

Parametri oksidacijskog stresa bijele gorušice (Sinapis alba L.) nakon tretmana s 2-metoksi-1,4-naftokinonom

Kenfelj, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:959562>

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](#)



Ivan Kenfelj

**Parametri oksidacijskog stresa bijele gorušice
(*Sinapis alba* L.) nakon tretmana s 2-metoksi-1,4-
naftokinonom**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu i izrađen na Zavodu za Farmaceutsku botaniku pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ane-Marije Domijan.

Veliko hvala mojoj dragoj mentorici prof. dr. sc. Ana-Mariji Domijan. Hvala na svom trudu i vremenu koje ste uložili i koje smo proveli zajedno.

Hvala prijateljima i obitelji koji su bili suputnici u mom obrazovanju. Hvala, uživao sam dijeliti to krasno razdoblje s Vama!

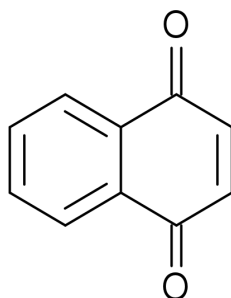
Sadržaj

1.	Uvod	1
1.1.	Naftokinoni.....	2
1.1.1.	2-metoksi-1,4-naftokinona.....	3
1.2.	Oksidacijski stres.....	4
1.2.1.	Glutation.....	5
1.2.2.	Lipidna peroksidacija.....	6
2.	Obrazloženje teme	7
3.	Materijali i metode	9
3.1.	Kemikalije	10
3.2.	Oprema	10
3.2.1.	UV-Vis spektrofotometar	11
3.3.	Metode.....	12
3.3.1.	Biološki pokus	12
3.3.2.	Određivanje koncentracije GSH.....	15
3.3.3.	Određivanje koncentracije MDA.....	16
3.4.	Statistička obrada podataka	17
4.	Rezultati i rasprava	18
4.1.	Masa svježeg tkiva.....	19
4.2.	GSH.....	20
4.3.	MDA.....	21
5.	Zaključci.....	25
6.	Popis kratica, oznaka i simbola	27
7.	Literatura	29
8.	Sažetak / Summary	32
9.	Temeljna dokumentacijska kartica	

1. Uvod

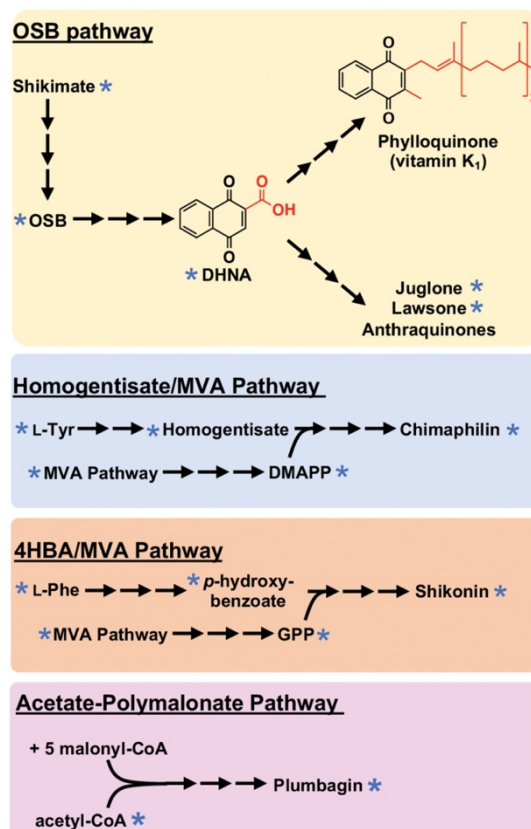
1.1. Naftokinoni

Naftokinoni su ciklički nezasićeni organski spojevi. Najznačajniji izomer je 1,4-naftokinon (Slika 1.). 1,4-naftokinon je netopljiv u vodi. Na osnovu njegove pKa smatra se vrlo slabom kiselinom. 1,4-naftokinon se može sintetizirati iz naftalena. Alkalni derivati 1,4-naftokinona su filokinon, menakinon i menadion te čine vitamin K (www.enciklopedija.hr). Hidroksilni derivati su juglon i loson. Juglon i loson se ubrajaju u prirodna bojila (Meyer i sur., 2021). 1,4-naftokinon može se naći u likerima pa može poslužiti u određivanju konzumacije likera. Prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (IARC, od *International Agency for Research on Cancer*) 1,4-naftokinon nije karcinogen, ali je potencijalno toksični spoj (www.inchem.org).



Slika 1. 1,4-naftokinon (preuzeto iz Meyer i sur., (2021) uz dopuštenje izdavača)

U prirodi su najčešći juglon, lavson, plumbagin i lapahol. Prirodni naftokinoni su male, vrlo reaktivne molekule koje lako stupaju u reakcije (Lee i sur., 2020). Biljni 1,4-naftokinoni čine skupinu specijaliziranih metabolita koji zbog svoje reaktivnosti posreduju u brojnim reakcijama. Istraživanja su pokazala da postoji više puteva za sintezu 1,4-naftokinona. Pokazano je da se mogu sintetizirati acetatnim i malonatnim putem (plumbagin), šikimatskim / sukcinil CoA kombiniranim putem (lavson), šikimatskim / mevalonatnim putem (alkanin) ili šikimatskim / nemevalonatnim putem. Slika 2 prikazuje biosintetske puteve biljnih 1,4-naftokinona (Meyer i sur., 2021). Biljke koje proizvode 1,4-naftokinon su iz redova: Fagales (porodica Juglandaceae), Caryophyllales (porodice Droseraceae, Nepenthaceae, Drosophyllaceae, Ancistrocladaceae, Dioncophyllaceae i Plumbaginaceae), Ericales (porodice Balsaminaceae i Ebenaceae), red Lamiales (porodica Bignoniaceae) i reda Boraginales (porodica Boraginaceae).



Slika 2. Biosintetski putevi 1,4-naftokinona. Kratice: OSB – o-sukcinilbenzojeva kiselina; DHNA – dihidroksinaftalen karboksilna kiselina; MVA – mevalonska kiselina; DMAPP - dimetilalil difosfat; GPP - geranil pirofosfat (preuzeto i prilagođeno iz Meyer i sur., (2021) uz dopuštenje izdavača)

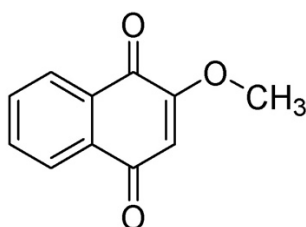
1,4-naftokinoni proučavaju se zbog antioksidacijskih, antimikrobnih i proapoptoznih aktivnosti. Tradicionalno se naftokinoni izolirani iz biljne vrste *Drosera rotundifolia* L. koriste za respiratorne probleme (Vrchotová i sur., 2011). Posebno je zanimljivo antitumorsko djelovanje derivata naftokinona kao što su lapahol, lapahon i napabukasin čija su ispitivanja već ušla u II fazu kliničkih ispitivanja (Ahmadi i sur., 2020).

1.1.1. 2-metoksi-1,4-naftokinona

2-metoksi-1,4-naftokinon (2-MNQ) je organski spoj, derivat naftokinona. Kao što je vidljivo na slici 3 razlikuje se od 1,4-naftokinona po metoksi skupini na položaju 2. U prirodi se može naći u vrstama roda *Impatiens* (porodica Balsaminaceae) poput žljezdastog nedirka (*I.*

glandulifera Royle), običnog nedirka (*I. noli-tanfere* L.) i vrtne vodenike (*I. balsamina* L.), a može se izolirati iz njihovih listova i cvijetova (Triska i sur., 2013).

U Aziji se vrsta *I. balsamina* tradicionalno koristi u liječenju brojnih poremećaja, a taj učinak pripisuje se prisustvu 2-MNQ (Wang i sur., 2011). Istraživanja pokazuju da 2-MNQ ima antifungalni i antimikrobni učinak (Block i sur., 2018). Posebno je istraživani njegov učinak na *H. pylori* te je pokazano da 2-MNQ inhibira rast *H. pylori* (Wang i sur., 2011). To istraživanje pokazalo je da je učinak 2-MNQ na *H. pylori* jednak učinku antibiotika amoksicilina. Također, pretpostavlja se da 2-MNQ ima i antitumorski učinak. Istraživanje provedeno na HepG2 stanicama pokazalo je da 2-MNQ ima antitumorno djelovanje (Ding i sur., 2008). Stoga brojni istraživači proučavaju učinke 2-MNQ.



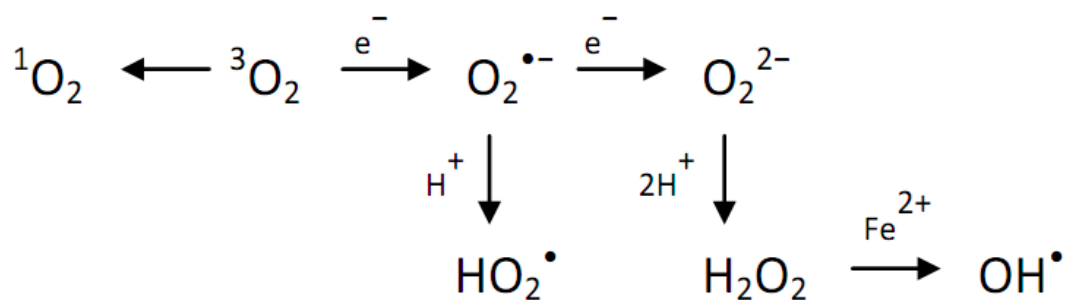
Slika 3. Struktura 2-metoksi-1,4-naftokinona (preuzeti iz Guo i sur., (2019) uz dopuštenje izdavača)

1.2. Oksidacijski stres

Stanje u kojem je biljka pod utjecajem abiotskih i/ili biotskih čimbenika koji nepovoljno utječu na njezin rast i razvoj naziva se stanje stresa. Stanje stresa je stanje u kojem biljka nije u optimumu, međutim biljka se može takvome stanju prilagođavati. Ako se radi o jačanju otpornosti na stres u kraćem periodu onda se to naziva aklimatizacija. Kada je biljka duži vremenski period pod utjecajem nepovoljnih uvjeta te nastane genetski stupanj otpornosti onda govorimo o adaptaciji. U trenutku u kojem je količina stresa prevelika za biljku, ona umire.

Stresni uvjeti nisu isti za svaku biljku. Ovisno o karakteristikama svake biljne vrste biti će i drugačiji odgovor na abiotske i biotske čimbenike koji potencijalno mogu prouzročiti stres (Vukadinović i sur., 2014).

Na molekularnoj razini dolazi do neravnoteže u odnosu oksidansa i antioksidansa u korist oksidansa. Takav disbalans dovodi do oksidacijskog stresa. Kao posljedica oksidacijskog stresa nastaju reaktivne kisikove vrste (ROS-ovi) koji inaktiviraju enzime i oštećuju stanične dijelove. Prelaskom elektrona na slobodnu molekulu kisika nastaje superoksidni radikal iz kojeg može doći do nastanka perhidroksilnog radikala ili vodikovog peroksida, a posljedično hidroksilnog radikala. Ako pak dođe do ekscitacije slobodne molekule kisika onda nastaje visokoenergetski singletni kisik (Slika 4.). Ovisno o kapacitetima i aktivnosti antioksidacijskog sustava ovisit će i obrana stanice s ciljem uništavanja ROS-ova. Biljka se može štititi djelovanjem antioksidacijskih enzimskih i neenzimskih sustava (Sies i sur., 1997; Arora i sur., 2001).



Slika 4. Nastanak ROS-ova redukcijom molekule kisika. Kratice: ${}^1\text{O}_2$ - singletni kisik; ${}^3\text{O}_2$ - molekularni kisik; $\text{O}_2^{\bullet-}$ - superoksid radikal; O_2^{2-} - peroksidni ion; HO_2^{\bullet} - perhidroksil radikal; H_2O_2 - vodikov peroksid; OH^{\bullet} - hidroksil radikal (preuzeto i prilagođeno prema osha.washington.edu)

1.2.1. Glutation

Glutation (GSH) je tripeptid koji se sastoji od cisteina, glicina i glutaminske kiseline. U organizmu se nalazi u visokim koncentracijama s obzirom da je njegova koncentracija slična koncentraciji glukoze, kolesterola i natrija što govori o njegovoj važnosti za organizam (Pizzorno, 2014). GSH se sintetizira u citosolu te se može unijeti i u mitohondrije. Može se nalaziti u dva stanja, reduciranom i oksidiranom. Reducirano stanje je GSH, a oksidirano GSSG. U oksidiranom stanju GSSG se sastoji od dvije molekule GSH međusobno povezane disulfidnim mostom (Noctor i sur., 2011).

Sinteza GSH u stanici se odvija na tri načina i svaki način zahtjeva utrošak energije:

- *de novo* sinteza u dva koraka katalizirana glutamat cistein ligazom i glutathion sintetazom
- vraćanjem iz GSSG u GSH djelovanjem glutathion reduktaze
- recikliranjem cisteina iz konjugiranog glutathiona putem GGTP (gama glutamil transpeptidaza).

1.2.2. Lipidna peroksidacija

Prilikom metaboličke aktivnosti u stanici nastaju slobodni elektroni koji se zbog svoje reaktivnosti brzo vežu na susjedne molekule kako bi postigli ravnotežu (sparili slobodni elektron) (Štefan i sur., 2007). Ukoliko je molekula na koju se veže slobodni elektron kisik, nastaje ROS koji je reaktivan te dalje može reagirati s drugim molekulama, sastavnicama stanice.

Stanične membrane građene su od višestruko nezasićenih masnih kiselina (PUFA). Nastali slobodni elektroni i/ili ROS-ovi mogu reagirati s PUFA koje grade staničnu membranu. Tu reakciju između ROS-ova i PUFA-e nazivamo lipidna peroksidacija. U procesu lipidne peroksidacije nastaju brojni međuprodukti koji su također vrlo reaktivni i mogu reagirati s drugim molekulama. Malondialdehid (MDA) i 4-hidroksinonenala (HNE) su konačani produkti lipidne peroksidacije (Štefan i sur., 2007; Domijan i sur., 2014). Oštećenjem lipida koji grade staničnu membranu dolazi do smanjenja funkcije membrane, transporta, propusnosti i fluidnosti membrane i u konačnici smrti stanice.

Oštećenje staničnih lipida, odnosno proces lipidne peroksidacije može se mjeriti mjerenjem koncentracije MDA, HNE, izoprostana i drugih produkata lipidne peroksidacije. MDA je konačan i stabilan produkt lipidne peroksidacije te se u brojnim istraživanjima upravo MDA koristi kao mjera lipidne peroksidacije (Domijan i sur., 2014).

2. Obrazloženje teme

2-MNQ je prirodni spoj kojega sintetiziraju biljne vrste iz porodice Balsaminaceae. Neke od njih su žljezdasti neditrak (*I. glandulifera* Royle), obični neditrak (*I. noli-tanfere* L.) i vrtna vodenika (*I. balsamina* L.). Dosadašnja istraživanja pokazuju da 2-MNQ ima antifungicidno i antimikrobno djelovanje (Meyer i sur., 2021; Wang i sur., 2011). Također neka istraživanja pokazuju da ima i antitumorski učinak (Ding i sur., 2008).

S obzirom da 2-MNQ ima potencijal za razvoj lijeka u ovome istraživanju ispitan je njegov učinak na razinu oksidacijskog stresa na biljnom modelu. Spoj koji ima potencijal za lijek prema Pravilniku o kliničkim ispitivanjima lijekova i dobroj kliničkoj praksi potrebno je ispitati te se provode brojna pretklinička i klinička istraživanja njegovih učinaka (Narodne Novine 25/2015). Ta istraživanja prvenstveno se provode na stanicama animalnog podrijetla te u kasnijoj fazi istraživanja na životinjama. U ovome istraživanju učinci 2-MNQ ispitani su na biljnom modelu kao etički i financijski prihvatljivijem modelu za takva istraživanja.

Kao biljni model u ovome istraživanju korištena je biljka bijela gorušica. Sjemenke bijele gorušice izložene su 2-MNQ u koncentracijama od 1, 5, 10, 20, 30 i 40 µg/mL kroz 3 dana te su nakon 3-dnevne izloženosti 2-MNQ praćeni rast i parametri oksidacijskog stresa u klijanca bijele gorušice.

3. Materijali i metode

3.1. Kemikalije

Za provedbu istraživanja u ovome diplomskom radu korištene su sljedeće kemikalije:

- 2-metoksi-1,4-naftokinon, 2-MNQ, Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD
- 2-tiobarbituratna kiselina, TBA, Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD
- 5,5'-ditiol-(2-nitrobenzojeva kiselina), DTNB, Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD
- bakrov (II) sulfat, CuSO_4 , Kemika, Zagreb, Hrvatska
- kalijev dihidrogenfosfat, KH_2PO_4 , Lach-Ner, Neratovice, Češka
- kalijev hidrogenfosfat, K_2HPO_4 , Lach-Ner, Neratovice, Češka
- etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA, Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD
- metanol, Lach-Ner, Neratovice, Češka
- trikloroctena kiselina, TCA, Kemika, Zagreb, Hrvatska

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

3.2. Oprema

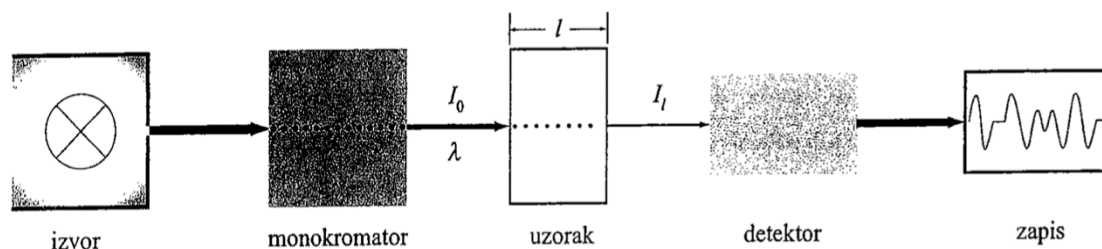
Za provedbu istraživanja korištena je sljedeća oprema:

- analitička vaga, PB 303, Mettler Toledo, Švicarska
- centrifuga, mikro-centrifuga, Hettich GmbH & Co., Kirchlengern, Njemačka
- centrifuga, Frontiers 5706, Ohaus, Greifeness, Švicarska
- kiveta, Open-top UV-quartz cell, Agilent Technologies, CA, SAD
- magnetski mješač s grijačem MSH-A, Witeg, Wertheim, Njemačka
- miješalica, Vortex-Heidolph model REAX top, Heidolph Instruments, Schwabach, Njemačka
- mikropipete, Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- pH metar, HI 9025, Hana Instruments, Portugal
- termostat, TMA, Dugo Selo, Hrvatska
- UV-Vis spektrofotometar, PG T70, PG Instruments, UK

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

3.2.1. UV-Vis spektrofotometar

Koncentracije GSH i MDA određene su pomoću UV-Vis spektrofotometra. UV-Vis spektrofotometar je uređaj za analizu spektra elektromagnetskog zračenja. Sadrži optički sustav koji stvara monokromatsku svjetlost u rasponu od 190 do 800 nm. Na kraju se nalazi odgovarajući detektor za mjerenje apsorbancije (Nigović i sur., 2007). Dijelovi UV-Vis spektrofotometra prikazani su na slici 5.



Slika 5. Prikaz osnovnih dijelova UV-Vis spektrofotometra (preuzeto iz Herak (1990), uz dopuštenje izdavača)

Osnovni dijelovi UV-Vis spektrofotometra:

- izvor zračenja:
 - deuterijeva lampa za UV područje (210 - 370 nm) i živina/wolframova lampa za vidljivo područje (290 - 900 nm)
- monokromator:
 - dio UV-Vis spektrofotometra za selekciju specifične valne duljine na kojoj analit ima najveću apsorbanciju koji može biti prizma ili rešetka
- nosač uzorka:
 - kiveta (ako se radi o mjerenju u UV području potrebna je kiveta od kvarcnog stakla)
- detektor zračenja.

UV-Vis spektrofotometar mjeri apsorbanciju, odnosno apsorpciju svjetlosti koja prolazi kroz tekući uzorak, a u kojem se nalazi tvar (analit) od interesa. Svaka molekula koja ima svojstvo apsorpcije svjetlosnog zračenja apsorbira svjetlost druge valne duljine, na što utječe

struktura i okolina te molekule (Herak, 2001). Prilikom apsorpcije svjetlosti, elektroni prelaze iz osnovnog u pobuđena stanja. Tvar (analit) u uzorku apsorbira određenu količinu svjetlosti, a iz izmjerene apsorpcije može se odrediti koncentracija tvari u uzorku pomoću Beer-Lambertova zakona. Beer-Lambertov zakon povezuje apsorpciju (A), koncentraciju tvari u uzorku (c), duljinu puta svjetlosti (l) i molarni apsorpcijski koeficijent te tvari (ε). Molarni apsorpcijski koeficijent je konstanta koja je specifična za pojedinu tvar (analit) pri određenoj valnoj duljini. Izražava se u L/mol cm. Duljina puta svjetlosti je izražena u cm, a koncentracija u mol/L (Herak, 2001). Pomoću formule u nastavku može se izračunati koncentracija tvari ako je poznat molarni apsorpcijski koeficijent te tvari pri određenoj valnoj duljini (Nigović i sur., 2007).

$$A = \varepsilon * c * l$$

3.3. Metode

3.3.1. Biološki pokus

Biljni model

U ovome istraživanju kao biljni model za ispitivanje učinka 2-MNQ korišteno je sjeme bijele gorušice (*Sinapis alba* L.), porodice Brassicaceae. Bijela gorušica je jednogodišnja zeljasta biljka koja potječe iz područja mediterana (Grlić, 1990). Dobre je klijavosti te se može naći kao korov. Dobra i brza klijavost sjemena unutar 3 dana u laboratorijskim uvjetima (uz dodatak vode na podlogu) razlog je zašto je bijela gorušica korištena u ovom istraživanju.

Sjeme za istraživanje nabavljeno je u Botaničkom vrtu „Fran Kušan“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagreb.

Priprema otopina

Za tretman sjemenki bijele gorušice bilo je potrebno pripremiti otopine 2-MNQ. U prvom koraku pripremljena je matična otopina 2-MNQ koncentracije 2 mg/mL u metanolu tako što se 20 mg 2-MNQ izvagalo na analitičkoj vagi te se kvantitativno preneslo u odmjernu tikvicu od 10 mL. Potom je odmjerna tikvica nadopunjena s metanolom. Kako bi se pripremile radne otopine 2-MNQ u koncentracijama od 1, 5, 10, 20, 30 i 40 μ g/mL matična otopina je razrjeđivana s metanolom kako je prikazano tablicom 1. Za izračun korištena je formula:

$$c_1 * V_1 = c_2 * V_2$$

Tablica 1. Priprema radnih otopina 2-MNQ za tretman sjemenki bijele gorušice.

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	19,9
20 µg/mL	0,2	19,8
30 µg/mL	0,3	19,7
40 µg/mL	0,4	19,6

U istraživanju kao negativna kontrola korištena je destilirana voda, a pozitivna kontrola je bila otopina 0,02 M CuSO₄. Otopina 0,02 M CuSO₄ pripremila se tako što se 0,16 g CuSO₄ odvagalo na analitičkoj vagi te se kvantitativno preneslo u odmjernu tikvicu od 50 mL. Potom se odmjerena tikvica do oznake nadopunila s destiliranom vodom.

Pokus klijavosti

Pokus klijavosti proveden je u Petrijevim zdjelicama u koje je stavljen filtar papir kao podloga za sjemenke. Prije samog korištenja, Petrijeve zdjelice su se prebrisale etanolom. Potom je u Petrijeve zdjelice stavljen izrezani filtar papir te su se Petrijeve zdjelice s filtar papirom stavile u inkubator pod UV lampu 20-tak minuta kako bi se filtar papir i Petrijeve zdjelice sterilizirali te tako spriječila kontaminacija sjemenki bijele gorušice za vrijeme trajanja pokusa klijavosti.

Nakon sterilizacije filtar papir se impregnirao s 2 mL radne otopine 2-MNQ u koncentracijama 1, 5, 10, 20, 30 i 40 µg/mL. Kako bi se impregnirao filtar papir Petrijeve zdjelice su ostavljene oko 1 h u sterilnom inkubatoru. Sušenjem je došlo do isparavanja metanola te je tako filtar papir bio impregniran s 2-MNQ. Potom je u svaku Petrijevu zdjelicu na filter papir impregniran s 2-MNQ stavljeno po 25 sjemenki bijele gorušice. Nakon toga pažljivo je na filtar papir dodano po 2 mL deionizirane vode kako bi se omogućili uvjeti za razvoj klijanaca u sljedeća 3 dana. Petrijeve zdjelice su potom čvrsto zatvorene parafilmom. Svaka od ispitivanih koncentracija 2-MNQ napravljena je u triplikatu.

Slični postupak napravljen je i za negativnu i za pozitivnu kontrolu. Za negativnu kontrolu nakon sterilizacije filter papira i Petrijeve zdjelice, na filtar papir bez impregnacije

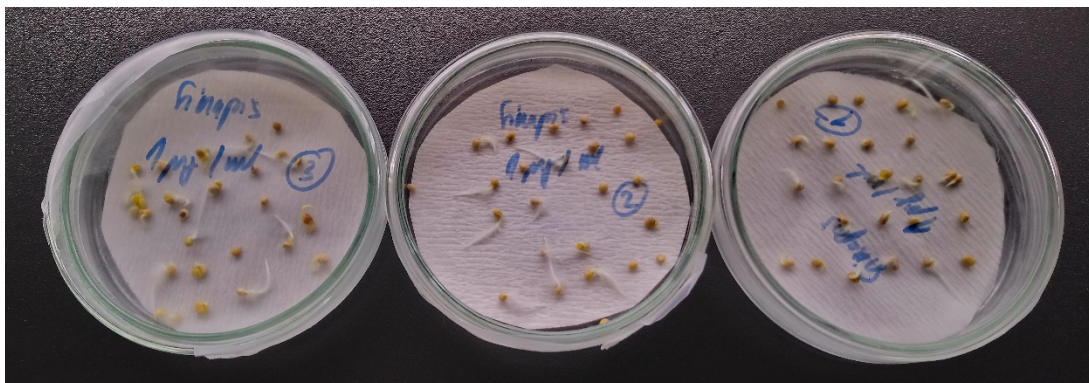
stavljene su sjemenke (n = 25) pa 2 mL destilirane voda. Za pozitivnu kontrolu filter papir je impregniran s 2 mL 0,02 M otopine CuSO₄. I negativna i pozitivna kontrola napravljene su u triplikatu. Grafički prikaz tretmana sjemenki bijele gorušice prikazan je tablicom 2.

Tablica 2. Prikaz tretmana sjemenki bijele gorušice s 2-MNQ.

	koncentracija 2-MNQ (µg/mL)						
NC	1	5	10	20	30	40	PC
NC	1	5	10	20	30	40	PC
NC	1	5	10	20	30	40	PC

Kratice: NC-negativna kontrola (tretman s deioniziranom vodom), PC-pozitivna kontrola (tretman s 0,02 M CuSO₄).

Sjemenke bijele gorušice ostavljene su u inkubatoru, u mraku sljedeća 3 dana. Nakon 3 dana klijanci su se izvagali te su se pripremili za biokemijsku analizu. Na slici 6 prikazani su klijanci bijele gorušice nakon 3-dnevne izloženosti 1 µg/mL 2-MNQ.



Slika 6. Klijanci bijele gorušice nakon 3-dnevne izloženosti 2-MNQ u koncentraciji 1 µg/mL (slikali: A. Fajdetić i I. Kenfelj).

Homogenizacija i priprema za biokemijsku analizu

Za homogenizaciju biljnog tkiva (klijanaca) nakon 3-dnevnog klijanja bilo je potrebno prethodno pripremiti otopinu 5% TCA. Otopina 5% TCA pripremila se tako što se prvo odvagalo 10 g TCA koja se kvantitativno prenesla u odmjernu tikvicu od 200 mL. Nakon toga tikvica se nadopunila do oznake s destiliranom vodom.

Nakon 3-dnevnog tretmana, klijanci iz jedne Petrijeve zdjelice prvo su odvagani te je zabilježena masa svježeg tkiva. Potom je na 100 mg svježega tkiva dodano 0,5 mL 5% otopine TCA te je biljno tkivo (klijanci) homogenizirano u tarioniku s tučkom. Tako pripremljeni homogenat je spreman za biokemijsku analizu, točnije određivanje koncentracija GSH i MDA.

3.3.2. Određivanje koncentracije GSH

Princip metode

GSH je tripeptid čija koncentracija se može izmjeriti pomoću DTNB (5,5'-ditiol-(2-nitrobenzojeva kiselina)) pri neutralnom pH (Noctor i sur., 2011). Tiolna skupina molekule GSH stupa u reakciju s DTNB pri čemu nastaje TNB (2-nitro-5-merkaptobenzojeva kiselina). TNB je žučkasto obojeni spoj čiju apsorbanciju je moguće izmjeriti pomoću UV-Vis spektrofotometra, a iz izmjerene apsorbancije može se izračunati koncentracija GSH. Za mjerenje se UV-Vis spektrofotometar mora podesiti na 412 nm. Apsorpcijski koeficijent GSH na 412 nm iznosi 14150 l/M cm.

Priprema otopina

Priprema 0,3 M K-fosfatnog pufera

0,3 M otopina K_2HPO_4 priprema se vaganjem 5,23 g K_2HPO_4 na analitičkoj vagi što se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. 0,3 M otopina KH_2PO_4 pripremi se vaganjem 4,08 g KH_2PO_4 , što se kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni destiliranom vodom do oznake. Pomoću pH metra dvije otopine se miješaju dok se ne dobije željeni pH od 7,4. U otopinu se dodaje 0,1 mM EDTA kako bi se spriječila autooksidacija GSH na zraku.

Priprema 1 mM DTNB

Prvo se na analitičkoj vagi odvaži 0,0396 g DTNB-a i kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 10 mL. Tikvica se nadopuni do oznake s 0,3 M K-fosfatnim puferom, pH 7,4. Tako je pripremljena 10 mM DTNB. Kako bi se dobila 1 mM otopina DTNB-a potrebno je otopinu 10 mM razrijediti 10 puta.

Postupak

Biljno tkivo (klijanci bijele gorušice) homogenizirano u 5% otopini TCA centrifugirano je na 7000 RPM 10 minuta kako bi se dobio čisti supernatant. Potom je odvojeno 100 μ L supernatanta te u njega dodano 900 μ L DTNB-a. Time započinje reakcija tiolne skupine GSH i DTNB-a. Nakon toga uzorak se inkubira na sobnoj temperaturi 15 minuta i zatim prebaci u kivetu i mjeri apsorbancija pomoću UV-Vis spektrofotometra na 412 nm. Uz uzorke pripremljena je slijepa proba koja je umjesto uzorka sadržavala 5 % TCA (100 μ L 5% TCA i 900 μ L DTNB-a).

Koncentracija GSH u uzorku izračuna se pomoću formule:

$$\Delta A = \varepsilon * c * l$$

U jednadžbi ΔA je razlika između apsorbancije izmjerenog uzorka i apsorbancije slijepa probe na 412nm. Apsorpcijski koeficijent (ε) iznosi 14150 1/M cm, a dužina optičkog puta (l) 1 cm.

3.3.3. Određivanje koncentracije MDA

Princip metode

Koncentracija MDA može se odrediti u reakciji s TBA. MDA i TBA reagiraju u omjeru 1:2 pri čemu nastaje kompleks $MDA(TBA)_2$ koji je crvene boje (Domijan i sur., 2014). Reakcija se ubrzava povišenom temperaturom i u kiselom mediju. Intenzitet crvenog obojenja mjeri se UV-Vis spektrofotometrom na 532 nm. Koncentracija MDA u uzorku izračuna se pomoću Beer-Lambertovog zakona uz poznati apsorpcijski koeficijent 15600 1/M cm.

Priprema otopine

Priprema 0,6% otopine TBA

Za pripremu 0,6 % otopine TBA odvagano je 0,6 g TBA i kvantitativno prebačeno u odmjernu tikvicu od 100 mL. Tikvica je poslije nadopunjena s destiliranom vodom do oznake. TBA je slabo topljiv spoj pa je potrebno polagano zagrijavati i miješati dok ne nestane talog na dnu tikvice.

Postupak

Homogenat biljnog tkiva (klijanci bijele gorušice) pripremljen u 5% otopini TCA prvo je centrifugiran na 7000 RMP 10 minuta. Potom je 200 μ L čistog supernatanta pipetirano u ependorf epruvetu te je na supernatant dodano 800 μ L 0,6% otopine TBA. Reakcijska smjesa supernatanta homogenata biljnog tkiva i 0,6% otopine TBA se promiješala i stavila zagrijavati na 90 °C 30 minuta. Nakon zagrijavanja smjesu je potrebno ohladiti do sobne temperature kako bi se zaustavilo daljnje odvijanje reakcije. Ohlađena reakcijska smjesa se prebacila u kivetu kako bi se izmjerila apsorbancija na UV-Vis spektrofotometru podešenom na 532 nm. Uz uzorke pripremljena je i slijepa proba koja je sadržavala 200 μ L destilirane vode i 800 μ L 0,6% otopine TBA. Koncentracija MDA izračuna se iz očitane apsorbancije pomoću formule:

$$\Delta A = \varepsilon * c * l$$

Apsorpcijski koeficijent (ε) iznos 15600 1/M cm, a dužina optičkog puta (l) 1 cm.

3.4. Statistička obrada podataka

Sjemenke bijele gorušice tretirane su s 2-MNQ u triplikatu, stoga je masa svježeg biljnog tkiva izračunata kao srednja vrijednost mase triplikata \pm standardna devijacija. Biokemijski parametri za svaki triplikat napravljeni su u paralelkama te su biokemijski parametri izraženi kao srednja vrijednost šest mjerenja \pm standardna devijacija.

Student t-test je korišten kao test za provjeru statističke značajnosti u odnosu na negativnu kontrolu (izloženost destiliranoj vodi). Statistička značajnost je zabilježena za rezultate kod kojih vrijedi: $P \leq 0,05$.

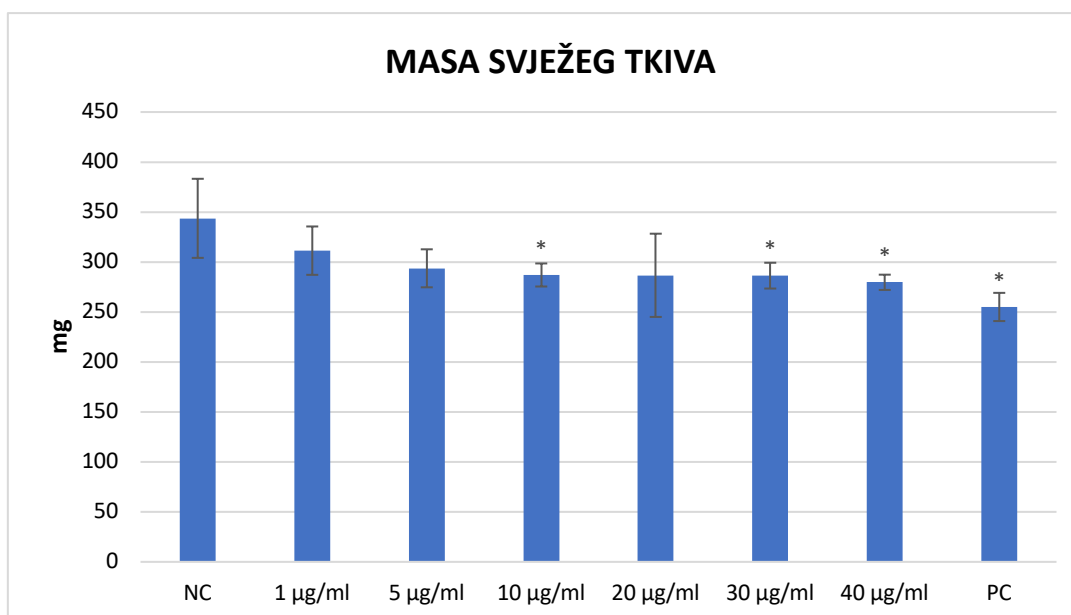
4. Rezultati i rasprava

4.1. Masa svježeg tkiva

U ovome istraživanju ispitan je učinak 2-MNQ na rast i parametre oksidacijskog stresa u klijanaca bijele gorušice. Istraživanje je provedeno na bijeloj gorušici zbog njenog brzog rasta i velike otpornosti na vanjski stres (Grlić, 1990).

Prvi izmjereni parametar u ovome istraživanju je masa svježeg tkiva. Masa svježeg tkiva proporcionalno je povezana s rastom biljke (Yeoman i Macleod, 1977). U slučaju da neki spoj ima fitotoksičan učinak na biljku to će se prvo očitovati smanjenjem njene mase, a što je znak zaostajanja u rastu nakon izloženosti tom spoju. U ovom istraživanju sjemenke bijele gorušice bile su 3 dana izložene rastućim koncentracijama 2-MNQ (1-40 $\mu\text{g/mL}$). U istraživanje je uključena i negativna kontrola što su bile sjemenke bijele gorušice izložene kroz 3 dana destiliranoj vodi te su predstavljala normalno klijanje sjemenki. Pozitivna kontrola su bile sjemenke bijele gorušice izložene 3 dana otopini 0,02 M CuSO_4 . Otopina bakra je odabrana za pozitivnu kontrolu jer su brojna istraživanja pokazala da bakar ima fitotoksičan učinak i da je taj učinak povezan s oksidacijskim stresom (Lombardi i Sebastiani, 2005).

Rezultati mase svježeg tkiva bijele gorušice prikazani su slikom 7. Na slici je vidljivo da je najveću masu svježeg tkiva imala negativna kontrola (normalni fiziološki uvjeti), odnosno klijanci bijele gorušice koje su 3 dana bili izloženi samo deioniziranoj vodi. Masa svježeg tkiva negativne kontrole bila je $343,67 \pm 39,55$ mg. Najnižu masu svježega tkiva imala je pozitivna kontrola (3-dnevna izloženost klijanaca bijele gorušice otopini 0,02M CuSO_4) te je masa svježega tkiva pozitivnih kontrola bila statistički značajno niža od negativne kontrole ($255 \pm 14,1$ mg; $P < 0,05$). U klijanaca bijele gorušice izloženih 3 dana 2-MNQ (od najmanje koncentracije 1 $\mu\text{g/mL}$ prema 40 $\mu\text{g/mL}$) zabilježen je postepeni pad mase izvaganog svježeg tkiva ovisan o koncentraciji 2-MNQ. Klijanci bijele gorušice izloženi 3 dana dvjema nižim koncentracijama 2-MNQ (1 $\mu\text{g/mL}$ i 2 $\mu\text{g/mL}$) imali su nižu masu svježega tkiva od negativne kontrole, no ta masa nije bila značajno niža od negativne kontrole. Izloženost klijanaca koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$ i višima koncentracijama 2-MNQ uzrokovala je značajan pad mase svježeg tkiva. Tako je nakon 3-dnevne izloženosti 2-MNQ u koncentraciji 10 $\mu\text{g/mL}$ zabilježen značajan pad mase svježeg tkiva u odnosu na negativnu kontrolu ($287 \pm 11,53$ mg; $P < 0,05$). Pad mase svježega tkiva klijanaca bijele gorušice pokazuje da 2-MNQ smanjuje klijavost sjemena bijele gorušice te ima fitotoksičan učinak. Zanimljivo je za primjetiti da iako je rasla koncentracija 2-MNQ nije došlo do daljnjeg značajnijeg pada svježe mase tkiva.



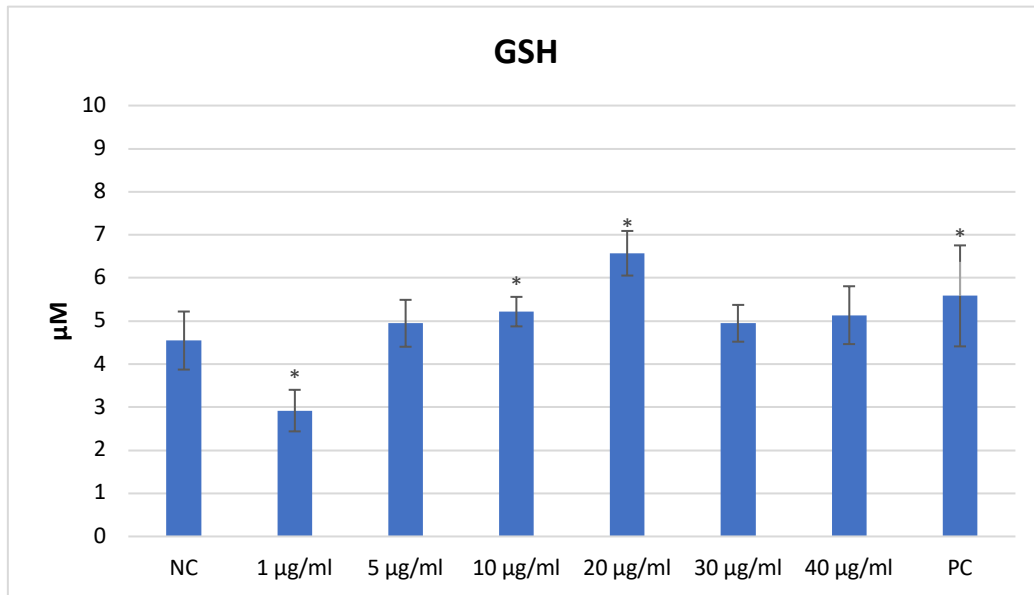
Slika 7. Masa svježeg tkiva bijele gorušice nakon tretmana s 2-MNQ u koncentracijskom rasponu 1-40 µg/mL. NC-negativna kontrola, PC-pozitivna kontrola. (* statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu).

4.2. GSH

U slijedećem koraku ispitan je utjecaj 3-dnevne izloženosti klijanaca bijele gorušice 2-MNQ na razinu GSH. GSH je tripeptid i važan antioksidans u biljnoj stanici koji sudjeluje u obrani biljke od oksidacijskog stresa (Pizzorno, 2014; Noctor i sur., 2011).

Rezultati razine GSH prikazani su na slici 8. U klijanaca bijele gorušice koji su bili 3 dana izloženi otopini 0,02 M CuSO₄ (pozitivna kontrola) zabilježen je porast razine GSH u odnosu na klijance koji su bili izloženi samo destiliranoj vodi (negativna kontrola). Razina GSH negativne kontrole bila je $4,55 \pm 0,67 \mu\text{M}$, dok je pozitivne bila $5,58 \pm 1,17 \mu\text{M}$ što je značajno više od negativne kontrole ($P < 0,05$). 3-dnevna izloženost klijanaca bijele gorušice 2-MNQ imala je različit učinak na razinu GSH. Niža koncentracija 2-MNQ (1 µg/mL) dovela je do značajnog pada razine GSH u odnosu na negativnu kontrolu ($2,92 \pm 0,48 \mu\text{M}$; $P < 0,05$). To govori da je došlo do oksidacijskog stresa u klijanaca i već pri tako niskoj koncentraciji 2-MNQ koja nije uzrokovala smanjenje mase svježega tkiva. Ti rezultati pokazuju da se biljka brani od oksidacijskog stresa izazvanog 2-MNQ pri koncentraciji 1 µg/mL. Kako je rasla koncentracija 2-MNQ tako je i rasla razina GSH. Pri izloženosti klijanaca bijele gorušice koncentraciji 2-MNQ od 20 µg/mL zabilježena je značajno viša razina GSH u odnosu na negativnu kontrolu

($6,57 \pm 0,51 \mu\text{M}$; $P < 0,05$). Dobiveni rezultati pokazuju da je biljka u obrani od oksidacijskog stresa potrošila zalihe GSH te da je kod izloženosti višim koncentracijama 2-MNQ morala ponovno sintetizirati GSH kako bi se obranila od oksidacijskog stresa izazvanog izloženosti 2-MNQ. S obzirom da koncentracije 2-MNQ od 30 i 40 $\mu\text{g/ml}$ nisu izazvale značajniji porast razine GSH možemo pretpostaviti da se radi o aklimatizaciji biljke, ali treba provest daljnja istraživanja da bi se to potvrdilo.



Slika 8. Razina GSH u klijanaca bijele gorušice nakon tretmana s 2-MNQ u koncentracijskom rasponu 1-40 $\mu\text{g/ml}$. NC-negativna kontrola, PC-pozitivna kontrola. (* statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu).

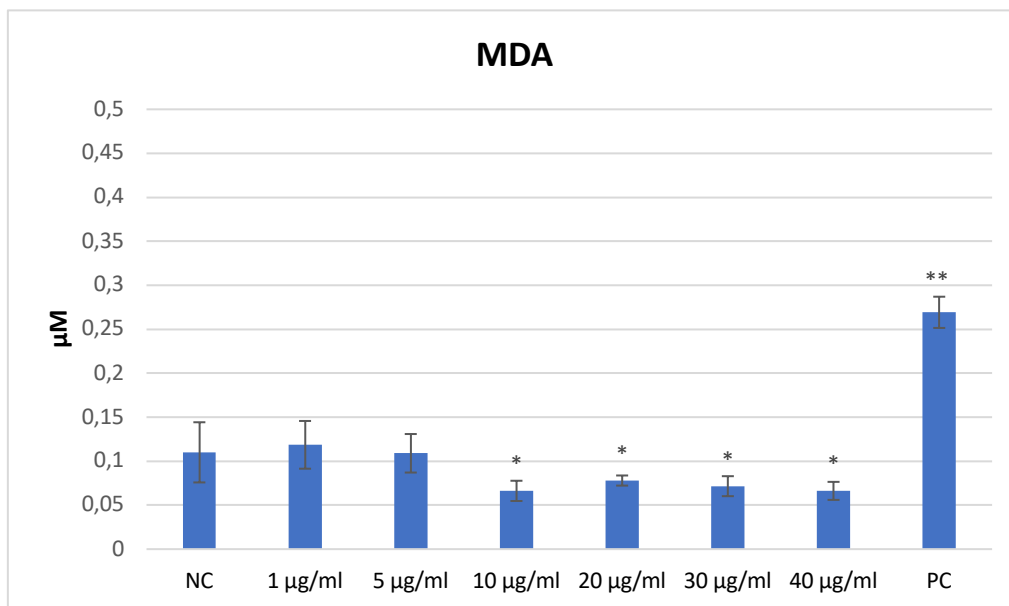
4.3. MDA

Drugi mjereni parametar oksidacijskog stresa u klijanaca bijele gorušice nakon 3-dnevne izloženosti 2-MNQ bio je MDA. MDA je produkt lipidne peroksidacije, oksidacijskog oštećenja lipida. Povećana razina MDA ukazuje na oksidacijsko oštećenje lipida (Štefan i sur., 2007).

Rezultati razine MDA prikazani su slikom 9. U klijanaca bijele gorušice koji su bili izloženi 3 dana destiliranoj vodi (negativna kontrola) razina MDA je bila $0,11 \pm 0,03 \mu\text{M}$. Razina MDA u klijanaca koji su bili izloženi otopini bakra (pozitivna kontrola) bila je $0,27 \pm 0,02$ što je bilo statistički značajno više od negativne kontrole ($P < 0,05$). Ti rezultati potvrđuju

da 3-dnevna izloženost bakru uzrokuje oksidacijski stres, odnosno lipidnu peroksidaciju u klijanaca bijele gorušice.

Izloženost klijanaca bijele gorušice kroz 3 dana dvjema nižim koncentracijama 2-MNQ (1 i 2 $\mu\text{g/mL}$) nije imala značajniji učinak na razinu MDA. No, porast koncentracije 2-MNQ doveo je do pada razine MDA. Tako je nakon 3-dnevne izloženosti koncentraciji 2-MNQ od 10 $\mu\text{g/mL}$ izmjerena značajno niža razina MDA u odnosu na negativnu kontrolu ($0,07 \pm 0,01$; $P < 0,05$). S obzirom da je izloženost bakru uzrokovala porast razine MDA bilo je za očekivati da će i tretman s 2-MNQ uzrokovati porast razine MDA. No, to se nije dogodilo. Suprotno od očekivanog došlo je do pada razine MDA s porastom koncentracije 2-MNQ. Pad razine MDA može se objasniti s porastom razine GSH. S obzirom da je biljka zbog izloženosti 2-MNQ počela sintetizirati povećanu razinu GSH ona je spriječila nastanak lipidne peroksidacije. Biljka osim GSH proizvodi i druge antioksidanse (primjerice antocijani) za obranu od oksidacijskog stresa koji su također mogli dovesti do smanjenja razine MDA tako da ovaj rezultat ne čudi (Sies i sur., 1997).



Slika 9. Razina MDA u klijanaca bijele gorušice nakon tretmana s 2-MNQ u koncentracijskom rasponu 1-40 $\mu\text{g/mL}$. NC-negativna kontrola, PC-pozitivna kontrola.

(* statistički značajna razlika u odnosu na negativnu kontrolu).

Kada se rezultati istraživanja pogledaju zajedno vidljivo je da značajan učinak na mjerene parametre ima 2-MNQ tek od koncentracije 10 $\mu\text{g/mL}$ naviše i to za sva tri mjerena parametra. Ta koncentracija je uzrokovala značajan pad mase svježeg tkiva, porast razine GSH,

ali i pad razine MDA. Stoga se zabilježeni fitotoksični učinak 2-MNQ može povezati s oksidacijskim stresom.

Pretpostavlja se da invazivnosti žljezdastog nendirka (*I. glandulifera*) doprinosi prisustvo 2-MNQ u cvijetu i listu biljke (Block i sur., 2018). Kiša ispire 2-MNQ kojega sintetizira žljezdasti nendirak s listova u okolno tlo te su okolne biljke tako izložene djelovanju 2-MNQ koji onda inhibira njihov rast. Istraživanje koje je provedeno u Češkoj ispitivalo je prisustvo 2-MNQ u listovima, stabljici i korijenju žljezdastog nendirka sakupljenom u blizini Česke Budejovice (Triska i sur., 2013). To istraživanje pokazalo je da je najviša izmjerena koncentracija 2-MNQ bila u listovima biljke te da je koncentracija u metanolnom ekstraktu listova varirala od 69 do 111 mg/kg (radi usporedbe može se pretpostaviti da se radi o 69 do 111 mg/L, odnosno o 69 do 111 µg/mL što su nešto više koncentracije od onih ispitivanih u ovome istraživanju). Ranije istraživanje provedeno je u Francuskoj te je ispitivalo prisustvo 2-MNQ u listovima, stabljici i korijenju žljezdastog nendirka (biljni materijal je sakupljen u Reidu, Alsace) (Lobstein i sur., 2001). U tom istraživanju koncentracija 2-MNQ u listovima varirala je od 0,017 do 0,3 % suhe mase biljnog materijala. Ta je koncentracija nešto niža od one izmjerene u istraživanju provedenom u Češkoj (0,3% je 0,3 g/100 g suhog tkiva, odnosno 3 mg/g, što je 3 µg/mg ili 3 µg/mL). Stoga se može pretpostaviti da su u ovome istraživanju ispitivane realne koncentracije 2-MNQ kojima će biti izložene biljke koje se nalaze u blizini žljezdastog nendirka. Biljke koje se nalaze u okolišu zajedno s žljezdastim nendirkom biti će izložene i nižoj koncentraciji od onih nađenih u njenim listovima s obzirom da kiša mora isprati 2-MNQ u okolno tlo.

2-MNQ je biokativni spoj za koji je pokazan antifungalni i antimikrobni učinak. U istraživanju antifungalnog utjecaja 2-MNQ iz žljezdastog nendirka (*I. glandulifera*) ustanovljeno je da 2-MNQ inhibira rast gljivica koji se mogu naći u cvjetnim nektarijima žljezdastog nendirka i na taj način ga štiti od invazije gljivica (Block i sur., 2019). Drugo istraživanje proučavalo je učinak 2-MNQ na *Penicillium italicum* i 2-MNQ u koncentracijama od 2 µg/mL, 4 µg/mL i 6 µg/mL je pokazao jako dobar antifungalni učinak (Guo i sur., 2019). 2-MNQ izoliran je iz *I. balsamina* (s obzirom da se baš ta vrsta u Aziji koristi u liječenju) te je ispitan njegov učinak na *H. pylori* (Wang i sur., 2011). 2-MNQ već u koncentraciji od 0,313 µg/mL (i nakon 4 sata izloženosti) je značajno inhibirao rast *H. pylori*. Ta koncentracija 2-MNQ značajno je niža od ispitivanih u ovome istraživanju te se može zaključiti da koncentracija 0,313 µg/mL koja je imala učinak na *H. pylori* ne bi imala učinak na klijance bijele gorušice. To se naravno može objasniti složenošću organizma, ali svakako je dobar podatak i daje za pretpostavku da

koncentracija 2-MNQ koja ima učinak na *H. pylori* ne bi imala neželjeni učinak na ljudsko zdravlje. U istraživanju koje su proveli Ding i sur., (2008) pokazano je da 2-MNQ ima antitumorski učinak. 2-MNQ izoliran iz lišća vrste *I. balsamina* zaustavio je rast HepG2 stanica (HepG2 stanice su stanice ljudskog hepatocelularnog karcinoma). MTT test je pokazao da je koncentracija 2-MNQ od 6,08 mg/L zaustavila rast 50% HepG2 stanica. U ovom istraživanju koncentracije ispod 10 mg/L nisu imale značajniji učinak na rast i parametre oksidacijskog stresa bijele gorušice. Iz toga se može zaključiti da 2-MNQ ima učinak na stanice ljudskog tumora pri koncentracijama pri kojima nije imao učinak na zdrave stanice. Daljnja istraživanja trebalo bi provesti na zdravim animalnim stanicama kako bi se sa sigurnošću utvrdio učinak 2-MNQ na zdrave stanice. Ipak, ovo istraživanje potvrđuje da je i biljni model dobar model za ispitivanje spojeva u pred kliničkoj fazi istraživanja.

5. Zaključci

Iz dobivenih rezultata u ovome istraživanju može se zaključiti:

- 2-MNQ je fitotoksičan stoga što je izloženost klijanaca bijele gorušice 2-MNQ dovela do smanjenja mase svježega tkiva u odnosu na negativnu kontrolu.
- Mogući mehanizam fitotoksičnog djelovanja 2-MNQ je oksidacijski stres stoga što je izloženosti 2-MNQ u klijanaca bijele gorušice dovela do promjena u razini GSH i MDA u odnosu na negativnu kontrolu.
- Biljni model prihvatljiv je u predkliničkim istraživanjima zbog etičkih i ekonomskih razloga, a dobivene rezultate moguće je ekstrapolirati na čovjeka.

6. Popis kratica, oznaka i simbola

2-MNQ - 2-metoksi-1,4-naftokinon
DTNB - Ellmanov reagens, 5,5'-ditiol-2-nitrobenzojeva kiselina
EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina
GGTP - gama glutamil transpeptidaza
GSH - reducirani oblik glutationa
GSSG - oksidirani oblik glutationa
HepG2 - stanice ljudskog hepatocelularnog karcinoma
MDA - malondialdehid
PUFA - polinezasićene masne kiseline
ROS - reaktivne kisikove vrste
RPM - okretaji po minuti
TBA - tiobarbiturna kiselina
TCA - triklorna kiselina
TNB - 5-nitro-2-tiobenzojeva kiselina

7. Literatura

- 1,4-naphthoquinone, International Agency for Research on Cancer (IARC), 2002., <https://incem.org>, pristupljeno 10.3.2022.
- 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.
- Arora A, Sairam RK, Srivastava G. Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr Sci*, 2001, 82.
- Block AK, Yakubova E, Widhalm JR. Specialized naphthoquinones present in *Impatiens glandulifera* nectaries inhibit the growth of fungal nectar microbes. *Plant Direct*, 2019, 3, 1-7.
- Budzianowski J. Naphthoquinone glucosidase of *Drosera gigantea* from in vitro cultures. *Planta Med*, 2000, 66, 667-669.
- Ding ZS, Jiang F-S, Chen N-P, Lv G-Y, Zhu C-G. Isolation and Identification of an Anti-tumor Component from Leaves of *Impatiens balsamina*. *Molecules*, 2008, 13, 220-229.
- Domijan A-M, Ralić J, Radić Brkanac S, Rumora L, Žanić-Grubišić T. Quantification of malondialdehyde by HPLC-FL - application to various biological samples. *Biomed Chromat*, 2015, 29, 41-46.
- Duru N, Gernapudi R, Zhou Q. Chemopreventive Activities of Shikonin in Breast Cancer. *Biochem Pharmacol*, 2014, 3, 163.
- Grlić Lj. Enciklopedija samoniklog jestivog bilja. Zagreb, August Cesarec, 1990, str. 135.
- Guo M, Zhang X, Li M, Li T, Duan X, Zhang D, Hu L, Huang R. Label-Free Proteomic Analysis of Molecular Effects of 2-Methoxy-1,4-naphthoquinone on *Penicillium italicum*. *Int J Mol Sci*, 2019, 20, 3459.
- Herak J. Fizika, osnove za kemijski i biokemijski studij. Zagreb, Školska knjiga 1990, str. 310.
- Lee HS, Hur J, Lee DH, Schlautman MA, Shin HS. Removal of 1,4-Naphthoquinone by Birnessite-Catalyzed Oxidation: Effect of Phenolic Mediators and the Reaction Pathway. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17, 4853.
- Lobstein A, Brenne X, Feist E, Metz N, Weniger B, Anton R. Quantitative determination of naphthoquinones of *Impatiens* species. *Phytochem Anal*, 2001, 12, 202-205.

- 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.
- Meyer GW, Bahamon Naranjo MA, Widhalm JR. Convergent evolution of plant specialized 1,4-naphthoquinones: metabolism, trafficking, and resistance to their allelopathic effects. *J Exp Bot*, 2021, 72(2), 167-176.
- Naftokinoni. Hrvatska enciklopedija, 1999, <http://www.enciklopedija.hr>, pristupljeno 29.9.2021.
- Nigović B, Jurišić Grubešić R, Vuković J. Praktikum iz analitike lijekova I. dio, Ultraljubičasta i vidljiva apsorpcijska spektrofotometrija. Zagreb, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2007, str. 34-38.
- Noctor G, Queval G, Mhamdi A, Chaouch S, Foyer CH. Glutathione. *Arabidopsis Book*. 2011, 9, 142.
- Oxidative stress, University of Washington, 2014., <https://osha.washington.edu>, pristupljeno 10.3.2022.
- Pizzorno J. Glutathione!. *Integr Med (Encinitas)*, 2014, 13, 8-12.
- Pravilnik o kliničkim ispitivanjima lijekova i dobroj kliničkoj praksi, 2015, Zagreb, Narodne novine, broj 25 (NN 25/2015).
- Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, 1997, 82, 291- 295.
- Štefan L, Tepšić T, Zavidic T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R, Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice, *Medicina*, 2007, 43, 84-93.
- Tříška J, Vrchotová N, Sýkora J, Moos M. Separation and identification of 1,2,4-trihydroxynaphthalene-1-O-glucoside in *Impatiens glandulifera* Royle. *Molecules*, 2013, 18, 8429-8439.
- Vrchotová, N.; Šerá, B.; Krejčová, J. Allelopathic activity of extracts from *Impatiens* species. *Plant Soil Environ*, 2011, 57, 57–60.
- Vukadinović V, Jug I, Đurđević B. Ekofiziologija bilja. Osijek, Sveučilišni udžbenik, naklada NSS, 2014, str. 27-31.
- Wang YC, Li WY, Wu DC, et al. In Vitro Activity of 2-methoxy-1,4-naphthoquinone and Stigmasta-7,22-diene-3 β -ol from *Impatiens balsamina* L. against Multiple Antibiotic-Resistant *Helicobacter pylori*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2011, 704721.
- Yeoman MM, Macleod AJ. Tissue (Callus) Cultures – Techniques. U: Plant tissue and cell culture, Botanical monographs, Street HE, (ur) Blackwell Scientific, 1977, str. 51.

8. Sažetak / Summary

2-metoksi-1,4-naftokinon (2-MNQ) prirodni je spoj za kojega je pokazano antifungalno, antibakterijsko i antitumorno djelovanje. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati toksičnost i oksidacijski stres kao mogući mehanizam toksičnosti 2-MNQ na biljnom modelu. Kao modelni organizam odabrana je bijela gorušica (*Sinapis alba* L.).

Sjemenke bijele gorušice bile su 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 bijele gorušice izložene 3 dana destiliranoj vodi) i pozitivna kontrola (sjemenke bijele gorušice izložene 3 dana 0,02 M otopini CuSO_4). Nakon 3-dnevne izloženosti izvagana je masa svježega tkiva te su pripremljeni homogenati klijanaca kako bi se u njima odredila razina parametra oksidacijskog stresa, glutationa (GSH) i malondialdehida (MDA). Razina GSH određena je pomoću DTNB reagensa spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 412 nm. MDA je kvantificiran u reakciji s 2-tiobarbituratnom kiselinom, a razina MDA određena je spektrofotometrijski pri 532 nm. Dobiveni rezultati statistički su obrađeni t-testom, a razina značajnosti postavljena je na $P \leq 0,05$.

3-dnevna izloženost klijanaca bijele gorušice 2-MNQ dovela je do smanjenja mase svježega tkiva. 2-MNQ (10 $\mu\text{g/mL}$) značajno je smanjio masu svježega tkiva u odnosu na negativnu kontrolu ($287 \pm 11,53 \text{ mg}$ vs. $343,67 \pm 39,55 \text{ mg}$; $P < 0,05$). S porastom koncentracije 2-MNQ zabilježen je daljnji pad mase svježega tkiva. 3-dnevna izloženost 2-MNQ u koncentraciji 1 $\mu\text{g/mL}$ značajno je smanjila razinu GSH u odnosu na negativnu kontrolu ($2,92 \pm 0,48 \mu\text{M}$ vs. $4,55 \pm 0,67 \mu\text{M}$; $P < 0,05$). Više koncentracije 2-MNQ značajno su povisile razinu GSH. Za pretpostaviti je da su klijanci bijele gorušice povećali sintezu GSH kako bi se zaštitili od djelovanja 2-MNQ. S druge strane, 3-dnevna izloženost klijanaca 2-MNQ dovela je do pada razine MDA. U klijanaca tretiranih s 2-MNQ (10 $\mu\text{g/mL}$) razina MDA je bila $0,07 \pm 0,02 \mu\text{M}$ što je bilo značajno manje od negativne kontrole ($0,11 \pm 0,03 \mu\text{M}$; $P < 0,05$). Iako je bilo za očekivati da će zbog stresa doći do porasta razine MDA, pad razine MDA je moguće objasniti pojačanom sintezom GSH koja je spriječila pojavu lipidne peroksidacije.

S obzirom da je došlo do smanjenja mase svježega tkiva klijanaca bijele gorušice nakon izloženosti 2-MNQ može se zaključiti da je 2-MNQ fitotoksičan. Izloženost 2-MNQ dovela je do promijene u razini parametara oksidacijskog stresa te se može zaključiti da je makar djelomično u fitotoksičan učinak 2-MNQ uključen oksidacijski stres. Također, ovi rezultati pokazuju da je biljni model prihvatljiv u preklinički istraživanjima zbog etičkih i ekonomskih razloga.

2-methoxy-1,4-naphthoquinone (2-MNQ) is a natural compound for which antifungal, antibacterial and antitumor activity has been shown. Therefore, the aim of this study was to examine toxicity and oxidative stress as a possible mechanism of 2-MNQ toxicity in a plant model. White mustard (*Sinapis alba* L.) was selected as the model organism.

White mustard seeds were exposed to 2-MNQ at concentrations of 1, 5, 10, 20, 30 and 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 3 days. A negative control (white mustard seeds exposed to distilled water for 3 days) and a positive control (white mustard seeds exposed to 0.02 M CuSO_4 solution for 3 days) were included in the experiment. After 3 days of exposure, fresh tissue weight was determined and seedling homogenates were prepared in order to assess the level of oxidative stress parameters, glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA). GSH level was determined using DTNB reagent spectrophotometrically at a wavelength of 412 nm. MDA was quantified by reaction with 2-thiobarbiturate acid, and the MDA level was determined spectrophotometrically at 532 nm. For statistical analysis t-test was used and the significance level was set at $P \leq 0.05$.

After 3-day exposure of white mustard seedlings to 2-MNQ a reduction in fresh tissue weight was recorded. 2-MNQ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) significantly reduced fresh tissue weight compared to the negative control (287 ± 11.53 mg vs. 343.67 ± 39.55 mg; $P < 0.05$). With the increase of 2-MNQ concentration, a further decrease in fresh tissue weight was observed. 3-day exposure to 2-MNQ at a concentration of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ significantly reduced GSH level in comparison to the negative control (2.92 ± 0.48 μM vs. 4.55 ± 0.67 μM ; $P < 0.05$). Higher 2-MNQ concentrations significantly increased GSH levels. It can be assumed that white mustard seedlings increased GSH synthesis in order to protect themselves against the action of 2-MNQ. On the other hand, 3-day exposure of seedlings to 2-MNQ led to a decrease in MDA level. In seedlings treated with 2-MNQ (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) the MDA level was 0.07 ± 0.02 μM which was significantly lower than the MDA level in the negative control (0.11 ± 0.03 μM ; $P < 0.05$). Although due to the stress an increase in MDA level was expected, a decrease occurred. The decrease in MDA level can be explained by the increased synthesis of GSH in plant tissue which prevented the occurrence of lipid peroxidation.

Since exposure of white mustard seedlings to 2-MNQ led to a decrease of fresh tissue weight, it can be concluded that 2-MNQ is phytotoxic. Additionally, exposure to 2-MNQ led to a change in the level of oxidative stress parameters, thus oxidative stress is at least partially involved in the phytotoxic effect of 2-MNQ. Also, the results of this study show that the plant model is acceptable in preclinical studies due to ethical and economic reasons.

9. Temeljna dokumentacijska kartica

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

PARAMETRI OKSIDACIJSKOG STRESA BIJELE GORUŠICE (*Sinapis alba* L.) NAKON TRETMANA S 2-METOKSI-1,4-NAFTOKINONOM

Ivan Kenfelj

SAŽETAK

2-metoksi-1,4-naftokinon (2-MNQ) prirodni je spoj za kojega je pokazano antifungalno, antibakterijsko i antitumorno djelovanje. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati toksičnost i oksidacijski stres kao mogući mehanizam toksičnosti 2-MNQ na biljnom modelu. Kao modelni organizam odabrana je bijela gorušica (*Sinapis alba* L.).

Sjemenke bijele gorušice bile su 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 bijele gorušice izložene 3 dana destiliranoj vodi) i pozitivna kontrola (sjemenke bijele gorušice izložene 3 dana 0,02 M otopini CuSO₄). Nakon 3-dnevne izloženosti izvagana je masa svježega tkiva te su pripremljeni homogenati klijanaca kako bi se u njima odredila razina parametra oksidacijskog stresa, glutaciona (GSH) i malondialdehida (MDA). Razina GSH određena je pomoću DTNB reagensa spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 412 nm. MDA je kvantificiran u reakciji s 2-tiobarbituratnom kiselinom, a razina MDA određena je spektrofotometrijski pri 532 nm. Dobiveni rezultati statistički su obrađeni t-testom, a razina značajnosti postavljena je na $P \leq 0,05$.

3-dnevna izloženost klijanaca bijele gorušice 2-MNQ dovela je do smanjenja mase svježega tkiva. 2-MNQ (10 µg/mL) značajno je smanjio masu svježega tkiva u odnosu na negativnu kontrolu ($287 \pm 11,53$ mg vs. $343,67 \pm 39,55$ mg; $P < 0,05$). S porastom koncentracije 2-MNQ zabilježen je daljnji pad mase svježega tkiva. 3-dnevna izloženost 2-MNQ u koncentraciji 1 µg/mL značajno je smanjila razinu GSH u odnosu na negativnu kontrolu ($2,92 \pm 0,48$ µM vs. $4,55 \pm 0,67$ µM; $P < 0,05$). Više koncentracije 2-MNQ značajno su povisile razinu GSH. Za pretpostaviti je da su kljanci bijele gorušice povećali sintezu GSH kako bi se zaštitili od djelovanja 2-MNQ. S druge strane, 3-dnevna izloženost klijanaca 2-MNQ dovela je do pada razine MDA. U klijanaca tretiranih s 2-MNQ (10 µg/mL) razina MDA je bila $0,07 \pm 0,02$ µM što je bilo značajno manje od negativne kontrole ($0,11 \pm 0,03$ µM; $P < 0,05$). Iako je bilo za očekivati da će zbog stresa doći do porasta razine MDA, pad razine MDA je moguće objasniti pojačanom sintezom GSH koja je spriječila pojavu lipidne peroksidacije.

S obzirom da je došlo do smanjenja mase svježega tkiva klijanaca bijele gorušice nakon izloženosti 2-MNQ može se zaključiti da je 2-MNQ fitotoksičan. Izloženost 2-MNQ dovela je do promijene u razini parametara oksidacijskog stresa te se može zaključiti da je makar djelomično u fitotoksičan učinak 2-MNQ uključen oksidacijski stres. Također, ovi rezultati pokazuju da je biljni model prihvatljiv u preklinički istraživanjima zbog etičkih i ekonomskih razloga.

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

Rad sadrži: 34 stranica, 9 grafičkih prikaza, 2 tablica i 28 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: 2-MNQ, bijela gorušica (*Sinapis alba* L.), GSH, MDA, oksidacijski stres

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. Erim Bešić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

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

Rad prihvaćen: ožujak 2022.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

OXIDATIVE STRESS PARAMETERS OF WHITE MUSTARD (*Sinapis alba* L.) AFTER TREATMENT WITH 2-METHOXY-1,4-NAPHTOKINONE

Ivan Kenfelj

SUMMARY

2-methoxy-1,4-naphthoquinone (2-MNQ) is a natural compound for which antifungal, antibacterial and antitumor activity has been shown. Therefore, the aim of this study was to examine toxicity and oxidative stress as a possible mechanism of 2-MNQ toxicity in a plant model. White mustard (*Sinapis alba* L.) was selected as the model organism.

White mustard seeds were exposed to 2-MNQ at concentrations of 1, 5, 10, 20, 30 and 40 µg/mL for 3 days. A negative control (white mustard seeds exposed to distilled water for 3 days) and a positive control (white mustard seeds exposed to 0.02 M CuSO₄ solution for 3 days) were included in the experiment. After 3 days of exposure, fresh tissue weight was determined and seedling homogenates were prepared in order to assess the level of oxidative stress parameters, glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA). GSH level was determined using DTNB reagent spectrophotometrically at a wavelength of 412 nm. MDA was quantified by reaction with 2-thiobarbiturate acid, and the MDA level was determined spectrophotometrically at 532 nm. For statistical analysis t-test was used and the significance level was set at $P \leq 0.05$.

After 3-day exposure of white mustard seedlings to 2-MNQ a reduction in fresh tissue weight was recorded. 2-MNQ (10 µg/mL) significantly reduced fresh tissue weight compared to the negative control (287 ± 11.53 mg vs. 343.67 ± 39.55 mg; $P < 0.05$). With the increase of 2-MNQ concentration, a further decrease in fresh tissue weight was observed. 3-day exposure to 2-MNQ at a concentration of 1 µg/mL significantly reduced GSH level in comparison to the negative control (2.92 ± 0.48 µM vs. 4.55 ± 0.67 µM; $P < 0.05$). Higher 2-MNQ concentrations significantly increased GSH levels. It can be assumed that white mustard seedlings increased GSH synthesis in order to protect themselves against the action of 2-MNQ. On the other hand, 3-day exposure of seedlings to 2-MNQ led to a decrease in MDA level. In seedlings treated with 2-MNQ (10 µg/mL) the MDA level was 0.07 ± 0.02 µM which was significantly lower than the MDA level in the negative control (0.11 ± 0.03 µM; $P < 0.05$). Although due to the stress an increase in MDA level was expected, a decrease occurred. The decrease in MDA level can be explained by the increased synthesis of GSH in plant tissue which prevented the occurrence of lipid peroxidation.

Since exposure of white mustard seedlings to 2-MNQ led to a decrease of fresh tissue weight, it can be concluded that 2-MNQ is phytotoxic. Additionally, exposure to 2-MNQ led to a change in the level of oxidative stress parameters, thus oxidative stress is at least partially involved in the phytotoxic effect of 2-MNQ. Also, the results of this study show that the plant model is acceptable in preclinical studies due to ethical and economic reasons.

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

Thesis includes: 34 pages, 9 figures, 2 tables and 28 references. Original is in Croatian language.

Keywords: 2-MNQ, white mustard (*Sinapis alba* L.), GSH, MDA, oxidative stress

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
Erim Bešić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Mirela Matic, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: March 2022.