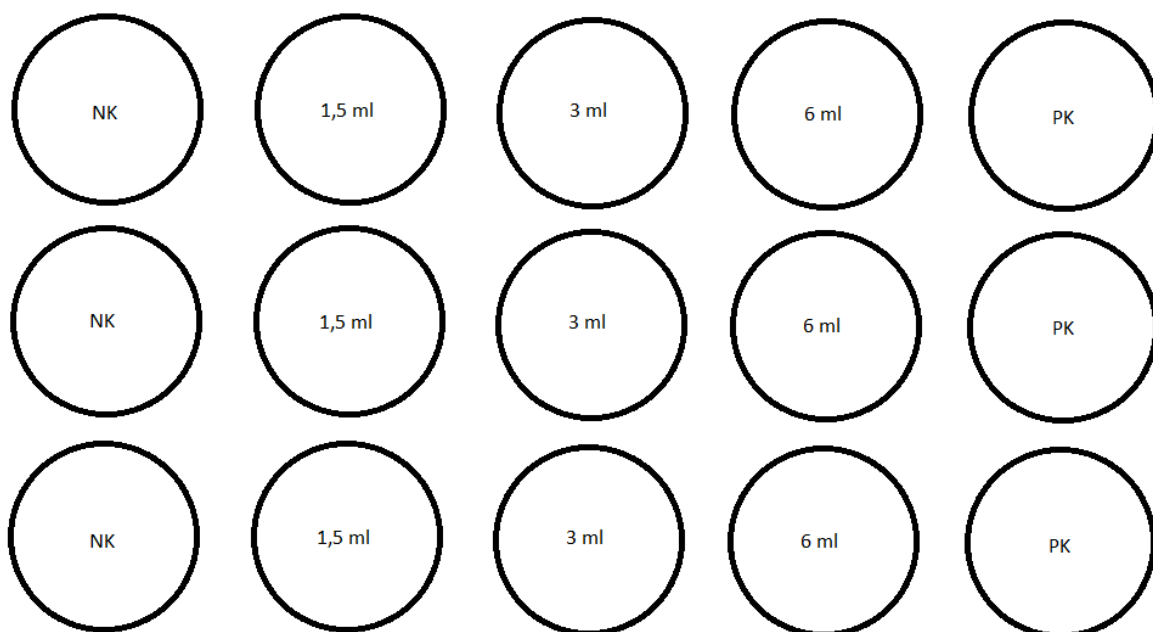
3.3. Biološki pokus

Istraživanje je provedeno na biljnome modelu. Kao biljni modelni organizmi korišteni su klijanci bijele gorušice (*S. alba* L., porodica Brassicaceae) i rotkvica (*R. sativus* L., porodica Brassicaceae). Sjemenke oba biljna modela prilikom klijanja izložene su metanolnom ekstraktu žljezdastog nendirka (u dozama 1,5 ml, 3 ml i 6 ml) koji je priređen iz 3,5 g suhe tvari u 100 ml metanola.

U istraživanju je kao pozitivna kontrola korištena otopina 0,02 M bakrovog (II) sulfata (CuSO_4). Otopina je priređena u odmjernoj tikvici od 100 ml otapanjem 0,5 g CuSO_4 u destiliranoj vodi. Prethodna istraživanja pokazala su da CuSO_4 uzrokuje oksidativni stres, odnosno da u biljaka koje su bile izložene CuSO_4 dolazi do porasta aktivnosti antioksidacijskih enzima SOD i katalaze (Lombardi i Sebastiani, 2005.). Stoga je CuSO_4 korišten kao pozitivna kontrola. Kao negativna kontrola služila je destilirana voda.

3.3.1. Provođenje pokusa

Sjemenke bijele gorušice i rotkvice postavljene su na filter papir u Petrijevim zdjelicama (25 sjemenki po jednoj Petrijevoj zdjelici). Filter papir prethodno je impregniran s 1,5 ml ekstrakta, 3 ml ekstrakta i 6 ml ekstrakta žljezdastog nendirka te 1 ml 0,02 M CuSO_4 (pozitivna kontrola) tako što je otopina nanosena na filter papir te ostavljena da tekućina ispari. Potom su na filter papir postavljene sjemenke te je pažljivo dodano 2 ml destilirane vode kako bi sve sjemenke imale jednake uvjete vlage. U pokus su uključene i sjemenke koje su bile izložene samo 2 ml destilirane vode (negativna kontrola). Svi tretmani su provedeni u triplikatu. Na slici 4 prikazana je shema postavljenog pokusa klijanja. Sjemenke su ostavljene 3 dana na klijanju, na sobnoj temperaturi i normalnoj izmjeni dana i noći. Potom su klijanci po jednoj skupini (po jednoj Petrijevoj zdjelici) odvagani te pohranjeni na $-20\text{ }^\circ\text{C}$ do analiza.



Slika 4. Shematski prikaz pokusa klijanja bijele gorušice i rotkvice. Oznake 1,5 ml, 3 ml i 6 ml predstavljaju biljne modele izložene 1,5 ml, 3 ml i 6 ml ekstrakta žljezdastog nedirka. NK označava negativnu kontrolu (tretman s destiliranom vodom), a PK pozitivnu kontrolu (tretman s 0,02 M CuSO₄).

3.3.2. Priprema homogenata za mjerenje aktivnosti SOD

Homogenat tkiva biljnoga modela pripremljen je u 5% TCA.

5% TCA otopina pripremljena je vaganjem 10 g TCA koji je kvantitativno prenešen u odmjernu tikvicu od 200 ml, a potom je odmjerna tikvica nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

Homogenat tkiva je pripremljen na način da je odvagano 100 mg biljnog tkiva te homogenizirano s 0,5 ml 5% TCA mehanički, koristeći tarionik s tučkom. Tako pripremljen homogenat klijanaca je centrifugiran, a zatim je dobiveni supernatant korišten za optimiziranje metode i za određivanje aktivnosti SOD.

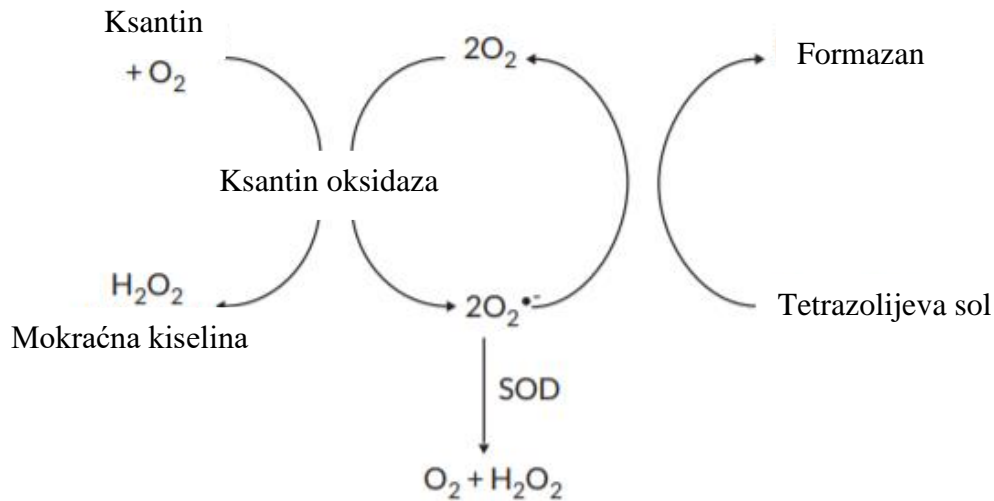
3.4. Metoda određivanja aktivnosti SOD enzima

3.4.1. Princip metode određivanja aktivnosti SOD

Aktivnost SOD određena je pomoću tetrazolijeve soli koja se koristi za utvrđivanje prisutnosti superoksidnih radikala koji nastaju preko enzima ksantin oksidaze i hipoksantina (Cayman Chemical, 2018.). Shematski prikaz te reakcije prikazan je na slici 5.

Ksantin oksidaza pretvara supstrat (ksantin) i molekularni kisik u mokraćnu kiselinu i vodikov peroksid. Prilikom reakcije, kisik drugih molekula sudjeluje u reakciji te prima po jedan elektron po reakciji pri čemu nastaju molekule superoksidnog radikala ($O_2^{\bullet-}$). SOD superoksidni radikal pretvara u vodikov peroksid i molekularni kisik. Superoksidni radikal kojeg SOD ne pretvori u kisik i peroksid se oksidira natrag do molekularnog kisika pri čemu se tetrazolijeva sol reducira u formazan te se prilikom toga mijenja boja reakcijske smjese u žutu. Intenzitet žutog obojenja (apsorbancija uzorka) može se izmjeriti pri valnoj duljini u rasponu od 440 do 460 nm te je proporcionalna s aktivnosti enzima SOD.

Jedna jedinica aktivnosti enzima SOD (U/ml) je definirana kao količina enzima potrebnog da prevede 50% superoksidnog radikala u molekularni kisik i peroksid.



Slika 5. Reakcije nastajanja superoksidnog radikala (preuzeto i prilagođeno iz protokola proizvođača komercijalnog kompleta: Cayman Chemical, 2018.).

3.4.2. Određivanje aktivnosti SOD

3.4.2.1. Priprema supernatanta uzoraka biljnoga tkiva

Homogenat biljnoga tkiva pripremljen je u 5% TCA kako je opisano u 3.3.2.

Uzorci homogenata biljnoga tkiva (po Petrijevoj zdjelici) su nakon homogenizacije centrifugirani na 7000g 15 minuta. Nakon centrifugiranja odvojen je supernatant. Po potrebi, neki su supernatanti dodatno centrifugirani kako bi se dobio što bistriji supernatant za spektrofotometrijska mjerenja.

Za ispitivanje potrebnog razrjeđenja supernatanta za određivanje aktivnosti SOD, jedan je uzorak supernatanta razrijeđen 2x, 5x i 10x. Razrjeđenja su pripravljena korištenjem pojačivača za uzorke (*Sample buffer*).

S obzirom da je ispitivanje potrebnog razrjeđenja pokazalo da je supernatant potrebno razrijediti 2x kako bi se mogla odrediti aktivnost SOD, supernatanti uzoraka tretiranog biljnog tkiva razrijeđeni su 2x s pojačivačem za uzorke.

3.4.2.2. Priprema otopina

Otopine su pripremljene prema uputstvima proizvođača kompleta.

Pojačivač za ispitivanje (*Assay buffer*) pripremljen je na način da je 3 ml koncentriranog pojačivača iz kompleta razrijeđeno s 27 ml destilirane vode. Pojačivač za ispitivanje je 50 mM Tris HCl pH 8,0 koji sadrži 0,1 mM DTPA i 0,1 mM hipoksantina.

Pojačivač za uzorke (*Sample buffer*) pripremljen je tako da je 2 ml koncentriranog pojačivača iz kompleta razrijeđeno s 18 ml destilirane vode. Pojačivač uzorka je 50 mM Tris HCl, pH 8,0.

Detektor radikala (*Radical detector*), tetrazolijeva sol, je priređen na način da je u epruvetu preneseno 50 µl koncentriranog detektora radikala te dodano 19,95 ml razrijeđenog pojačivača za ispitivanje, a epruveta je poslije zaštićena aluminjskom folijom, pošto je spoj fotoosjetljiv. Detektor radikala je stabilan 2 sata.

Ksantin oksidaza (XO) je pripremljena zadnja, na način da je 50 µl ksantin oksidaze iz kompleta razrijeđeno s 1,95 ml pojačivačem za uzorke (*Sample buffer*). Tako pripremljen enzim je stabilan 1 sat.

Štok otopina standarda SOD pripremljena je tako da je 20 µl standarda SOD iz kompleta razrijeđeno s 1,98 ml pojačivača za uzorke. Iz štok otopine standarda SOD pripremljeni su standardi SOD potrebni za izradu baždarnog pravca razrjeđivanjem s pojačivačem za uzorke na način prikazan u tablici 1. Uzorak koji ne sadrži štok otopinu standarda SOD je SD0. Vrijednosti apsorbancija pripremljenih standarda izmjerene su prije mjerenja samih uzoraka kako bi se provjerila linearnost metode, a također i uz uzorke.

Tablica 1. Priprema standarda SOD za izradu baždarnog pravca razrjeđivanjem iz štok otopine standarda SOD.

Standard broj	Volumen štok otopine SOD standarda (µl)	Volumen pojačivača za uzorke (µl)	Aktivnost SOD (U/ml)
1.	0	1000	0
2.	20	980	0,005
3.	40	960	0,010
4.	80	920	0,020
5.	160	840	0,040

3.4.2.3. Mjerenje aktivnosti SOD

Zbog manje osjetljivosti čitača pločica za rubne jažice koje se vremenom ispostavilo da daju pogrešne rezultate, pločica je punjena bez rubnih jažica. Pločica je punjena počevši od standarda, a potom su na pločicu dodani uzorci iz biološkog pokusa kako je i prikazano na slici 6.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
B	/	SD0	SD0	NK1	NK1	1,5(uz 1)	1,5(uz 1)	6,0(uz 1)	6,0(uz 1)	/
C	/	SD20	SD20	NK2	NK2	1,5(uz 2)	1,5(uz 2)	6,0(uz 2)	6,0(uz 2)	/
D	/	SD40	SD40	NK3	NK3	1,5(uz 3)	1,5(uz 3)	6,0(uz 3)	6,0(uz 3)	/
E	/	SD80	SD80	PK1	PK1	3,0(uz 1)	3,0(uz 1)	/	/	/
F	/	SD160	SD160	PK2	PK2	3,0(uz 2)	3,0(uz 2)	/	/	/
G	/	/	/	PK3	PK3	3,0(uz 3)	3,0(uz 3)	/	/	/
H	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

Slika 6. Prikaz punjenja jažica na pločici za čitač pločica.

Otopine standarda SOD pripremljene su kako je prikazano tablicom 1.

U jažice predviđene za standarde prvo je dodano 200 µl detektora radikala, a potom 10 µl standardne otopine SOD po jažici, a svaka je standardna otopina SOD pripremljena u duplikatu. Standardna otopina SOD SD0 ne sadrži standard već samo otopinu pojačivača za uzorke.

U jažice za uzorke prvo je dodano po 200 µl detektora radikala, a potom 10 µl uzorka (negativna kontrola, pozitivna kontrola te uzorci tretirani s ekstraktom žljezdastog nedirka), a svi uzorci su pripremljeni u duplikatu. Prilikom punjenja jažica pazilo se da se vrhom nastavka pipete ne dodirne reakcijska smjesa.

U jažicama koji su sadržavali standardne otopine SOD i uzorke reakcija je započeta dodavanjem 20 µl otopine ksantin oksidaze. Jažice su pažljivo punjene s ksantin oksidazom. Vrijeme kada je započeto dodavanja ksantin oksidaze (vrijeme početka reakcije) je zapisano. Kako bi u svim jažicama reakcija započela istovremeno, koristila se višekanalna automatska mikropipeta. Nakon što su popunjene sve jažice, pločica je poklopljena te lagano promiješana par sekundi. Zatim je ostavljena 30 minuta na sobnoj temperaturi (inkubacija). Nakon 30 minuta očitana je apsorbancija pri valnoj duljini od 450 nm na sobnoj temperaturi. Za izračunavanje aktivnosti SOD enzima u uzorcima korištena je slijedeća jednadžba:

$$SOD \left(\frac{U}{ml} \right) = \left[\frac{(LR \text{ uzorka} - b)}{a} \times \frac{0,23 (ml)}{0,01 (ml)} \right] \times \text{razrjeđenje uzorka}$$

gdje je:

LR uzorka – stupanj linearnosti uzorka (apsorbancija SD0 /apsorbancija uzorka)

b – odsječak na y osi baždarnog pravca

a – nagib baždarnog pravca

0,23/0,01 – korekcija za volumen; 0,01 je volumen uzorka, a 0,230 je ukupni volumen reakcijske smjese

3.5. Statistička obrada rezultata

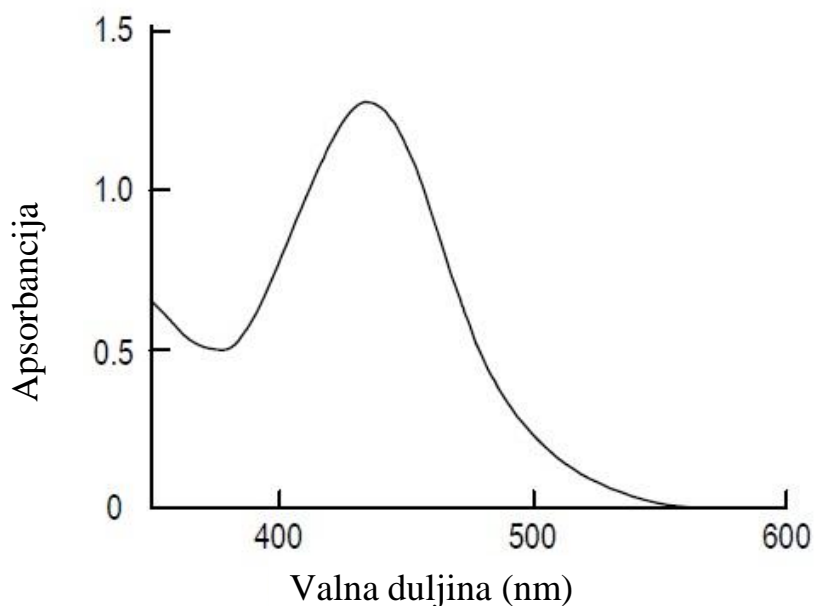
Biljni model bijele gorušice i rotkvice tretiran je u triplikatu, a aktivnost SOD-a je izmjerena za svaki od triplikata u duplikatu. Rezultati za svaki tretman prikazani su kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija te su normalizirani prema negativnoj kontroli (vrijednost aktivnosti SOD negativne kontrole je postavljena na 100 %). Usporedba rezultata aktivnosti SOD-a između uzoraka tretiranih destiliranom vodom (negativna kontrola) i ostalih uzoraka tretiranih različitom dozom ekstrakta žljezdastog neditirka i CuSO_4 napravljena je pomoću Student t-testa računalnog programa Excel (MS Office). Za statistički značajnu razliku je postavljena vrijednost $P \leq 0,05$.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Optimiziranje metode za određivanje aktivnosti SOD u homogenatu biljnoga tkiva

SOD je enzim koji se nalazi u svim stanicama. U stanici ga nalazimo u citosolu, mitohondriju, ali i u vanstaničnom matriksu. Njegova glavna uloga je obrana stanice pa time i organizma od oksidacijskog stresa. SOD brani stanicu od oksidacijskog stresa tako što reaktivan ROS, superoksidni radikal pretvara u kisik i vodu (Perry i sur., 2010.).

U metodi koja se koristila u ovome istraživanju mjerenje aktivnosti SOD-a se temelji na reakciji redukcije kisika preko ksantin oksidaze, prilikom čega se iz ksantina i kisika stvara mokraćna kiselina i vodikov peroksid te nastaje i superoksidni radikal kojeg onda SOD prevodi u kisik i vodu. Ostatak superoksidnog radikala (kojeg SOD nije preveo u kisik i vodu) reducira tetrazolijevu sol te na taj način nastaje formazan koji je žuto obojen, a intezitet žutog obojenja moguće je izmjeriti na valnoj duljini u rasponu od 440 do 460 nm. Na slici 7. prikazan je apsorpcijski spektar formazana. Intezitet žute boje proporcionalan je aktivnosti SOD enzima.



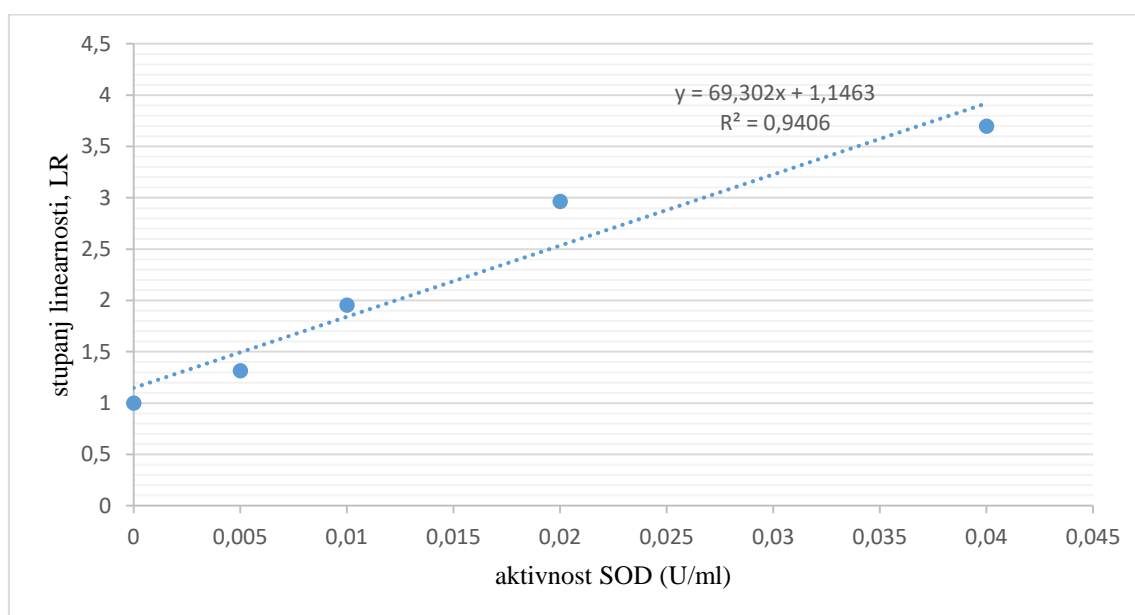
Slika 7. Apsorpcijski sprektar formazana s vidljivim apsorpcijski maksimum na 440-460 nm (preuzeto i prilagođeno iz: <https://www.dojindo.eu.com/store/p/203-SOD-Assay-Kit-WST.aspx>).

4.1.1. Ispitivanje linearnosti metode

Kao prvi korak ispitana je linearnost metode. Standardi SOD-a pripremljeni su iz štok otopine SOD standarda. Razrjeđenja su napravljena kako je prikazano u tablici 1 u poglavlju materijali i metode. Standardi SOD pripremljeni su u duplikatima te im je izmjerena apsorbancija. U tablici 2. prikazane su vrijednosti srednje apsorbancije (A) za svaki od standarda SOD te pripadajući stupanj linearnosti (LR). LR je izračunat na način da se podijelila apsorbancija SD0, standarda koji nije sadržavao SOD (aktivnost SOD-a bila je 0; srednja apsorbancija iznosila je 0,255) sa srednjom vrijednosti apsorbancije pojedinog standarda. Iz dobivenih vrijednosti LR i poznate aktivnosti standarda SOD konstruiran je baždarni pravac prikazan na slici 8.

Tablica 2. Srednje vrijednosti apsorbancija (A) standarda SOD-a i izračunati stupanj linearnosti (LR) svakog od standarda SOD.

Aktivnost SOD (U/ml)	A srednja	Stupanj linearnosti (LR)
0	0,255	1
0,005	0,194	1,314433
0,01	0,131	1,954023
0,02	0,086	2,965116
0,04	0,069	3,695652



Slika 8. Baždarni pravca ovisnosti aktivnosti enzima SOD i stupnja linearnosti (LR) standarda SOD-a.

Iz baždarnog pravca je vidljivo da je metoda linearna s koeficijentom linearnosti (R^2) 0,9406. Jednadžba baždarnog pravca je $y = 69,302x + 1,1463$. Zbog utvrđene linearnosti, metoda se može koristiti za određivanje aktivnosti SOD u uzorcima u kojima je aktivnost SOD nepoznata.

4.1.2. Optimiziranje uvjeta za mjerenja aktivnosti SOD

Prije mjerenja aktivnosti enzima SOD u supernatantima homogenata biljnoga tkiva tretiranih s različitim dozama ekstrakta žljezdastog nedirka, bilo je potrebno pronaći optimalne uvjeta pripreme uzorka kako bi se u njima točno odredila aktivnost SOD. U komercijalno pribavljenom kompletu za mjerenje aktivnosti SOD navedeno je da je sobna temperatura optimalna za ispitivanje aktivnosti SOD-a. Tog se uvjeta pridržavalo i druge temperature nisu ispitivane u istraživanju. Poznato je da na enzimatsku reakciju utječe i pH reakcijske smjese. U ovom je istraživanju za homogenizaciju biljnoga tkiva korištena 5 % TCA te je postojala opasnost da reakcijska smjesa bude kisela i da na taj način aktivnost enzima bude inhibirana. Mjerenja su pokazala da je ipak moguće izmjeriti SOD te da prisustvo TCA u reakcijskoj smjesi ne inhibira aktivnost enzima. Može se pretpostaviti da je bilo moguće izmjeriti aktivnost SOD zato što je homogenat biljnoga tkiva pripremljen ručno (ručna homogenizacija) što nije dovelo do potpunog razaranja biljnoga tkiva te je na taj način sačuvana aktivnost enzima (u onim stanicama koje nisu došle u direktan kontakt s TCA).

Prije samog mjerenja aktivnosti SOD-a u supernatantu homogenata klijanaca izloženih ekstraktu žljezdastog nedirka, bilo je potrebno ispitati i razrjeđenje supernatanta homogenata biljnog tkiva. Za to ispitivanje odabran je supernatant jednog homogenata biljnog tkiva. Taj supernatant (ne-razrijeđeni uzorak) je razrijeđen 2x, 5x i 10x pojačivačem za uzorke. Potom je u ne-razrijeđenim i razrijeđenim uzorcima izmjerena apsorbancija u duplikatima, a aktivnost SOD izračunata iz baždarnog pravca i prema formuli navedenoj u poglavlju materijali i metode. Rezultati su prikazani u tablici 3.

Tablica 3. Vrijednosti apsorbancija i aktivnosti enzima SOD u ne-razrijeđenom i razrijeđenima uzorcima pripremljenih iz istog uzorka.

	A1	A2	A srednja	Aktivnost SOD (U/ml)
Ne-razrijeđeni uzorak	0,135	0,116	0,1255	0,27
Uzorak razrijeđen 2x	0,116	0,113	0,1145	0,683246
Uzorak razrijeđen 5x	0,206	0,176	0,191	0,14168
Uzorak razrijeđen 10x	0,178	0,211	0,1945	0,19898

* U ispitivanju je korišten isti uzorak.

Iz rezultata prikazanih u tablici 3. vidljivo je da je najveća aktivnost SOD izmjerena u uzorku koji je razrijeđen 2x. Također, može se primijetiti da su kod uzorka koji je razrijeđen 2x obje izmjerene apsorbancije (A1 i A2) vrlo slične. To pokazuje da su postignuti optimalni uvjeti mjerenja aktivnosti SOD. Stoga je za mjerenje aktivnosti SOD u pripremljenim supernatantima homogenata biljnoga tkiva nakon tretmana s ekstraktom žljezdastog nedirka odabrano korištenje razrjeđenja 2x. Niže izmjerene vrijednosti aktivnosti SOD kod ne-razrijeđenog uzorka mogu se objasniti prisustvom nekih sastavnica u uzorku koje mogu ometati mjerenje aktivnosti enzima. S druge strane, preveliko razrjeđenje može dovesti do manje količine enzima što onemogućuje njegovo točno mjerenje. Također, vrijednosti apsorbancija 2x razrijeđenog uzorka nalaze se unutar baždarnog pravca (slika 8).

4.2. Određivanje aktivnosti SOD u klijanaca bijele gorušice i rotkvice nakon tretmana s ekstraktom žljezdastog nedirka

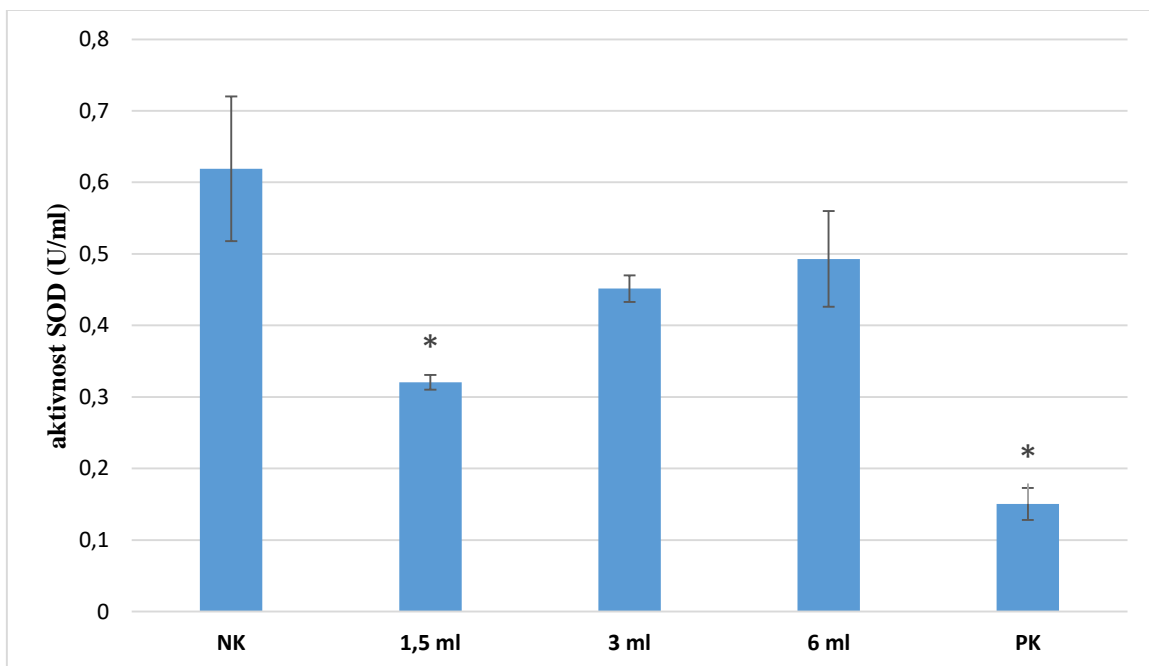
U ovom istraživanju praćen je učinak ekstrakta žljezdastog nedirka na aktivnost SOD u klijanima bijele gorušice i rotkvice. Sjemenke bijele gorušice i rotkvice postavljene su na filter papir u Petrijevu zdjelicu. Filter papir je prethodno bio impregniran s metanolnim ekstraktom žljezdastog nedirka u dozama od 1,5 ml, 3 ml i 6 ml te 1 ml 0,02 M CuSO₄ (pozitivna kontrola). Nakon impregnacije i sušenja, na filter papir postavljene su sjemenke te je dodano po 2 ml destilirane vode kako bi sjemenke klijale u istim uvjetima vlage. U pokus su uključene i sjemenke koje su klijale samo na filter papiru s 2 ml destilirane vode (negativna kontrola) te su predstavljale normalne uvjete klijanja. Sjemenke su ostavljene na klijanju u razdoblju od 3 dana na sobnoj temperaturi u normalnim uvjetima izmjene dana i noći. Nakon klijanja, klijanci

pojedine Petrijeve zdjelice su sakupljeni te je pripremljen homogenat biljnog tkiva s 5% TCA, koji je i centrifugiran kako bi se dobio bistar supernatant za spektrofotometrijska mjerenja.

Za određivanje aktivnosti SOD tako pripremljeni supernatanti su razrijeđeni 2x s pojačivačem za uzorke, što je prethodno ispitivanje pokazalo kao optimalno za određivanje aktivnosti SOD.

4.2.1. Aktivnost SOD u klijanaca bijele gorušice

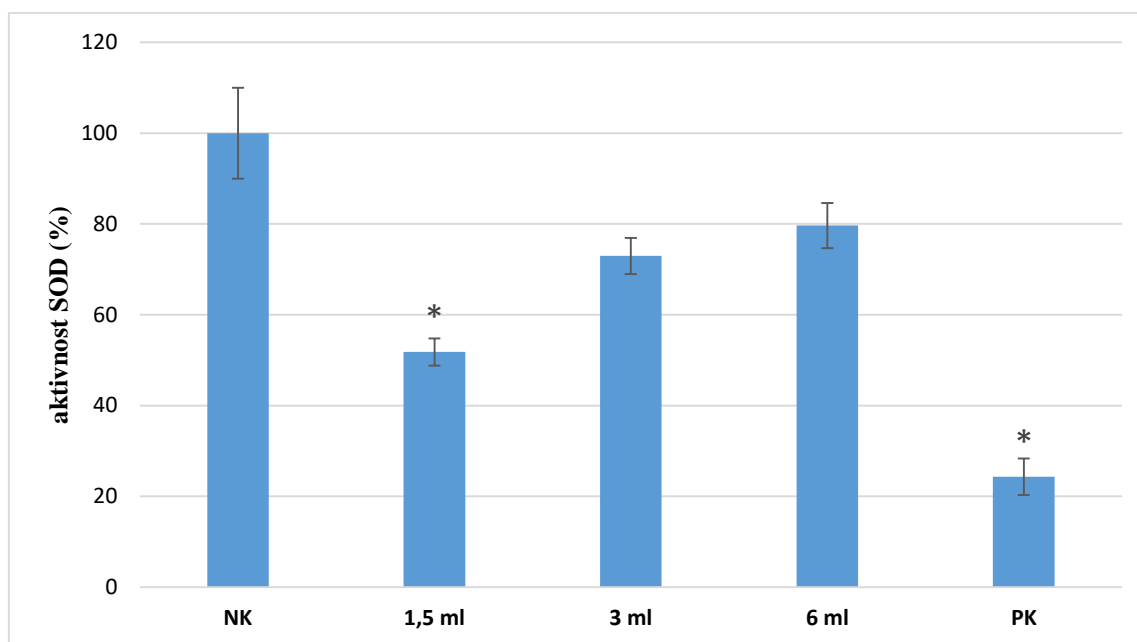
U supernatantima homogenata bijele gorušice nakon izloženosti ekstraktu žljezdastog nedirka, destiliranoj vodi (negativna kontrola) te 0,02 M CuSO₄ (pozitivna kontrola) izmjerena je aktivnost SOD. Dobiveni rezultati prikazani su kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (slika 9) i kao % u odnosu na negativnu kontrolu (negativna kontrola postavljena je na 100 %, normalizacija rezultata u usporedbi s negativnom kontrolom; slika 10).



Slika 9. Aktivnost enzima SOD u klijanaca bijele gorušice nakon tretmana s ekstraktom žljezdastog nedirka. NK – negativna kontrola (destilirana voda), PK – pozitivna kontrola (0,02 M CuSO₄).

Aktivnost SOD u negativnoj kontroli (bijela gorušica izložena samo destiliranoj vodi, normalni uvjeti klijanja) bila je 0,62 ± 0,1 U/ml. U pozitivnoj kontroli (bijela gorušica izložena otopini 0,02 M CuSO₄) aktivnost SOD bila je 0,15 ± 0,02 U/ml. Vrijednost aktivnosti SOD pozitivne kontrole bila je značajno niža ($P < 0,05$) od negativne kontrole. Ti rezultati govore da

je tretman s CuSO_4 uzrokovao značajno sniženje aktivnosti SOD, odnosno da je došlo do oksidacijskog stresa. Također, ovi rezultati potvrđuju da je optimizirana metoda dobra te da su vrijednosti dobivene u biljnome tkivu nakon tretmana s žljezdastim nedarikom pouzdane. U istraživanju koje je pratilo aktivnost SOD u crvenolisnoj šljivi (*Prunus cerasifera*) nakon tretmana s otopinom 0,1 mM CuSO_4 kroz 10 i 20 dana, došlo je do porasta aktivnosti antioksidacijskih enzima SOD i katalaze (Lombardi i Sebastiani, 2005.), što se vjerojatno dogodilo zbog indukcije stvaranja enzima. Razlika u rezultatima između rezultata u ovome istraživanju i istraživanju koje su proveli Lombardi i Sebastiani (2005.) može se pripisati eksperimentalnim uvjetima (duljini tretmana i koncentraciji otopine CuSO_4). Nakon 3-dnevne izloženosti bijele gorušice dozi od 1,5 ml ekstrakta žljezdastog nedarika vrijednost aktivnosti SOD u supernatantu biljnog homogenata bila je $0,32 \pm 0,01$ U/ml. Ta vrijednost bila je značajno niža od negativne kontrole ($P < 0,05$) što govori da je tretman sa žljezdastim nedarikom uzrokovao, kao i tretman s CuSO_4 sniženje aktivnosti SOD. Iako je bilo očekivano da će tretman s većim dozama ekstrakta (3 i 6 ml) uzrokovati daljnji pad aktivnosti SOD, to nije zabilježeno. Poslije tretmana s većim dozama ekstrakta žljezdastog nedarika došlo je do porasta aktivnosti SOD (tretman s 3 ml: $0,45 \pm 0,02$ U/ml; tretman s 6 ml: $0,49 \pm 0,06$ U/ml). Iz toga se može zaključiti da su klijanci bijele gorušice zbog izloženosti ekstraktu žljezdastog nedarika počeli sintetizirati veće koncentracije SOD kako bi se obranili od stresa kojega je izazvao ekstrakt žljezdastog nedarika. Naime, nakon 3-dnevnog tretmana sve biljke bijele gorušice su bile i dalje žive, klijale su, stoga je za pretpostaviti da su mogle sintetizirati enzime kako bi se obranile od stresa kojega je uzrokovao ekstrakt žljezdastog nedarika. Vjerojatnost da je veća vrijednost SOD zbog prisustva SOD iz ekstrakta žljezdastog nedarika je vrlo mala. U pokusu je filter papir bio impregniran s ekstraktom nedarika na kojem su klijanci rasli. Potom su klijanci maknuti s filter papira te su pospremljeni bez filter papira (na njemu je ostao ekstrakt) te se stoga aktivnost SOD iz žljezdastog nedarika nije mogla izmjeriti.

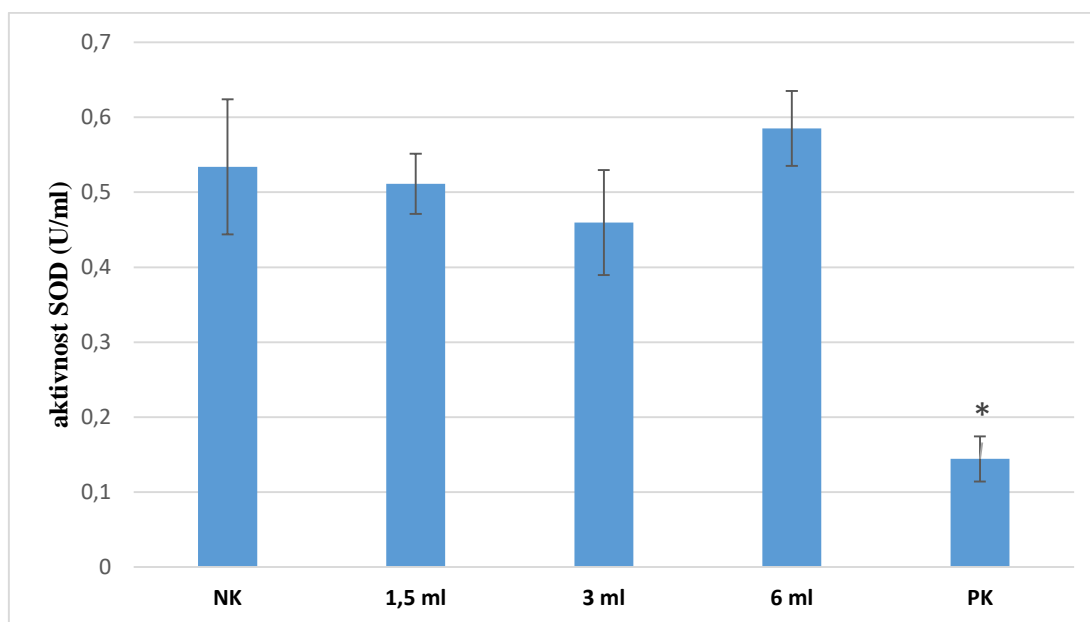


Slika 10. Aktivnost enzima SOD u klijanaca bijele gorušice nakon tretmana s ekstraktom žljezdastog nedirka prikazanih kao % u odnosu na negativnu kontrolu (NK). NK – negativna kontrola (destilirana voda), PK – pozitivna kontrola (0,02 M CuSO₄).

Iz rezultata za aktivnost SOD prikazanih kao postotak u odnosu na negativnu kontrolu (vrijednost aktivnosti SOD za negativnu kontrolu postavljen je na 100 %) vidljiv je prvo pad pa postepeni rast aktivnosti SOD s povećanjem doze ekstrakta žljezdastog nedirka. Nakon tretmana s 1,5 ml ekstrakta aktivnost SOD je pala na 52%. Nakon tretmana s dozom 3 ml ekstrakta žljezdastog nedirka aktivnost SOD je porasla na 73%, a nakon doze 6 ml na oko 80%, odnosno približila se vrijednosti negativne kontrole.

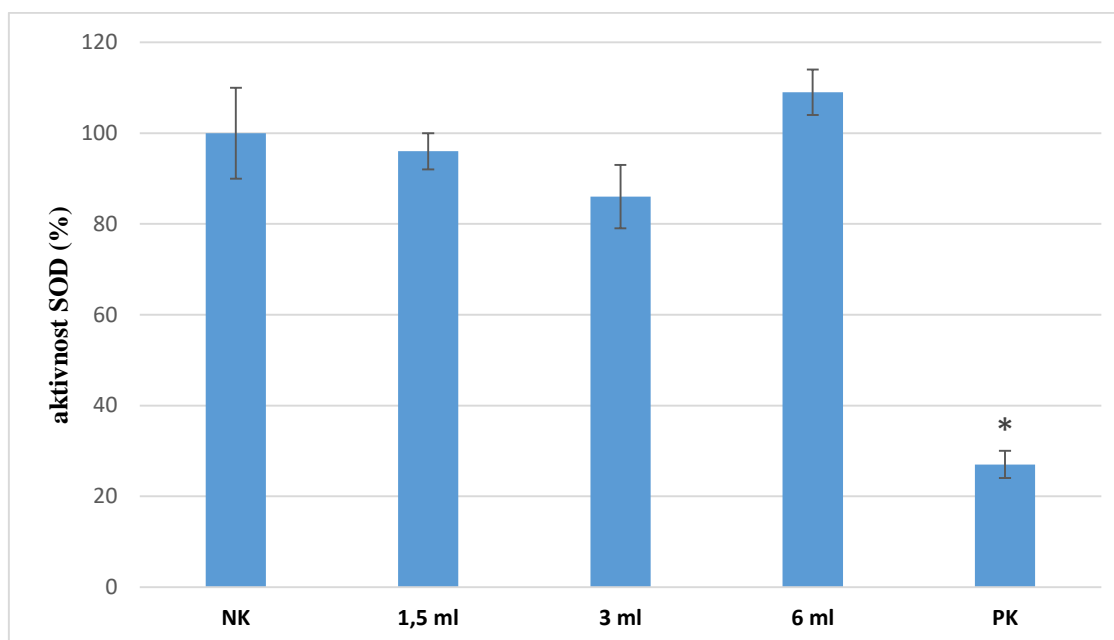
4.2.2. Aktivnost SOD u klijanaca rotkvice

Izmjerene aktivnosti SOD u supernatantu homogenata rotkvice nakon 3-dnevnog tretmana s ekstraktom žljezdastog nedirka, destiliranom vodom (negativna kontrola) te 0,02 M CuSO₄ (pozitivna kontrola) prikazane su kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija (slika 11). Rezultati su također prikazani i kao % u odnosu na negativnu kontrolu koja je postavljena na 100% (normalizacija na negativnu kontrolu; slika 12).



Slika 11. Aktivnost enzima SOD u klijanaca rotkvice nakon tretmana s ekstraktom žljezdastog nedirka. NK – negativna kontrola (destilirana voda), PK – pozitivna kontrola (0,02 M CuSO₄).

Dobivena vrijednost za aktivnost SOD u supernatantu homogenata rotkvice u negativnoj kontroli (klijanci izloženi destiliranoj vodi) bila je $0,53 \pm 0,08$ U/ml. Ta vrijednost slična je aktivnosti SOD izmjerenoj u negativnoj kontroli bijele gorušice što je još jedna potvrda da je metoda dobra za praćenje aktivnosti SOD. Također, potvrđuje da je vrijednost aktivnosti SOD u fiziološkim uvjetima u obje vrste slična. I kod rotkvice, kao i kod bijele gorušice tretman s 0,02 M CuSO₄ (pozitivna kontrola) izazvao je značajan pad aktivnosti SOD, točnije i kod rotkvice vrijednost aktivnosti je bila značajno niža od negativne kontrole ($0,14 \pm 0,03$ U/ml; $P < 0,05$). Kod rotkvice 3-dnevni tretman s dozom od 1,5 ml žljezdastog nedirka uzrokovao je samo manji pad aktivnosti SOD u usporedbi s negativnom kontrolom ($0,51 \pm 0,04$ U/ml). Nešto veći pad aktivnosti zabilježen je nakon 3-dnevne izloženosti dozi od 3 ml ekstrakta žljezdastog nedirka ($0,46 \pm 0,06$ U/ml) koji nije bio značajno niži. Kao i kod bijele gorušice, tretman s dozom od 6 ml ekstrakta žljezdastog nedirka kod rotkvice izazvao je porast aktivnosti SOD u odnosu na negativnu kontrolu ($0,58 \pm 0,05$ U/ml). Može se zaključiti da je povećanjem doze ekstrakta prvo došlo do „potrošnje“ zaliha SOD kojega je rotkvica imala, a da je doza od 6 ml ekstrakta žljezdastog nedirka potakla sintezu enzima SOD u rotkvici.



Slika 12. Aktivnost enzima SOD u klijancima rotkvice nakon tretmana s ekstraktom žljezdastog nendirka prikazanih kao % u odnosu na negativnu kontrolu (NK). NK – negativna kontrola (destilirana voda), PK – pozitivna kontrola (0,02 M CuSO_4).

Iz rezultata prikazanih kao postotak u odnosu na negativnu kontrolu, vidljiv je postepeni pad aktivnosti enzima SOD u klijancima rotkvice nakon tretmana s 1,5 i 3 ml ekstrakta (1,5 ml – 96 % aktivnosti SOD, 3 ml – oko 86 % aktivnosti SOD) te porast aktivnosti SOD i to na preko 100 % nakon tretmana sa 6 ml ekstrakta žljezdastog nendirka.

Usporedbom rezultata aktivnosti SOD dviju biljnih vrsta (bijele gorušice i rotkvice) nakon tretmana s ekstraktom žljezdastog nendirka može se zaključiti da je rotkvice otpornija na oksidacijski stres, vjerojatno zbog većeg udjela antioksidansa dok bijela gorušica pokazuje slabiju obranu od oksidacijskog stresa. To je najbolje vidljivo kod tretmana s 1,5 ml ekstrakta žljezdastog nendirka. Nakon što su obje biljne vrste bile izložene 3 dana istoj dozi (1,5 ml) ekstrakta žljezdastog nendirka aktivnost SOD u rotkvice pala je samo na 96 % dok je aktivnost SOD kod bijele gorušice pala na 52 % aktivnosti. Nakon 3-dnevne izloženosti 3 ml ekstrakta žljezdastog nendirka, aktivnost SOD kod rotkvice je pala na svega 86 % dok je kod bijele gorušice primijećen porast aktivnosti SOD (s 52 % nakon tretmana s 1,5 ml ekstrakta na 73% aktivnosti nakon tretmana s 3 ml ekstrakta). To pokazuje da je bijela gorušica započela sintezu SOD već nakon izloženosti 3 ml ekstrakta žljezdastog nendirka. Nakon tretmana s 6 ml ekstrakta žljezdastog nendirka u obje biljne vrste došlo je do porasta aktivnost SOD-a što se može objasniti odgovorom biljke na vanjski utjecaj. U ovom slučaju izloženost ekstraktu žljezdastog nendirka dovela je do povećane sinteze SOD-a. Postepeni pad aktivnosti SOD kod rotkvice nakon

tretmana s nižim dozama (1,5 ml i 3 ml) ekstrakta govori da rotkvica vjerojatno ima druge mehanizme obrane od ROS-ova pa sama sinteza enzima SOD još nije bila potrebna kao kod bijele gorušice koja je kao adaptaciju na povišenu razinu ROS-ova povećala sintezu SOD-a i kod niže doze (3 ml). Može se zaključiti da rotkvica ima bolji mehanizam obrane, ali i adekvatniju sintezu enzima SOD s obzirom da je nakon tretmana sa 6 ml ekstrakta razina aktivnosti enzima SOD bila i iznad 100%.

U prethodnom istraživanju koje je također ispitalo 3-dnevni utjecaj ekstrakta žljezdastog nendirka na klijance bijele gorušice praćeni su parametri oksidacijskog stresa: reducirani glutation (GSH), malondialdehid (MDA) te antocijanini (Zelić, 2020). GSH i antocijanini predstavljaju antioksidacijsku obranu dok je MDA mjera oksidacijskog oštećenja lipida. U tom je istraživanju, 3-dnevni tretman sa sve tri ispitivane doze metanolnog ekstrakta žljezdastog nendirka (1,5 ml, 3 ml i 6 ml), uzrokovao porast sadržaja GSH u usporedbi s negativnom kontrolom te se može zaključiti da je bijela gorušica kao odgovor na vanjski stres sintetizirala veću količinu GSH. Drugi izmjereni antioksidansi u tom istraživanju, antocijanini, porasli su nakon tretmana s 1,5 ml i 3 ml ekstrakta žljezdastog nendirka u odnosu na negativnu kontrolu, ali ne značajno. Ipak, nakon tretmana sa 6 ml ekstrakta, sadržaj antocijanina je značajno pao u odnosu na negativnu kontrolu. Zadnji ispitivani parametar u tom istraživanju bio je MDA koji je pokazatelj lipidne peroksidacije. Tretman s metanolnim ekstraktom žljezdastog nendirka niti u jednoj dozi (1,5 ml, 3 ml i 6 ml) nije doveo do značajne promjene u sadržaju MDA u odnosu na negativnu kontrolu. To se može objasniti time da su zabilježeni povećani sadržaji GSH-a i antocijanina djelovali protektivno, odnosno neutralizirali su utjecaj ROS-ova koji su nastali kao posljedica izloženosti ekstraktu žljezdastog nendirka zbog čega nije moglo doći do peroksidacije lipida i oštećenja membrana.

Rezultati ovoga istraživanja su u sukladnosti s istraživanjem koje je provela Zelić (2020). U oba je istraživanja tretman s ekstraktom žljezdastog nendirka doveo do promjene u sadržaju antioksidansa. U istraživanju Zelić (2020) GSH i antocijanina, a u ovome istraživanju aktivnosti enzima SOD. Stoga se može zaključiti da tretman s ekstraktom žljezdastog nendirka dovodi do aktivacije (potrošnje i/ili sinteze) antioksidacijske obrane u drugih biljnih vrsta. Aktivaciju antioksidacijske obrane u biljnih vrsta koje su tretirane s ekstraktom žljezdastog nendirka može se pripisati naftokinonima. Dosadašnja istraživanja pokazuju da žljezdasti nendirak sadrži naftokinone te se upravo naftokinonima pripisuje fitotoksično djelovanje žljezdastog nendirka na druge biljne vrste (Baležentienė, 2018).

5. ZAKLJUČCI

Nakon provedenog istraživanja u kojem je optimizirana metoda za praćenje aktivnosti SOD u biljnome tkivu te je u biljnome tkivu bijele gorušice i rotkvice nakon tretmana s metanolnim ekstraktom žljezdastog nendirka praćena aktivnost SOD može se zaključiti:

1. Opisana metoda bila je linearna i dala je pouzdane rezultate te se može koristiti za mjerenje aktivnosti SOD u homogenatu biljnoga tkiva.
2. Izloženost metanolnom ekstraktu žljezdastog nendirka dovela je do promjena aktivnosti SOD bijele gorušice i rotkvice što govori da je ekstrakt žljezdastog nendirka izazvao oksidacijski stres u tim biljnim vrstama. Stoga se može zaključiti da je oksidacijski stres mehanizam alelopatskog učinka žljezdastog nendirka.
3. Iako je u obje biljne vrste nakon izloženosti ekstraktu žljezdastog nendirka došlo do promjene aktivnosti SOD, ta promjena bila je manje izražena u rotkvice te se može zaključiti da rotkvica u odnosu na bijelu gorušicu ima bolje razvijen antioksidacijski sustav na okolišne čimbenike.

6. LITERATURA

Almarie AAA. Roles of Terpenoids in Essential Oils and Its Potential as Natural Weed Killers: Recent Developments, Essential Oils - Bioactive Compounds. U: Essential Oils - Bioactive Compounds, New Perspectives and Applications. Oliveira MS, Costa WA, Silva SG, urednici, Rijeka, IntechOpen, 2020.

Baležentienė L. Phytotoxicity and allelopathic impact of *Impatiens glandulifera*. *Biolog.*, 2018, 64(2), 153-159.

Bhattacharjee S. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal. *Curr. Sci.*, 2005, 89, 1113-1121.

Cayman Chemical Company. Superoxide Dismutase Assay Kit. Ann arbor, MI, USA, 2018.

Ferguson JJ, Rathinasabapathi B, Chase CA. Allelopathy: How Plants Suppress Other Plants. *Hort Sci*, 2013, HS944/HS186.

Gligić V. Etimološki botanički rečnik. Sarajevo, Veselin Mateša, 1953.

Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.*, 2006, 141, 312-322.

Khorobrykh S, Havurinne V, Mattila H, Tyystjärvi E. Oxygen and ROS in Photosynthesis. *Plants (Basel)*, 2020, 9(1), 91.

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

Maier CM, Chan PH. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neurosci.*, 2002, 8(4), 231-238.

Malstrom B, Andreasson L, Reinhammer B. The Enzymes. Boyer P, urednik, New york, Academic Press, 1975, str. 533.

Marino D, Dunand C, Puppo A, Pauly N. A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Sci.*, 2012, 17, 9-15.

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

Nature and wildlife, 2021, <https://lukahercigonja.wixsite.com/wildlife>, pristupljeno 20. 08. 2021.

Perry J, Shin D, Getzoff E, Tainer J. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochi. Et Biophys. Acta – Prot. Proteom.* 2010, 1804, 245-262.

Pinto E, Sigaud-kutner T, Leitao MA, Okamoto OK, Morse D, Colepicolo P. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.*, 2003, 39, 1008-1018.

Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid Med Cell Longev.* 2017, 8416763.

Racchi ML. Antioxidant defenses in plants with attention to Prunus and Citrus spp. *Antiox.*, 2013, 2, 340-369.

Sandstrom J, Nilsson P, Karlsson K. 10-Fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269 (29), 1913-1916.

SOD assay kit manual, 2021., <https://www.dojindo.eu.com/store/p/203-SOD-Assay-Kit-WST.aspx>, pristupljeno: 05. 07. 2021.

Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2000, 279, L1005-L1028.

Tripathy BC, Oelmüller R. Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signal. Behav.*, 2012, 7, 1621-1633.

Willis RJ. *The History of Allelopathy*. Dordrecht, Springer, 2010.

Zelić K. Alelopatski učinak žljezdastog nendirka (*Impatiens glandulifera* Royle) na bijelu gorušicu (*Sinapis alba* L.). Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2020.

7. SAŽETAK

Sažetak

U ovom istraživanju ispitan je oksidacijski stres kao mehanizam alelopatskog djelovanja žljezdastog nendirka (*Impatiens glandulifera* Royle, Balsaminaceae). Razina oksidacijskog stresa praćena je mjerenjem aktivnosti antioksidacijskog enzima superoksid dismutaze (SOD) u klijanaca bijele gorušice (*Sinapis alba* L., Brassicaceae) i rotkvice (*Raphanus sativus* L., Brassicaceae) nakon izloženosti ekstraktu žljezdastog nendirka. Sjemenke bijele gorušice i rotkvice bile su izložene 3 dana metanolnom ekstraktu žljezdastog nendirka u tri doze (1,5; 3 i 6 ml). U pokus je bila uključena pozitivna kontrola (PK, tretman s 0,02 M CuSO₄) te negativna kontrola (NK, tretman destiliranom vodom). Svi tretmani provedeni su u triplikatu. Nakon 3-dnevnog klijanja, pripremljen je homogenat biljnoga tkiva, a u supernatantu homogenata izmjerena je aktivnost antioksidacijskog enzima SOD pomoću komercijalnog kita kolorimetrijskom metodom. Prije samog mjerenja aktivnosti SOD u uzorcima, metoda je optimizirana ispitivanjem njene linearnosti i načina pripreme uzorka. Dobiveni rezultati aktivnosti SOD obrađeni su statistički (t-test, Excel; $P \leq 0,05$).

Utvrđeno je da je metode za određivanje aktivnosti SOD linearna (koeficijent linearnosti, $R^2 = 0,9406$) s jednadžbom pravca $y = 69,302x + 1,1463$. Za određivanje aktivnosti SOD u homogenatu biljnoga tkiva optimalnim se pokazalo razrijeđenje supernatanta homogenata uzorka 2x s pojačivačem za uzorke. U klijanaca bijele gorušice nakon 3-dnevnog tretmana s 1,5 ml ekstrakta žljezdastog nendirka aktivnost SOD značajno je pala (52%) u odnosu na NK (100 %, $P \leq 0,05$). S povećanjem doze ekstrakta, u klijanaca bijele gorušice zabilježen je porast aktivnosti SOD (3 ml: 73 %, 6 ml: 80 %). U klijanaca rotkvice 3-dnevni tretmana s ekstraktom žljezdastog nendirka uzrokovao je postepeni pad aktivnosti SOD te je u odnosu na NK (100 %) najniža aktivnost SOD (86 %) bila nakon tretmana s 3 ml ekstrakta. Porast aktivnosti SOD nakon 3-dnevnog tretmana s višim dozama ekstrakta žljezdastog nendirka (3 ml i 6 ml zabilježen u klijanaca bijele gorušice i 6 ml zabilježen u klijanaca rotkvice) može se objasniti odgovorom biljke na vanjski utjecaj, odnosno povećanoj sintezi enzima SOD kao odgovor na stres. S obzirom da je značajniji pad aktivnosti SOD zabilježen u klijanaca bijele gorušice u odnosu na klijance rotkvice može se zaključiti da rotkvica ima razvijeniji antioksidacijski sustav. Dobiveni rezultati pokazuju da je oksidacijski stres mehanizam alelopatskog djelovanja žljezdastog nendirka.

Summary

In this research, oxidative stress, as an allelopathic mechanism of himalayan balsam (*Impatiens glandulifera* Royle, Balsaminaceae) was examined. The level of oxidative stress was monitored by measuring the activity of antioxidative enzyme superoxide dismutase (SOD) in seedlings of white mustard (*Sinapis alba* L., Brassicaceae) and radish (*Raphanus sativus* L., Brassicaceae) exposed to the extract of himalayan balsam. Seeds from both plants, white mustard and radish, were exposed to a methanol extract of himalayan balsam in three doses (1.5, 3 and 6 mL). In experiment, positive control (PC, treatment with 0.02 M CuSO₄) and negative control (NC, treatment with destiled water) were also included. All treatments were done in a triplicate. After 3 days of treatment, plant tissue homogenate was prepared and in its supernatant SOD activity was determined via comercial assay kit based on colorimetry. Before determining SOD activity in seedlings, the method was optimised by testing its linearity and sample preparation procedure. Obtained data on SOD activity was processed statistically (t-test, Excel; $P \leq 0.05$).

The method for assessment SOD activity was linear ($R^2 = 0.9406$; $y = 69,302x + 1,1463$). Several sample dilutions were tested, and the optimal was dilution of samples 2x with sample buffer. In seedlings of white mustard after 3-days exposure to 1.5 mL of methanol extract of himalayan balsam SOD activity significantly decreased in comparison to NC (52% vs. 100%, $P \leq 0.05$). With the increase of the dose of the extract in seedlings of white mustard an increase of SOD activity was recorded (3 mL: 73 %, 6 mL: 80 %). In radish seedlings 3-days exposure to methanol extract of himalayan balsam resulted with slow decrease of SOD activity and the lowest SOD activity in comparison to NC was after exposure to 3 mL of extract (86 % vs. 100 %). An increase of SOD activity after exposure to higher doses of extract of himalayan balsam (3 mL and 6 mL for white mustard and 6 mL for radish) can be explained with the synthesis of SOD as a response of seedlings to stress. Since significant decrease of SOD activity was observed in sedlings of white mustard in comparison to seedlings of radish, can be concluded that seedlings of radish has better antioxidative defence system. The obtained results indicate that oxidative stress is the mechanism of himalayan balsam allelopathy.

8. PRILOG

Popis kratica

APX - askorbatna peroksidaza

CAT – katalaza

DTPA - dietilentriaminpentaocena kiselina

ETC - neciklički prijenos elektrona

GR - glutation reduktaza

GSH - reducirani glutation

MDA – malondialdehid

RNS - reaktivni dušikovi spojevi

ROS - reaktivni kisikovi spojevi

SOD - superoksid dismutaza

TCA - trikloroocena kiselina

Tris HCL - tris (hidroksimetil) aminometan hidroklorid

XO - ksantin oksidaza

**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

Aktivnost superoksid dismutase u klijanaca bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) i rotkvice (*Raphanus sativus* L.) nakon izloženosti žljezdastom neditrku (*Impatiens glandulifera* Royle)

Ivor Borković

SAŽETAK

U ovom istraživanju ispitan je oksidacijski stres kao mehanizam alelopatškog djelovanja žljezdastog neditrka (*Impatiens glandulifera* Royle, Balsaminaceae). Razina oksidacijskog stresa praćena je mjerenjem aktivnosti antioksidacijskog enzima superoksid dismutaze (SOD) u klijanaca bijele gorušice (*Sinapis alba* L., Brassicaceae) i rotkvice (*Raphanus sativus* L., Brassicaceae) nakon izloženosti ekstraktu žljezdastog neditrka. Sjemenke bijele gorušice i rotkvice bile su izložene 3 dana metanolnom ekstraktu žljezdastog neditrka u tri doze (1,5; 3 i 6 ml). U pokus je bila uključena pozitivna kontrola (PK, tretman s 0,02 M CuSO₄) te negativna kontrola (NK, tretman destiliranom vodom). Svi tretmani provedeni su u triplicatu. Nakon 3-dnevnog klijanja, pripremljen je homogenat biljnoga tkiva, a u supernatantu homogenata izmjerena je aktivnost antioksidacijskog enzima SOD pomoću komercijalnog kita kolorimetrijskom metodom. Prije samog mjerenja aktivnosti SOD u uzorcima, metoda je optimizirana ispitivanjem njene linearnosti i načina pripreme uzorka. Dobiveni rezultati aktivnosti SOD obrađeni su statistički (t-test, Excel; $P \leq 0,05$).

Utvrđeno je da je metode za određivanje aktivnosti SOD linearna (koeficijent linearnosti, $R^2 = 0,9406$) s jednadžbom pravca $y = 69,302x + 1,1463$. Za određivanje aktivnosti SOD u homogenatu biljnoga tkiva optimalnim se pokazalo razrijeđeno supernatanta homogenata uzorka 2x s pojačivaćem za uzorke. U klijanaca bijele gorušice nakon 3-dnevnog tretmana s 1,5 ml ekstrakta žljezdastog neditrka aktivnost SOD značajno je pala (52%) u odnosu na NK (100 %, $P \leq 0,05$). S povećanjem doze ekstrakta, u klijanaca bijele gorušice zabilježen je porast aktivnosti SOD (3 ml: 73 %, 6 ml: 80 %). U klijanaca rotkvice 3-dnevni tretmana s ekstraktom žljezdastog neditrka uzrokovao je postepeni pad aktivnosti SOD te je u odnosu na NK (100 %) najniža aktivnost SOD (86 %) bila nakon tretmana s 3 ml ekstrakta. Porast aktivnosti SOD nakon 3-dnevnog tretmana s višim dozama ekstrakta žljezdastog neditrka (3 ml i 6 ml zabilježen u klijanaca bijele gorušice i 6 ml zabilježen u klijanaca rotkvice) može se objasniti odgovorom biljke na vanjski utjecaj, odnosno povećanoj sintezi enzima SOD kao odgovor na stres. S obzirom da je značajniji pad aktivnosti SOD zabilježen u klijanaca bijele gorušice u odnosu na klijance rotkvice može se zaključiti da rotkvica ima razvijeniji antioksidacijski sustav. Dobiveni rezultati pokazuju da je oksidacijski stres mehanizam alelopatškog djelovanja žljezdastog neditrka.

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

Rad sadrži: 48 stranica, 12 grafičkih prikaza, 3 tablica i 24 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Žljezdasti neditrak, alelopatija, oksidacijski stres, superoksid dismutaza

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

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

Dr. sc. Mirela Matić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Suzana Inić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2021.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

Activity of superoxide dismutase in seedlings of white mustard (*Sinapis alba* L.) and radish (*Raphanus sativus* L.) after exposure to himalayan balsam (*Impatiens glandulifera* Royle)

Ivor Borković

SUMMARY

In this research, oxidative stress, as an allelopathic mechanism of himalayan balsam (*Impatiens glandulifera* Royle, Balsaminaceae) was examined. The level of oxidative stress was monitored by measuring the activity of antioxidative enzyme superoxide dismutase (SOD) in seedlings of white mustard (*Sinapis alba* L., Brassicaceae) and radish (*Raphanus sativus* L., Brassicaceae) exposed to the extract of himalayan balsam. Seeds from both plants, white mustard and radish, were exposed to a methanol extract of himalayan balsam in three doses (1.5, 3 and 6 mL). In experiment, positive control (PC, treatment with 0.02 M CuSO₄) and negative control (NC, treatment with distilled water) were also included. All treatments were done in a triplicate. After 3 days of treatment, plant tissue homogenate was prepared and in its supernatant SOD activity was determined via commercial assay kit based on colorimetry. Before determining SOD activity in seedlings, the method was optimised by testing its linearity and sample preparation procedure. Obtained data on SOD activity was processed statistically (t-test, Excel; $P \leq 0.05$).

The method for assessment SOD activity was linear ($R^2 = 0.9406$; $y = 69,302x + 1,1463$). Several sample dilutions were tested, and the optimal was dilution of samples 2x with sample buffer. In seedlings of white mustard after 3-days exposure to 1.5 mL of methanol extract of himalayan balsam SOD activity significantly decreased in comparison to NC (52% vs. 100%, $P \leq 0.05$). With the increase of the dose of the extract in seedlings of white mustard an increase of SOD activity was recorded (3 mL: 73 %, 6 mL: 80 %). In radish seedlings 3-days exposure to methanol extract of himalayan balsam resulted with slow decrease of SOD activity and the lowest SOD activity in comparison to NC was after exposure to 3 mL of extract (86 % vs. 100 %). An increase of SOD activity after exposure to higher doses of extract of himalayan balsam (3 mL and 6 mL for white mustard and 6 mL for radish) can be explained with the synthesis of SOD as a response of seedlings to stress. Since significant decrease of SOD activity was observed in seedlings of white mustard in comparison to seedlings of radish, can be concluded that seedlings of radish has better antioxidative defence system. The obtained results indicate that oxidative stress is the mechanism of himalayan balsam allelopathy.

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

Thesis includes: 48 pages, 12 figures, 3 tables and 24 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Himalayan balsam, allelopathy, oxidative stress, superoxide dismutase

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.

Mirela Matić, Ph.D. Assistant professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Suzana Inić, Ph.D. Assistant professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

The thesis was accepted: September 2021.