

Učinak 2-metoksi-1,4-naftokinona na parametre oksidacijskog stresa u klijanaca obične rotkvice (*Raphanus sativus* L.)

Kraljević, Sven

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:778143>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-16**



Repository / Repozitorij:

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



Sven Kraljević

**Učinak 2-metoksi-1,4-naftokinona na parametre
oksidacijskog stresa u klijanaca obične rotkvice
(*Raphanus sativus* L.)**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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.

Veliko hvala mentorici na pomoći, strpljenju i pažnji tijekom izrade i pisanja ovog rada. Zahvalio bih se svojoj obitelji i prijateljima što su mi kroz studij bili velika podrška.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1.Okidacijski stres.....	2
1.1.1. Reaktivne kisikove vrste – ROS-ovi.....	2
1.1.2. Štetni učinci ROS-ova na biljni organizam.....	3
1.1.3. Glutation.....	4
1.1.4. Flavonoidi.....	6
1.2. Naftokinoni.....	9
1.2.1. Farmakološka svojstva derivata 1,4-NQ.....	10
2. OBRAZLOŽENJE TEME	12
3. MATERIJALI I METODE.....	14
3.1. Materijali.....	15
3.1.1. Kemikalije.....	15
3.1.2. Oprema.....	16
3.1.3. Biljni model.....	16
3.2. Metode.....	17
3.2.1. Biološki pokus – germinacija.....	17
3.2.1.1. Priprema otopina za pokus germinacije.....	17
3.2.1.2. Pokus germinacije (klijavosti).....	18
3.2.1.3. Priprema homogenata biljnog tkiva za mjerenje biokemijskih parametara	19
3.2.2. Određivanje sadržaja GSH.....	20
3.2.2.1. Princip metode određivanja sadržaja GSH.....	20
3.2.2.2. Priprema otopina za određivanje sadržaja GSH.....	20
3.2.2.3. Postupak određivanja sadržaja GSH.....	21
3.2.3. Određivanje sadržaja antocijanina.....	22
3.2.3.1. Princip metode određivanja sadržaja antocijanina.....	22
3.2.3.2. Postupak određivanja sadržaja antocijanina.....	23
3.2.4. Određivanje sadržaja MDA.....	24
3.2.4.1. Princip metode određivanja sadržaja MDA.....	24

3.2.4.2. Priprema otopina za određivanje sadržaja MDA.....	24
3.2.4.3. Postupak određivanja sadržaja MDA.....	24
3.3. Statistička obrada podataka.....	25
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	26
4.1. Masa svježeg tkiva.....	27
4.2. GSH.....	29
4.3. Antocijanini.....	30
4.4. MDA.....	31
5. ZAKLJUČCI.....	36
6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA.....	38
7. LITERATURA.....	40
8. SAŽETAK/SUMMARY.....	47
9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Oksidacijski stres

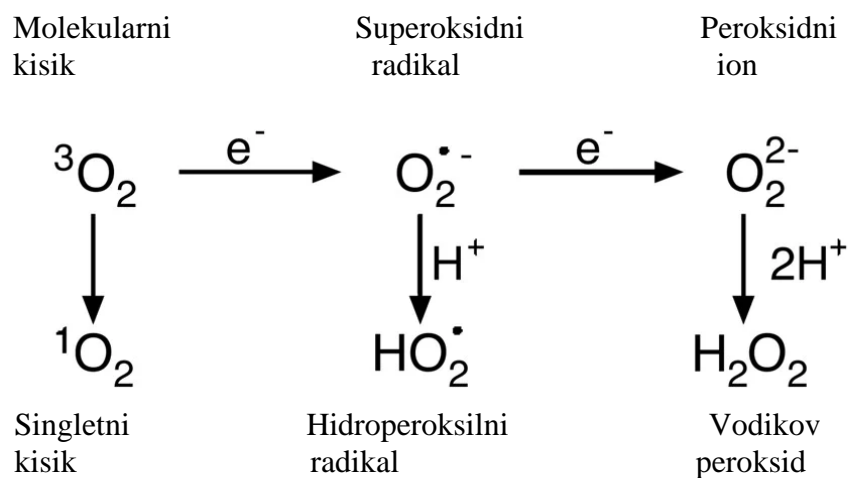
Oksidacijski stres označava pojam koji se odnosi na stanje do kojeg dolazi uslijed prevelike proizvodnje i akumulacije reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) uzrokovanih unutarnjim ili vanjskim čimbenicima. ROS-ovi oštećuju komponente biljne stanice, što dovodi do njihove disfunkcije i u konačnici smrti biljnog organizma. Povećana razina ROS-ova nastaje kao neravnoteža između stvaranja ROS-ova i njihove detoksifikacije unutarstaničnim antioksidacijskim sustavom, a što je posljedica promjena unutar normalne stanične fiziologije ili prevelikog *de novo* stvaranja ROS-ova kao odgovor na staničnu signalizaciju stresa ili imunosnu obranu organizma te zbog djelovanja vanjskih uvjeta (Demidchik i sur., 2015). Neki od faktora koji potiču povećano stvaranje ROS-ova pa time i oksidacijski stres su: salinitet, prisutnost patogena, suša, UV zračenje, temperatura, teški metali i herbicidi (Xie i sur., 2019).

1.1.1. Reaktivne kisikove vrste – ROS-ovi

Reaktivne vrste ili slobodni radikali pripadaju skupini spojeva koji u svojem sastavu posjeduju nesparene elektrone te su zbog toga iznimno reaktivni. ROS-ovi se odnose na reaktivne vrste koji sadrže jedan ili više atoma kisika s nesparenim elektronima, ali se ROS-ovima smatraju vodikov peroksid (H_2O_2) i singletni kisik (1O_2) iako po strukturi nisu radikali.

ROS-ovi se proizvode kako u fiziološkim tako i patološkim uvjetima. Naime, neprestanom proizvodnjom kisika tijekom procesa fotosinteze u biljkama djelovanjem Sunčevog zračenja neizbježna je produkcija ROS-ova, na tilakoidnim membranama unutar kloroplasta tijekom reakcija na svjetlu ili u stromi tijekom reakcija fiksacije ugljika, metaboličkim reakcijama unutar peroksisoma i oksidativnom fosforilacijom unutar mitochondrija. Osim toga, ROS-ove u fiziološkim uvjetima proizvode NADPH-oksidaza, amin oksidaza ili peroksidaza u relativno niskim koncentracijama koji djeluju kao sekundarni glasnici te usmjeravaju stanicu u apoptozu, reguliraju rast ili dovode do niza reakcija unutar stanice kako bi se očuvao stanični integritet uslijed stresnih uvjeta poput napada patogena ili okolišnih promjena (Mittler i sur., 2002). Atmosferski kisik (O_2) potreban je svim aerobnim organizmima i u usporedbi s ROS-ovima nije reaktivan. Da bi iz molekule kisika nastao reaktivni radikal, molekula kisika treba primiti energiju. Izvori energije mogu biti UV ili ionizirajuće zračenje, elektroni visoke energije poput elektrona respiracijskog lanca ili pak druge reaktivne vrste

(Demidchik i sur., 2015). Na slici 1 prikazan je proces nastanka ROS-ova uslijed redukcije molekularnog kisika.



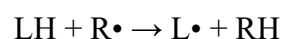
Slika 1: Nastajanje ROS-ova redukcijom molekularnog kisika (preuzeto s url: <https://osha.washington.edu/modrn/module4> i prilagođeno)

1.1.2. Štetni učinci ROS-ova na biljni organizam

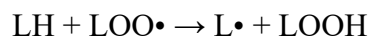
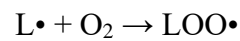
Neprekidna izloženost stresu u biljaka dovodi do akumulacije ROS-ova što posljedično stvara uvjete za stanično oštećenje i patološka stanja. ROS-ovi stupaju u niz reakcija kojima reverzibilno ili ireverzibilno oštećuju stanične tvore i uzrokuju promjene kako u strukturi tako i funkciji biljne stanice. Oksidacijskom oštećenju podložne su biomolekule poput proteina, lipida, ugljikohidrata i polinukleinskih kiselina (Demidchik i sur., 2015).

Iako prisutna u fiziološkim uvjetima, peroksidacija lipida smatra se obilježjem oksidacijskog stresa te indikatorom za utvrđivanje lipidnog oštećenja pod stresnim uvjetima, uvelike zbog samog mehanizma tzv. lančanih reakcija u kojima se generiraju slobodni radikali te produkti koji se daju izmjeriti jednostavnim analitičkim metodama. Lipidna peroksidacija najviše zahvaća polinezasićene masne kiseline (PUFA-e), a sastoji se od tri faze: inicijacije, propagacije i terminacije (Štefan i sur., 2007).

U fazi inicijacije ROS-ovi poput hidroksilnog (OH^{\bullet}), hidroperoksilnog (HO_2^{\bullet}), alkoksilnog (RO^{\bullet}) te peroksilnog (RO_2^{\bullet}) radikala odcjepljuju vodikov atom iz metilenske veze ($-\text{CH}_2-$) unutar PUFA-e. Time se stvara ugljikov radikal ($-\text{CH}^{\bullet}$) ili lipidni radikal (L^{\bullet}) kako je prikazano reakcijom:



Najviše zastupljeni membranski lipidi, fosfolipidi, podložni su peroksidaciji zbog dvostrukih veza unutar nezasićenih masnih kiselina koje oslabljivanjem C-H veza olakšavaju odcjepljivanje atoma vodika. Lipidni radikal (L•) potom može aktivirati molekulu kisika (O₂) pri čemu nastaje lipidni peroksilni radikal (LOO•), koji ima sposobnost odcijepiti vodikov atom iz neke susjedne polinezasićene masne kiseline (LH) te time nastaju lipidni hidroperoksid (LOOH) i sekundarni lipidni radikal (L•) kako je prikazano reakcijama:



Tako započinje faza propagacije što upućuje na činjenicu da jedna reakcija pokreće niz lančanih reakcija čime se sve više molekula PUFA prevodi u LOOH (Štefan i sur., 2007). Uz to LOOH podliježu redoks reakciji s prijelaznim metalima, pretežito željezom (Fe²⁺) ili bakrom (Cu⁺) i formiraju lipidni alkoksilni radikal (LO•), koji je također reaktivan i potiče daljnje kidanje vodika sa susjednih masnih kiselina. U uvjetima stalnog započinjanja lipidne peroksidacije, reakcije terminacije nužne su za ograničavanje mjere tog procesa stvarajući tako neradikalne produkte (NRP) i istovremeno neutralizirajući slobodne radikale (Catalá i sur., 2006). Nastanak NRP prikazan je reakcijom:



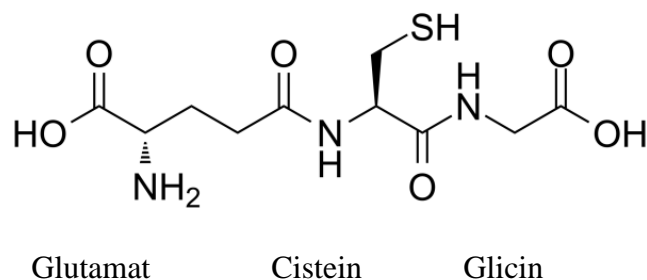
Lipidna peroksidacija dovodi do oštećenja membrana, narušavanja njihove barijerne funkcije koju zatim slijedi dezintegracija organela, oksidacija i gubitak funkcije proteina i nukleinskih kiselina (Halliwell i sur., 1999; Farmer i sur., 2013). Razina završnih produkata lipidne peroksidacije, među kojima su najviše proučavani malondialdehid (MDA), 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) te 4-hidroksi-2-heksenal (HHE) može se izmjeriti različitim analitičkim metodama te se koriste kao markeri u svrhu praćenja i utvrđivanja razine oksidacijskog stresa (Shulaev i sur., 2006).

1.1.3. Glutation

Biljke su razvile nekoliko mehanizama obrane od oksidacijskog stresa koji su predmetom mnogih znanstvenih istraživanja. Antioksidansi su značajan faktor u staničnoj obrani od ROS-ova i oksidacijskog stresa. U stresnom okruženju poput zračenja, ekstremnih temperatura, napada patogena, izlaganja teškim metalima i otrovima, biljke mogu *de novo* proizvesti enzime koji kataliziraju reakcije koje prevode ROS-ove u manje toksične i po stanicu

manje štetne produkte. To su npr. citosolna, mitohondrijska ili kloroplastna superoksid dismutaza (SOD), katalaza, peroksidaza, tioredoksin i glutaredoksin (Demidchik, i sur., 2014). Neenzimski antioksidansi poput askorbinske kiseline, glutationa (GSH), prolina, betaina, karotena, nekih flavonoida ili tokoferola izmjenom elektrona neutraliziraju slobodne radikale, a sami se prevode u oksidirane produkte (Xie i sur., 2019). Također, prisutni su i enzimi koji prevode oksidirane oblike antioksidansa u reducirani oblik spreman na ponovnu oksidaciju. To su primjerice monodehidroaskorbatna reduktaza, glutation reduktaza i glutation S-transferaza (Demidchik i sur., 2014). Osim toga biljke vjerojatno sintetiziraju izoforme proteina i lipida koji su manje osjetljivi na oksidaciju. To uključuje signalizaciju preko aktivacije specifičnih genetičkih i metaboličkih puteva (Myouga i sur., 2008). Apoptotičke stanice koje biljke odlažu u slojevima mogu im poslužiti kao mehanička zaštita od infekcija i agresivnih čimbenika (Maathuis i sur., 2007). Naposljetku, biljke mogu aktivirati sustave biosinteze za popravak oštećenih staničnih komponenti (Møller i sur., 2007).

Vrlo važan stanični antioksidans u obrani od ROS-ova je GSH, koji je tripeptid sastavljen od aminokiselina glutamata, cisteina i glicina (slika 2). Njegov utjecaj odražava se na fiziološke procese poput staničnog rasta, diferencijacije i smrti, otpora na patogene i enzimsku regulaciju. Unutar stanice nalazi se u mnogim staničnim odjeljcima uključujući citosol, endoplazmatskom retikulum, kloroplaste, mitohondrije, vakuolu i peroksisome (Mullineaux i sur., 2005).



Slika 2: Kemijska struktura tripeptida GSH

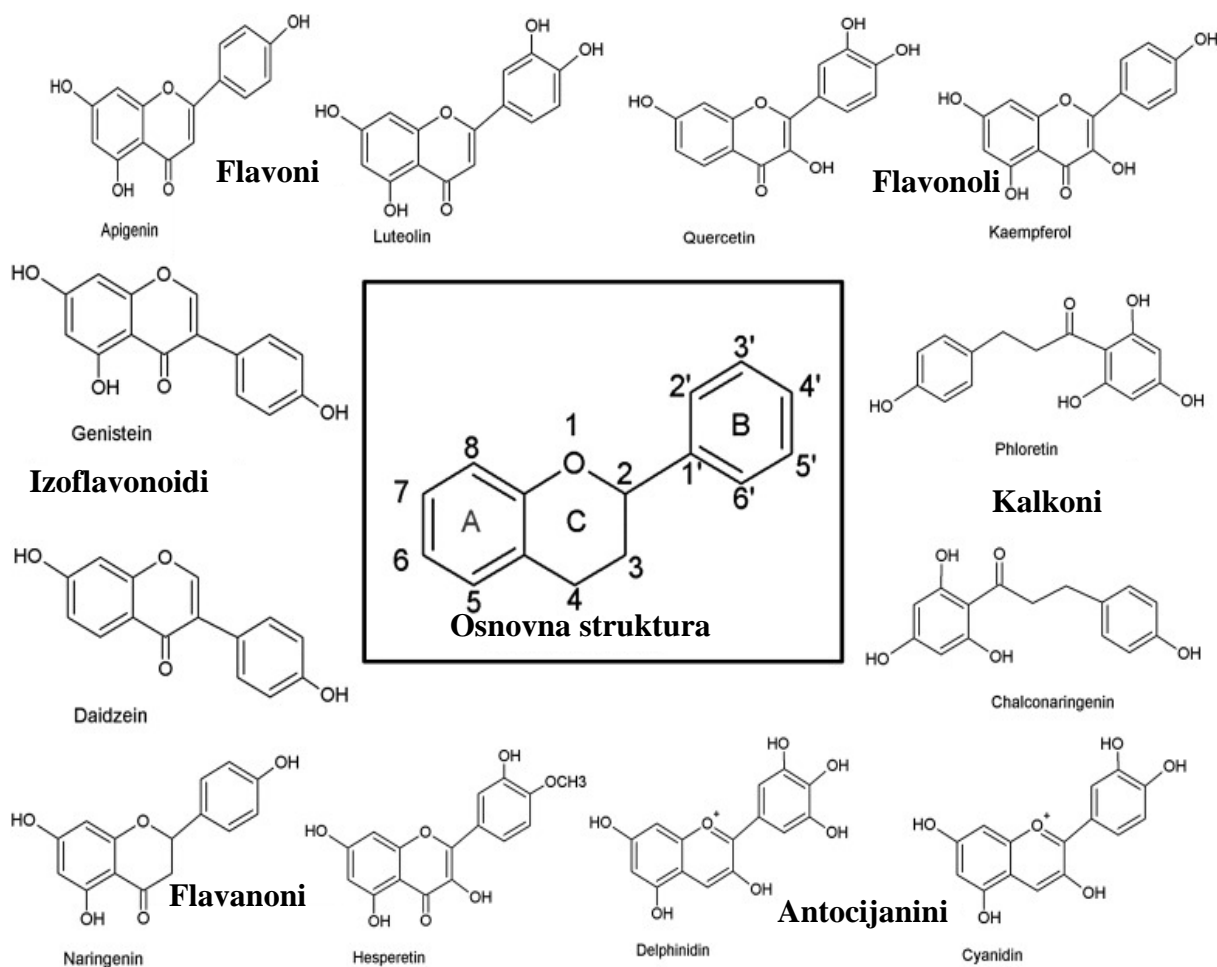
Prema kemijskoj strukturi visok reduktivni potencijal posjeduje cistein sa svojom sulfhidrilnom skupinom (-SH) jakog nukleofilnog karaktera. Naime, GSH djeluje kao „hvatač“ radikala poput vodikova peroksida (H_2O_2), singletnog kisika (1O_2) ili hidroksilnog radikala ($OH\bullet$) čime sam postaje glutation radikal ($GS\bullet$). Glutation radikal se potom detoksificira

drugim glutation radikalom i time nastaje oksidirani oblik glutationa koji je vezan difulfidnom vezom (GSSG). Glutation reduktaza (GR) prevodi oksidirani oblik glutationa (GSSG) natrag u reducirani aktivni oblik, GSH (Das i sur., 2014).

Obnavljanje zaliha reduciranog GSH od iznimne je važnosti za održavanje reduktivnih uvjeta unutar stanice tj. normalnog omjera između reduciranog i oksidiranog oblika glutationa. Ukoliko dođe do stanja intenzivnog stresa, dolazi do smanjenja razine reduciranog oblika, a pojačava se oksidativno redoks stanje što dovodi do oštećenja stanice (Tausz i sur., 2004). Stoga razina GSH također može poslužiti kao marker stresa biljnog organizma. Postoje različite metode mjerenja razine GSH poput spektrofotometrije, fluorescencije ili HPLC metode bilo za određivanje reduciranog ili oksidiranog oblika glutationa te ukupnog sadržaja glutationa (Hajdinák i sur., 2018).

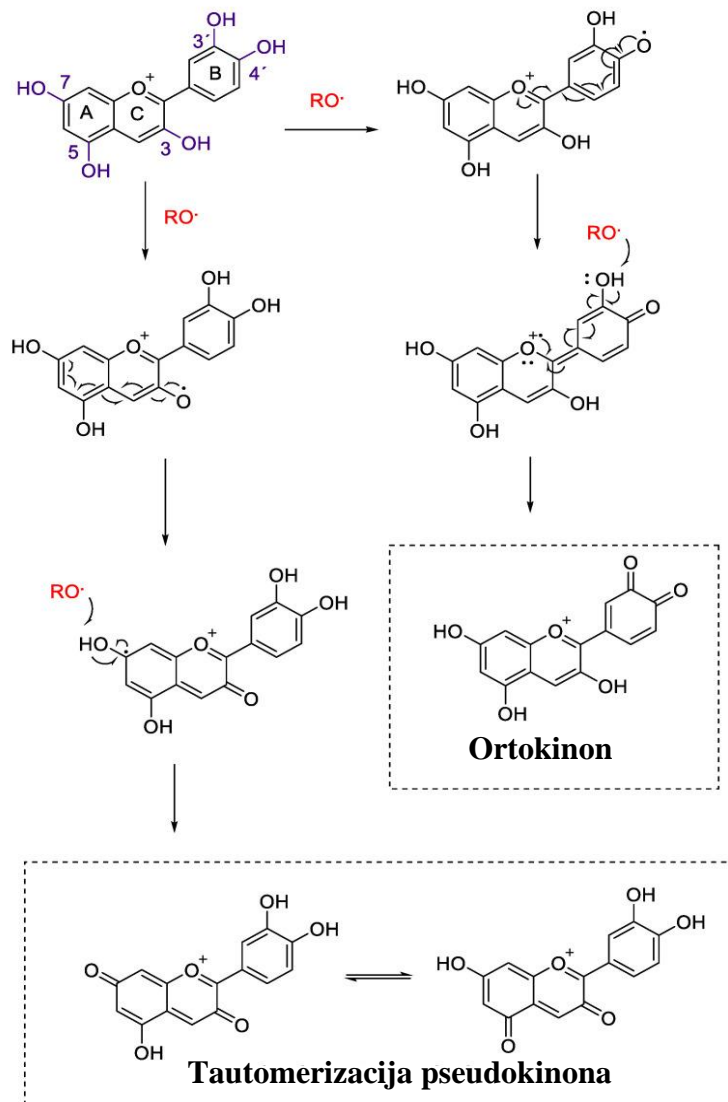
1.1.4. Flavonoidi

Flavonoidi su sekundarni biljni metaboliti koji pripadaju polifenolnoj skupini spojeva. Ovisno o strukturnim različitostima, mogu se podijeliti u nekoliko skupina: flavoni, flavonoli, izoflavonoidi, antocijanini, flavanoni i kalkoni (slika 3). Postoje u obliku aglikona, glikozida i metiliranih derivata. Nalaze se pretežno u vakuoli i staničnoj stijenci (Petruša i sur., 2013). Njihovu biološku aktivnost uvjetuje struktura što znači da ovisno o stupnju supstitucije, konjugacije i polimerizacije ispoljuju svoje učinke (Heim i sur., 2002). Osim što su uključeni u procese životnog ciklusa biljke poput oprašivanja ili razvoja klice, flavonoidi sudjeluju i u obrani biljnog organizma od vanjskih štetnih učinaka (Hernández i sur., 2009). Mnogi geni koji su odgovorni za biosintezu flavonoida induciraju se pod stresnim uvjetima što posljedično dovodi do povećanja razine flavonoida u biljnom organizmu. Na to utječu uvjeti poput mehaničkog oštećenja, suše, prisutnosti teških metala i nedostatka hranjivih tvari (Winkel-Shirley i sur., 2002.).



Slika 3: Strukturna podjela flavonoida (preuzeto i prilagođeno prema Panche i sur., (2016) uz dopuštenje izdavača)

Antocijanini su podskupina flavonoida koji su prisutni kao pigmenti unutar vakuole te daju boju plodovima i laticama cvjetova, a mogu se naći i u vegetivnim organima. Neki od najčešće prisutnih antocijanina jesu cijanidin, delfinidin, malvidin, peonidin i pelargonidin. Igraju važnu ulogu u apsorpciji UV zračenja, oprašivanju i zaštiti biljaka od oksidativnog stresa. Posljednje navedeno ukazuje na njihovu antioksidativnu aktivnost koja je posljedica njihove strukture (slika 4). Naime, oni imaju sposobnost „gasiti“ radikale i stvoriti stabilne produkte te na taj način spriječiti daljnju oksidaciju staničnih biomolekula (Mattioli i sur., 2020).

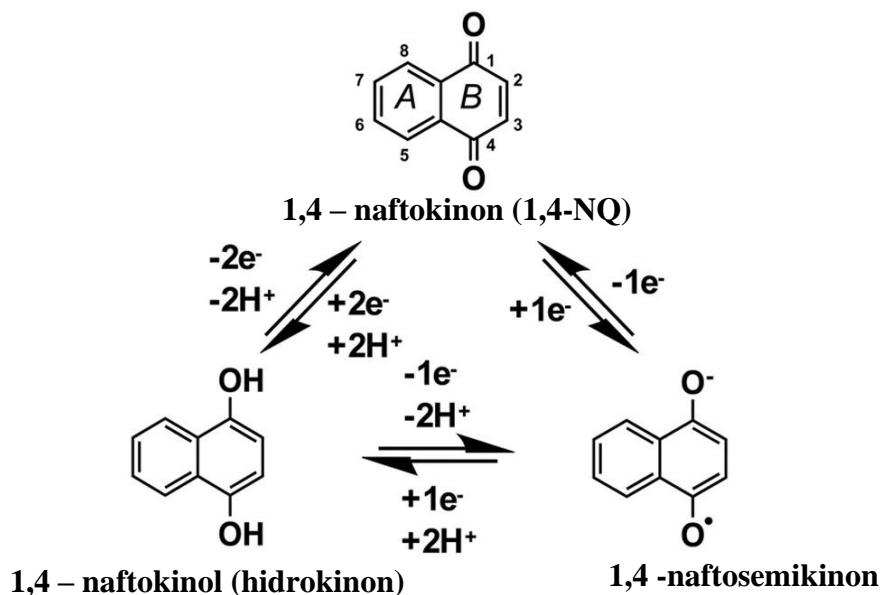


Slika 4: Mogući mehanizam kojim antocijanini „gase“ ROS-ove na primjeru cijanidina (preuzeto i prilagođeno prema Mattioli i sur., (2020) uz dopuštenje izdavača)

Činjenica da antocijanini apsorbiraju zračenje različitih valnih duljina u različitom pH mediju koristi se za spektrofotometrijsko određivanje njihove razine. Antocijanini pokazuju visoku *in vitro* antioksidativnu aktivnost sličnu askorbinskoj kiselini i tokoferolu (Hernández i sur., 2009). Uzimajući to u obzir, razina antocijanini može poslužiti kao još jedan indikator oksidativnog staničnog stresa.

1.2. Naftokinoni

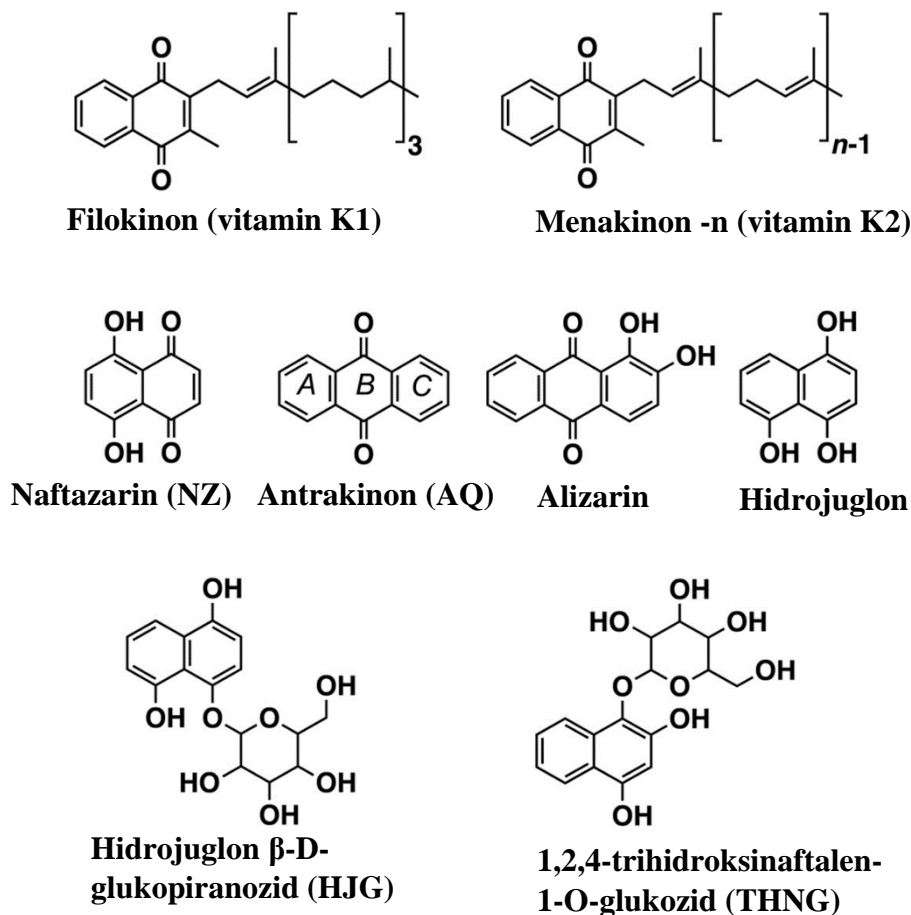
Naftokinoni (NQ) nezasićeni su ciklički diketoni, derivati naftalena. Najvažniji izomer je 1,4-naftokinon (1,4-NQ). Kako je vidljivo na slici 5 strukturu 1,4-NQ čine benzenski prsten (A) vezan za konjugirani ciklički diketon (B) u kojem su karbonilne skupine orijentirane u para položaju. Kao sekundarne metabolite, 1,4-NQ proizvode neki mikroorganizmi, gljive te biljke iz različitih porodica (Droseraceae, Juglandaceae, Nepenthaceae i Plumbaginaceae) (Binder i sur., 1989; Crouch i sur., 1990; Lin i sur., 2003). U biljkama su prisutni i derivati 1,4-NQ supstituirani metilnom, hidroksilnom ili metoksi skupinom te postraničnim alkilnim lancem. Zbog svoje strukture podložni su redoks reakcijama i stvaranju ROS-ova, tj. imaju pro-oksidativno djelovanje (Klotz i sur., 2014).



Slika 5: Oksidacijska stanja 1,4 NQ (preuzeto i prilagođeno prema Widhalm i sur., (2016) uz dopuštenje izdavača)

Koristeći nekoliko različitih metaboličkih puteva, biljke proizvode na tisuće različitih derivata 1,4-NQ (slika 6). Neki od tih spojeva su plumbagin (5-hidroksi-2-metil-1,4-naftokinon) prisutan u biljkama porodica Plumbaginaceae, Droseraceae ili Ebenaceae i junglon (5-hidroksi-1,4-naftokinon) pronađen u prarodicama Juglandaceae, Cesalpiniaceae, Fabaceae. 2-hidroksi-1,4-naftokinon (2-HNQ) poznat i pod nazivom loson te 2-metoksi-1,4-naftokinon (2-MNQ) često su prisutni u vrstama roda *Impatiens* (Hook i sur., 2014). Ti prirodni produkti kao i brojni njihovi derivati posjeduju razna biokemijska svojstva modulirajući tako različite

ekološke i farmakološke učinke, čime se otvaraju novi izazovi u istraživanju moderne hortikulture i razvoju potencijalnih novih lijekova (Widhalm i sur., 2016).



Slika 6: Primjeri derivata 1,4-NQ koje proizvode biljke (preuzeto i prilagođeno prema Widhalm i sur., (2016) uz dopuštenje izdavača)

1.2.1. Farmakološka svojstva derivata 1,4-NQ

Brojne studije utvrdile su obećavajuća farmakološka svojstva derivata 1,4-NQ. Tako su Wang i suradnici (2011) u svome *in vitro* istraživanju pokazali da 2-MNQ djeluje učinkovito na *H. pylori*. U provedenom istraživanju 2-MNQ je u odnosu na ostale ispitivane spojeve zaustavio rast *H. pylori* u najnižoj koncentraciji (minimalna inhibitorna koncentracija, MIC), što znači da 2-MNQ ima potencijal u razvoju lijekova protiv te multirezistentne bakterije odgovorne za karcinom želuca. Osim toga kemijski sintetizirani N,O acetali derivirani iz 1,4-NQ (2-(metoksimetil)-amino-1,4-naftokinon; 2-(etoksimetil)-amino-1,4-naftokinon te 2-

(propiniloksimetil)-amino-1,4-naftokinon pokazali su značajan antimikrobni učinak protiv stvaranja biofilma kod meticilin rezistentnog *S. aureusa* (MRSA) (Novais i sur., 2020). 2-HNQ (loson) i njegovi kemijski sintetizirani derivati pokazali su antimikrobna svojstva te su spriječili razvoja rezistencije kod *S. aureus* što otvara mogućnost pronalaska novih spojeva za razvoj učinkovitih antibiotika (Song i sur., 2020).

Na području kemoterapeutika opsežno se istražuju derivati 1,4-NQ poput plumbagina izoliranog iz korijena biljke *Plumbago zeylanica* L. Njegovi antikancerogeni učinci pokazani su *in vitro* na stanicama različitih vrsta zloćudnih tumora poput leukemijskih stanica, stanica karcinoma dojke, melanoma i prostate (Yin i sur., 2020). U istraživanjima je plumbagin pokazao dobra antikarcinogena svojstva, no zbog niske bioraspoloživosti imao bi ograničavajuću primjenu u kliničkoj praksi. Usprkos tomu, vjeruje se da bi se modificiranjem formulacija mogla postići veća biodostupnost, a samim time i mogućnost primjene plumbagina kao kemoterapeutika (Yin i sur. 2020).

Osim antimikrobnih i antitumorskih svojstava, neki derivati 1,4-NQ prepoznati su kao potencijalni neuroprotektivni agensi. Jedna je studija pokazala kako 2-MNQ stimulira proliferaciju tzv. OEC stanica, odnosno stanica olfaktornog živčanog sustava (Chen i sur., 2020). OEC stanice od iznimne su važnosti za razvoj i regeneraciju olfaktornog sustava te su time kandidati za terapiju transplantacije stanica kod ozljeda središnjeg živčanog sustava, pogotovo kod ozljeda leđne moždine. OEC stanice teško preživljavaju transplantaciju, a pohrana dovoljnog broja stanica predstavlja veliki izazov. Stoga spojevi poput 2-MNQ koji promoviraju proliferaciju OEC stanica bez gubitka željenih fenotipskih obilježja vide se kao temelj za daljnja istraživanja u razvoju terapijskih mogućnosti liječenja središnjeg živčanog sustava (Chen i sur., 2020).

Mnogi derivati 1,4-NQ posjeduju svojstva poželjna za lijekove u liječenju Alzheimerove bolesti (AD). Kao glavni činitelji nastanka i razvoja AD prepoznati su: enzim acetilkolin esteraza (AChE), tau protein, nakupljanje β -amiloidnih plakova te neuroinflamatorni procesi te bi spoj koji bi inhibirao navedene procese i nakupljanje plakova bio od velike važnosti za razvoj AD lijekova. U istraživanju koje su proveli Campora i suradnici (2021) derivati NQ i antrakinona pokazali su *in vitro* antiamiloidna svojstva, inhibitorna svojstva na enzime AChE i butirilkolin esterazu (BChE), antioksidativna svojstva te smanjili agregaciju tau proteina te stoga mogu poslužiti u razvoju lijekova protiv ove do kraja neistražene bolesti.

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U novije vrijeme povećan je interes za ekonomiju temeljenu na održivoj proizvodnji i obnovljivim izvorima energije, tzv. bioekonomiju. To je potaknulo sektor biotehnologije na proizvodnju visoko kvalitetnih proizvoda za različite namjene, a fokus se stavlja na proizvodnju hrane, kemikalija i lijekova. Kao izvoru za tu proizvodnju poseže se za biljkama i njihovim sekundarnim metabolitima (Foong i sur., 2020). Za mnoge biljke farmakološke studije pokazuju njihova obećavajuća anitmikrobna, antitumorska, antihistaminska, analgetska, protuupalna, antireumatska i antioksidativna svojstva (Oku i sur., 2001; Yang i sur., 2001; Sakunphueak i sur., 2012; Meenu i sur., 2015). Ljekovita svojstva biljaka mogu se pripisati visokoj zastupljenosti prirodnih komponenti poput primjerice kinona, antocijanina, glikozida, alkaloida, saponina i terpena (Singh i sur., 2017). Sekundarni metaboliti biljaka koji u novije vrijeme privlače pažnju znanstvenika su derivati 1,4-NQ. Od njih najviše se istražuje metabolit 2-MNQ stoga što je u *in vitro* uvjetima na različitim staničnim kulturama pokazano njegovo antitumorsko i antimetastasko djelovanje (Ding i sur., 2008; Wang i sur., 2012; Liew i sur., 2014; Ong i sur., 2015). Međutim, mehanizam kojim 2-MNQ ispoljava svoj antitumorski učinak kao i njegovo djelovanje na zdrave stanice još uvijek nije dovoljno istražen.

Spoj koji pokazuje potencijalni farmakološki učinak mora proći niz ispitivanja te je osim mehanizma njegovog farmakološkog i terapijskog djelovanja potrebno istražiti njegov utjecaj na živom modelu poput zdravih stanica ili životinjskih modela. U ovom istraživanju zbog jednostavnosti te iz etičkih razloga za ispitivanja odabran je biljni model, obična rotkvica (*Raphanus sativus* L).

Ovaj diplomski rad temelji se na pretpostavci da će 2-MNQ u modelnom organizmu izazvati pojavu oksidacijskog stresa tj. da će navedeni sekundarni metabolit potaknuti modelni organizam na proizvodnju ROS-ova. Uslijed toga doći će do promjena u sadržaju biokemijskih parametara oksidacijskog stresa što se može pratiti mjerenjem sadržaja GSH, antocijanina i MDA.

Istraživanje će se provesti na klijancima rotkvice koji će biti izloženi tri dana rasponu koncentracija otopine 2-MNQ. U ispitivanje će biti uključena negativna kontrola (klijanci izloženi deioniziranoj vodi) i pozitivna kontrola (klijanci izloženi otopini CuSO₄). Nakon 3-dnevne izloženosti, pripremiti će se biljni homogenat u kojem će se odrediti sadržaj GSH, antocijanina te MDA spektrofotometrijskim metodama, a dobiveni rezultati će se statistički obraditi. Pokus klijanja biti će proveden prema OECD smjernicama (OECD, 2003).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Za pripremu otopina za tretman sjemenki rotkvice korištene su sljedeće kemikalije:

- 2-MNQ (Sigma Chemical Co, St. Louis, SAD),
- metanol (Lach-Ner, Neratovice, Češka),
- bakrov (II) sulfat, CuSO_4 (Kemika, Zagreb, Hrvatska).

Za pripremu homogenata biljnog tkiva korištena je:

- trikloroocena kiselina, TCA (Kemika, Zagreb, Hrvatska)

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

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

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

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

Za određivanje sadržaja MDA u homogenatu biljnog tkiva korištena je:

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

Sve upotrijebljene kemikalije bile su *pro analysi* čistoće.

3.1.2. Oprema

U ispitivanju je korištena sljedeća oprema:

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

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

3.1.3. Biljni model

Za potrebe ovog istraživanja kao modelni organizam odabrana je obična rotkvica, *Raphanus sativus* L. (slika 7). Ova jednogodišnja korijenasta biljka iz porodice krstašica (Brassicaceae) obiluje sekundarnim metabolitima poput polifenola, flavonoida i glukozinolata te se konzumira u prehrambene i ljekovite svrhe (Beevi i sur., 2012; Gibum i sur., 2015). Zbog kratkog vremena klijanja i otpornosti na vanjske uvjete u ovome istraživanju korištena je kao model za ispitivanje bioloških učinaka 2-MNQ. Sjeme rotkvice nabavljeno je komercijalno.



Slika 7: Klijanac rotkvice (*Raphanus sativus* L.) (slikala Ana Fajdetić)

3.2. Metode

3.2.1. Biološki pokus – germinacija

3.2.1.1. Priprema otopina za pokus germinacije

Priprema otopina 2-MNQ

Matična otopina 2-MNQ koncentracije 2 mg/mL pripremljena je u metanolu tako što se 20 mg 2-MNQ izvagalo na analitičkoj vagi te se kvantitativno prenijelo u odmjernu tikvicu od 10 mL. U odmjernu tikvicu dodao se metanol, a 2-MNQ se otopio u metanolu miješanjem. Potom je odmjerna tikvica nadopunjena s metanolom do oznake.

Radne otopine 2-MNQ u koncentracijskom rasponu 1-30 µg/mL pripremile su se razrjeđivanjem matične otopine 2 mg/mL s metanolom. Za izračun korištena je formula:

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

U tablici 1 prikazani su potrebni volumeni matične otopine 2-MNQ koncentracije 2 mg/mL za pripremu radnih otopina 2-MNQ.

Tablica 1: Priprema radnih otopina 2-MNQ u koncentracijskom rasponu 1-30 $\mu\text{g/mL}$

Konc. radne otopine 2-MNQ	Volumen matične otopine 2-MNQ konc. 2 mg/mL	Volumen dodanog metanola (mL)
1 $\mu\text{g/mL}$	0,01	19,99
5 $\mu\text{g/mL}$	0,05	19,95
10 $\mu\text{g/mL}$	0,1	19,90
20 $\mu\text{g/mL}$	0,2	19,80
30 $\mu\text{g/mL}$	0,3	19,70

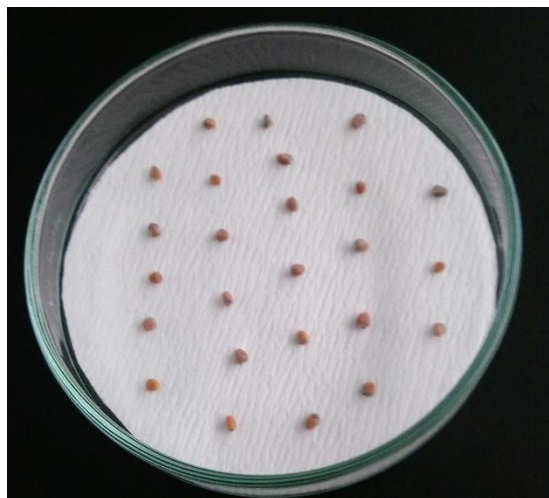
Priprema 0,02 M otopine CuSO_4

0,02 M otopina CuSO_4 pripremljena je vaganjem 0,16 g CuSO_4 koji je nakon toga kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 50 mL. Potom je u odmjernu tikvicu dodana destilirana voda te je CuSO_4 otopljen mućkanjem. Odmjerna tikvica nadopunjena je do oznake destiliranom vodom.

3.2.1.2. Pokus germinacije (klijavosti)

Pokus klijavosti proveden je prema smjernicama OECD (OECD, 2003). Za pokus klijavosti korištene su Petrijeve zdjelice koje su prvo prebrisane etanolom te je u njih, kao podloga za sjemenke, stavljen filter papir. Petrijeve zdjelice s filter papirom stavljene su u inkubator pod UV lampu 20-tak minuta kako bi se filter papir i Petrijeve zdjelice sterilizirali te tako spriječila kontaminacija sjemenki rotkvice za vrijeme trajanja pokusa klijavosti. Potom se filter papir impregnirao s 1 mL pojedine radne otopine 2-MNQ u koncentracijama 1, 5, 10, 20 i 30 $\mu\text{g/mL}$. Svaka od ispitivanih koncentracija napravljena je u triplicatu, odnosno za svaku koncentraciju pripremljene su po tri Petrijeve zdjelice. Impregnacija je provedena tako što se filter papir natopio radnom otopinom 2-MNQ određene koncentracije, a potom su Petrijeve zdjelice ostavljene oko 1 sat u sterilnom inkubatoru kako bi se filter papir posušio. Također, filter papir u tri Petrijeve zdjelice impregniran je s 1 mL 0,02 M otopine CuSO_4 koja je služila kao pozitivna kontrola. Na tako impregniran filter papir su potom postavljene sjemenke rotkvice. Svaka Petrijeva zdjelica sadržavala je po 25 sjemenki rotkvice ravnomjerno postavljenih za klijanje (slika 8). U sve je Petrijeve zdjelice dodano po 2 mL deionizirane vode kako bi se omogućili uvjeti za razvoj klijanaca te su zatvorene parafilmom. U pokus je

uključena negativna kontrola (u triplikatu) kod koje su sjemenke modelne biljke bile izložene 2 mL deionizirane vode. Tako pripremljene Petrijeve zdjelice ostavljene su tri dana na tamnom mjestu na sobnoj temperaturi na klijanju.



Slika 8: Sjemenke rotkvice postavljene na klijanje u Petrijevoj zdjelici (slikala Ana Fajdetić)

Nakon 3-dnevnog klijanja, klijanci su pažljivo preneseni s filter papira te je odvagana masa svježeg tkiva. Potom su klijanci premješteni u označene vrećice i pohranjeni na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do biokemijskih analiza.

3.2.1.3. Priprema homogenata biljnog tkiva za mjerenje biokemijskih parametara

Priprema 5 %-tne otopine TCA

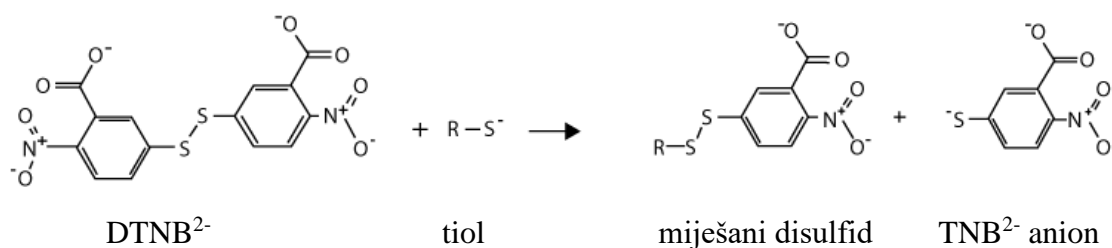
10 g TCA se odvagalo na analitičkoj vagi te se kvantitativno prenijelo u odmjernu tikvicu od 200 mL. U tikvicu je dodana destilirana voda te je nakon otapanja TCA tikvica nadopunjena destiliranom vodom do oznake.

Homogenat klijanaca rotkvice pripremio se vaganjem 100 mg biljnog tkiva koje se mehanički homogenizirao u tarioniku korištenjem tučka uz dodatak 0,5 mL 5 %-tne otopine TCA. Pripremljeni homogenat biljnog tkiva rotkvice potom je centrifugiran (10 minuta na 7000 RPM) kako bi se dobio bistar supernatant, a koji se koristio za određivanje sadržaj biokemijskih parametara oksidacijskog stresa (GSH, antocijanina i MDA).

3.2.2. Određivanje sadržaja GSH

3.2.2.1. Princip metode određivanja sadržaja GSH

Za određivanje sadržaja GSH koristila se kolorimetrijska metoda u kojoj dolazi do reakcije između tiolne skupine GSH i DTNB-a (poznat kao i Ellmanov reagens). U toj reakciji dolazi do nastanka miješanog disulfida i žuto obojene 2-nitro-5-tiobenzojeve kiseline (TNB) (Ellman, 1959). U blago alkalnim uvjetima TNB prelazi u TNB^{2-} anion čija se koncentracija može spektrofotometrijski pratiti kao intenzitet obojenja žuto nastalog produkta pri valnoj duljini od 412 nm na kojoj postiže apsorpcijski maksimum (slika 9). Koristeći slijepu probu i poznavajući apsorpcijski koeficijent sadržaj GSH se može kvantificirati.



Slika 9: Reakcija slobodne tiolne skupine proteina i DTNB-a te stvaranje miješanog disulfida i žuto obojenog produkta TNB-a (preuzeto s url: <https://www.bmglabtech.com/fr/ellmans-assay-for-in-solution-quantification-of-sulfhydryl-groups/> i prilagođeno)

3.2.2.2 Priprema otopina za određivanje sadržaja GSH

Priprema 1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7,4

1 M kalij-fosfatni pufer pripremio se iz KH_2PO_4 i K_2HPO_4 . Za pripremu 1 M otopine KH_2PO_4 , na analitičkoj vagi se izvagalo 13,609 g KH_2PO_4 te kvantitativno prenijelo u odmjernu tikvicu od 100 mL, otopilo u destiliranoj vodi te se tikvica nadopunila destiliranom vodom do oznake. Za pripremu 1 M otopine K_2HPO_4 , izvagalo se 17,418 g K_2HPO_4 te prenijelo u odmjernu tikvicu od 100 mL i otopilo u destiliranoj vodi. 1 M otopina kalij-fosfatnog pufera pH 7,4 dobivena je miješanjem 1 M otopine KH_2PO_4 i K_2HPO_4 koristeći pH metar kako bi se dobio potrební pH 7,4. U otopinu je dodano i 0,0037 g EDTA kako bi se postigao molaritet EDTA u otopini od 0,1 mM. Naime, EDTA kelira metale što sprječava autooksidaciju GSH u uzorku. Odvaga EDTA prebačena je u 100 mL otopine 1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7,4. 1 M kalij-fosfatni pufer služio je kao otapalo i medij za izvođenje pokusa.

Priprema 1 mM otopine DTNB-a

Za pripremu 1 mM otopine DTNB-a, trebalo bi se izvagati 0,00396 g DTNB-a. Kako bi se povećala preciznosti odvage, prvo se pripremila 10 mM otopina DTNB-a vaganjem 0,0396 g DTNB-a. Izvagana masa kvantitativno se prenijela u odmjernu tikvicu od 10 mL te se otopila u 1 M kalij-fosfatnom puferu pH 7,4. Potom je odmjerna tikvica nadopunjena s 1 M kalij-fosfatnim puferom pH 7,4 do oznake. Pripremljena otopina razrijedila se 10 puta kako bi se dobila 1 mM otopina DTNB-a, koja služi kao reagens za dokazivanje GSH.

3.2.2.3. Postupak određivanja sadržaja GSH

Sadržaj GSH odredio se u supernatantu homogeniziranog biljnog tkiva koji je dobiven centrifugiranjem homogenata 10 minuta na 7000 RPM. U epruvete je potom dodano 100 μ L supernatanta homogenata biljnog tkiva i 900 μ L 1 mM otopine DTNB-a te se epruveta pomiješala. Tako pripremljeni uzorci inkubirali su se 15 minuta na sobnoj temperaturi kao i slijepa proba koja se sastojala od 100 μ L TCA i 900 μ L 1 mM otopine DTNB-a. Nakon inkubacije uzorci su se prebacili u kivetu te im je na valnoj duljini od 412 nm izmjerena apsorbancija na UV-VIS spektrofotometru. Sadržaj GSH u uzorku izračunao se iz Beer-Lambertove formule:

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

$$\text{Sadržaj GSH} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times l}$$

pri čemu je:

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

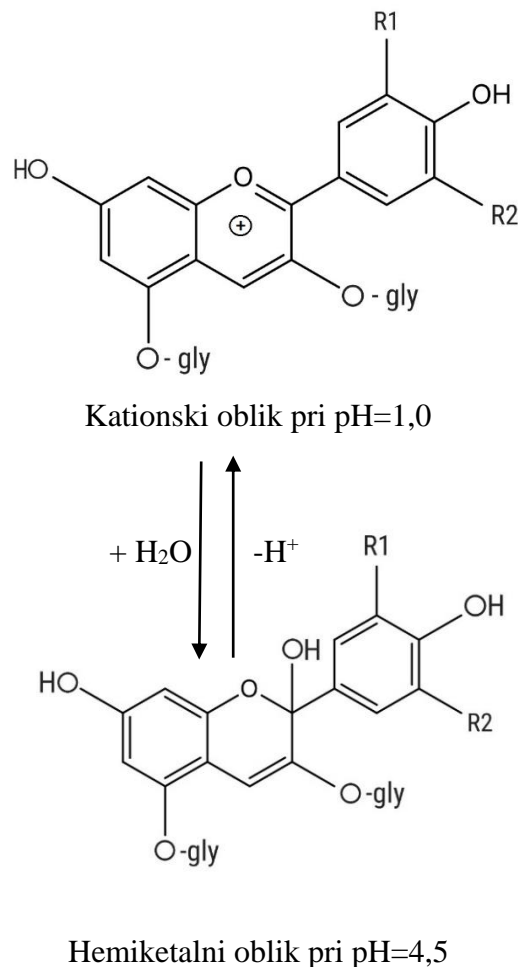
ε – apsorpcijski koeficijent (14,15 1/mM cm)

l – dužina optičkog puta (1 cm).

3.2.3. Određivanje saržaja antocijanina

3.2.3.1. Princip metode određivanja sadržaja antocijanina

Za određivanje ukupnog sadržaja monomernih antocijanina koristila se pH diferencijalna metoda koja se temelji na reverzibilnoj strukturnoj promjeni antocijanina unutar različitog pH medija (Giusti i Wrolstad, 2001). Crveni kationski oblik prisutan je pri pH = 1,0, a bezbojni hemiketalni oblik pri pH = 4,5 (slika 10). Iz toga proizlazi preko Beer-Lamberotva zakona da je razlika između apsorbancija pigmenta pri pH = 1,0 i pH = 4,5 proporcionalna koncentraciji pigmenta. Apsorbancija se mjeri na valnoj duljini od 516 nm i zbog korekcije zamućenja na 700 nm. Za razliku od monomernih antocijanina koji slabo apsorbiraju zračenje pri pH = 4,5, degradirani polimerizirani oblici antocijanina otporni su na promjenu boje uslijed promjene pH, stoga se oni ne mogu mjeriti ovom metodom jer oni apsorbiraju zračenje u oba pH medija. No bez obzira na prisutnost degradiranih polimeriziranih oblika antocijanina, ova metoda je pouzdana za određivanje sadržaja ukupnih antocijanina (Giusti i Wrolstad, 2001).



Slika 10: Kationski i hemiketalni oblik antocijanina pri različitim pH

3.2.3.2. Postupak određivanja sadržaja antocijanina

Uzorci homogenata biljnoga tkiva prvo su centrifugirani (10 minuta na 7000 RPM), a potom su supernatanti (20 μ L) prebačeni u mikrotitarske pločice. Uzorci su pripremljeni u dvije serije, što znači da se u jednu seriju supernatanta dodaje 80 μ L pufer otopine pH = 1,0, a u drugu seriju supernatanta 80 μ L otopine pufera pH = 4,5. Nakon dodatka otopine pufera odgovarajućeg pH, uzorci se inkubiraju 15 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon toga mjere se apsorbancije za obje serije uzoraka na 492 nm, 540 nm i 690 nm. Apsorbancije bi se trebale izmjeriti na valnim duljinama od 516 nm i zbog korekcije zamućenja na 700 nm. Obzirom da je u ovome istraživanju apsorbancija uzoraka mjerena na čitaču mikrotitarskih pločica (engl., *Plate Reader*) koji ne može mjeriti apsorbanciju na potrebnim valnim duljinama, izmjerene su apsorbancije na valnim duljinama od 492 nm, 540 nm i 690 nm. Iz izmjerenih apsorbancija na valnim duljinama 492 nm i 540 nm iznos apsorbancije na 516 nm je aproksimiran prema formuli:

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

Sadržaj antocijanina izražen je prema formuli:

$$\text{Sadržaj antocijanina} = \frac{A \times Mr \times FR \times 1000}{\varepsilon \times l}$$

gdje je:

A – apsorbancija uzorka koja se računa prema izrazu:

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

Mr – molekulska masa = 449,2

FR – faktor razrjeđenja

1000 – faktor za preračunavanje g u mg

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

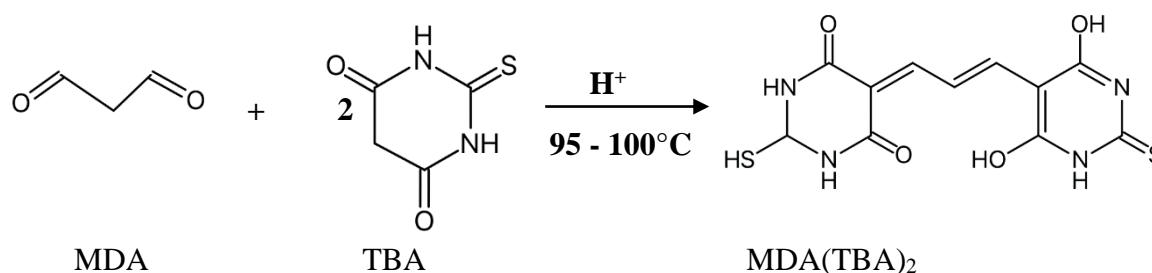
l – dužina optičkog puta (1 cm).

Podatci za vrijednost molekulske mase (Mr = 449,2) i ekstinkcijski koeficijent (26,9 1/mM cm) uzeti su za standarda cijanidin-3-glukozida jer je on najzastupljenija vrsta antocijanina.

3.2.4 Određivanja sadržaja MDA

3.2.4.1. Princip metode određivanja sadržaja MDA

Metoda određivanja sadržaja MDA u uzorku temelji se na reakciji između elektrofilne molekule MDA koja pri niskom pH i povišenoj temperaturi stupa u reakciju s nukleofilnom TBA pri čemu nastaje crveno obojeni adukt $\text{MDA}(\text{TBA})_2$ (slika 11) (Heath i Packer, 1968). Intenzitet obojenja nastalog kompleksa mjeri se spektrofotometrijski na valnoj duljini od 532 nm s obzirom da na toj valnoj duljini postiže maksimum apsorpcije.



Slika 11: Prikaz reakcije MDA i TBA i stvaranje crveno obojenog $\text{MDA}(\text{TBA})_2$ adukta

3.2.4.2. Priprema otopina za određivanje MDA

Priprema otopine TBA

Na analitičkoj vagi je izvagano 0,6 g TBA koja se kvantitativno prenijela u odmjernu tikvicu od 100 mL. Nakon otapanja TBA, tikvica se nadopunila destiliranom vodom do oznake. Otapanje MDA može se potaknuti zagrijavanjem na grijaćoj ploči. Otopina MDA služi kao reagens za određivanje sadržaja MDA.

3.2.4.3. Postupak određivanja sadržaja MDA

Homogenati biljnoga tkiva centrifugirani su (10 minuta na 7000 RPM) te je 200 μL supernatanta prebačeno u epruvete. Potom je na supernatant dodano 800 μL 0,6 % otopine TBA. Tako pripremljeni uzorci i sijepa proba koja je sadržavala 200 μL destilirane vode i 800 μL 0,6 % otopine TBA stavili su se zagrijavati 30 minuta na temperaturu od 90°C . Nakon 30 minuta reakcijska smjesa se ohladila na ledu kako bi se reakcija zaustavila. Potom se uzorci još jednom centrifugiraju 10 minuta na 7000 RPM kako bi se uklonilo moguće zamućenje i

smanjila mogućnost interferencija. Apsorbancija se mjeri na UV-VIS spektrofotometru na 532 nm te se iz formule za Beer-Lambertov zakon može odrediti sadržaj MDA:

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

$$\text{Sadržaj MDA} = \frac{\Delta A}{\varepsilon \times l}$$

gdje je:

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

ε – apsorpcijski koeficijent (155 l/mM cm)

l – dužina optičkog puta (1 cm).

3.3. Statistička obrada rezultata

S obzirom da je modelni organizam, rotkvica, tretiran u triplikatu rezultati mase svježeg tkiva prikazani su kao srednje vrijednosti triplikata \pm standardna devijacija za svaki od tretmana. Biokemijski parametri: GSH, antocijanini i MDA izmjereni su za svaki od triplikata u duplikatu te su prikazani kao srednje vrijednosti šest replika \pm standardna devijacija. Korištenjem t-testa pomoću računalnog programa Excel uspoređeni su dobiveni rezultati između tretmana s deioniziranom vodom (negativna kontrola) i tretmana ili s 2-MNQ ili s CuSO_4 za masu svježeg tkiva i pojedinih biokemijskih parametara. Kao statistički značajna razlika postavljena je vrijednost $P \leq 0,05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

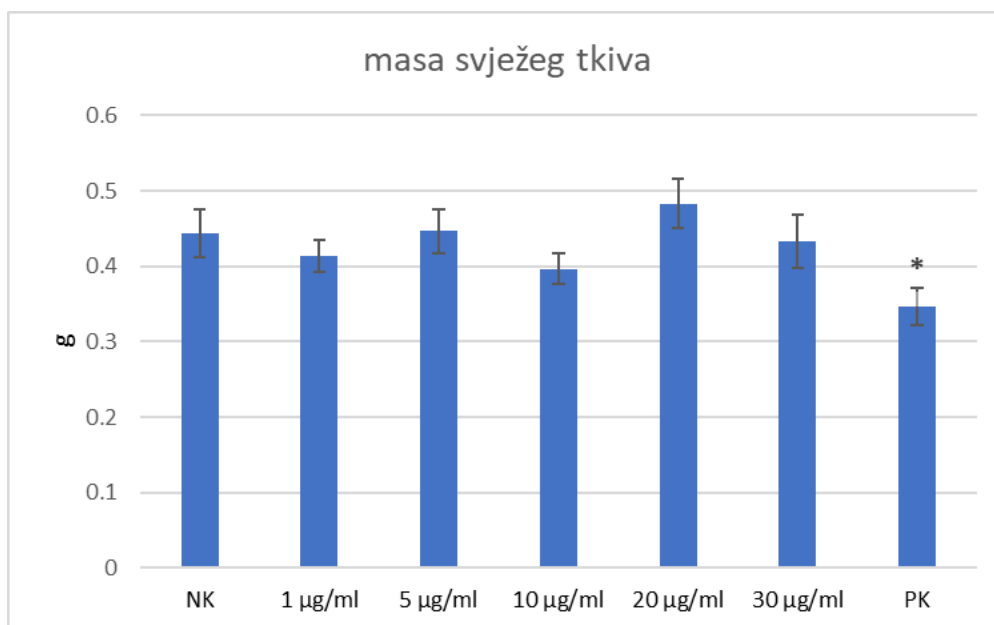
Dosadašnja istraživanja pokazala su da NQ i njihovi derivati imaju obećavajuća antimikrobna i antikancerogena svojstva te su otvorili put za razvoj novih terapeutika. Prilikom ispitivanja spoja kao potencijalnog lijeka valja ispitati njegov učinak na zdravim staničnim kulturama. U ovom diplomskom radu ispitan je učinak 2-MNQ na klijancima rotkvice. Osim iz etičkih razloga i veće dostupnosti, biljka kao modelni organizam također je financijski isplativiji odabir od animalnih ili humanih stanica. Klijanci predstavljaju najosjetljiviji životni stadij biljke (Rouhi i sur., 2012). Stoga bilo kakav učinak na klijancima daje informaciju koja bi se mogla prenijeti na više organizme, odnosno ekstrapolirati na ljudski organizam.

Istraživanje je provedeno tako da su sjemenke rotkvice bile izložene tri dana otopinama 2-MNQ u koncentracijskom rasponu 1-30 $\mu\text{g/mL}$. U ispitivanje je uključena negativna kontrola kod koje su sjemenke rotkvice bile izložene deioniziranoj vodi, a skupinu pozitivne kontrole činile su sjemenke rotkvice izložene 0,02 M otopini CuSO_4 . Iako su biljkama potrebni metali u različitim fiziološkim procesima pa tako i bakar, bakar u visokim koncentracijama uzrokuje oksidacijski stres i ometa rast i razvoj klice (Zeng i sur., 2021). Stoga je u ovom istraživanju korištena otopina bakra kao pozitivna kontrola. Nakon 3-dnevnog klijanja izvagana je masa svježeg tkiva klijanaca te je sadržaj parametara oksidacijskog stresa izmjeren u homogenatu biljnog tkiva. Prema Ellmanovoj metodi (1959) određen je sadržaj GSH, sadržaj antocijanini je izmjeren pH diferencijalnom metodom prema Giusti i Wrolstadu (2001), a sadržaj MDA tiobarbiturnim testom prema Heathu i Packeru (1968). Pokus klijanja proveden je u triplicatu, a mjerenja parametara oksidacijskog stresa provedena su u duplikatu te su rezultati statistički obrađeni.

4.1. Masa svježeg tkiva

Nakon 3-dnevnog klijanja klijancima rotkvice izvagana je masa. Masa svježeg tkiva može se uzeti kao parametar fitotoksičnog utjecaja 2-MNQ na klijance rotkvice obzirom da je masa u izravnom odnosu s rastom klijanaca. Na slici 12 grafički su prikazane mase svježeg tkiva klijanaca rotkvice. Iz prikaza je vidljivo kako su prosječne mase svježeg tkiva klijanaca koji su bili izloženi različitim koncentracijama 2-MNQ približno jednake te se nisu značajnije razlikovale od negativne kontrole. Tako je masa klijanaca nakon 3-dnevne izloženosti najnižoj koncentraciji 2-MNQ (1 $\mu\text{g/mL}$) iznosila $0,413 \pm 0,020$ g, što je približno isto masi klijanaca izloženih destiliranoj vodi (negativna kontrola) $0,443 \pm 0,032$ g. Također, masa svježeg tkiva klijanaca nakon izloženosti najvišoj koncentraciji 2-MNQ (30 $\mu\text{g/mL}$) bila je $0,433 \pm 0,035$ g

te se nije razlikovala od negativne kontrole. Nakon 3-dnevnog klijanja jedino je masa klijanaca izloženih 0,02 M otopini CuSO_4 (pozitivna kontrola) bila značajno niža u odnosu na negativnu kontrolu te je iznosila $0,346 \pm 0,025$ g ($P < 0,05$). To se može objasniti utjecajem bakra kao teškog metala na rast i razvoj klica. Izloženost klijanaca 2-MNQ u rasponu koncentracija 1-30 $\mu\text{g/mL}$ kroz tri dana nije imala značajan učinak na masu klijanaca rotkvice što znači da u testiranom koncentracijskom rasponu 2-MNQ nema fitotoksičan učinak. U prethodnom istraživanju u kojem je istraživani učinak 2-MNQ u istom koncentracijskom rasponu (1-30 $\mu\text{g/mL}$) na gorušicu (*Sinapis alba* L.) pokazano je da 2-MNQ već u koncentraciji od 10 $\mu\text{g/mL}$ dovodi do značajnog sniženja mase svježega tkiva, odnosno ima fitotoksičan učinak (Kenfelj, 2022). To pokazuje da je rotkvice puno otpornija na djelovanje 2-MNQ u odnosu na gorušicu, što se može objasniti prisustvom većeg broja fitokemikalija s antioksidacijskim svojstvom (Gibum i sur., 2015). U preglednom radu Gamba i suradnici (2021) iznijeli su podatke o sastavu različitih dijelova vrste *R. sativus* te se pokazalo da klijanci i listovi obiluju bioaktivnim kemikalijama među kojima prednjače flavonoidi i neflavonoidni polifenoli koji bi također mogli pridonijeti obrambenom sustavu ove krstašice.

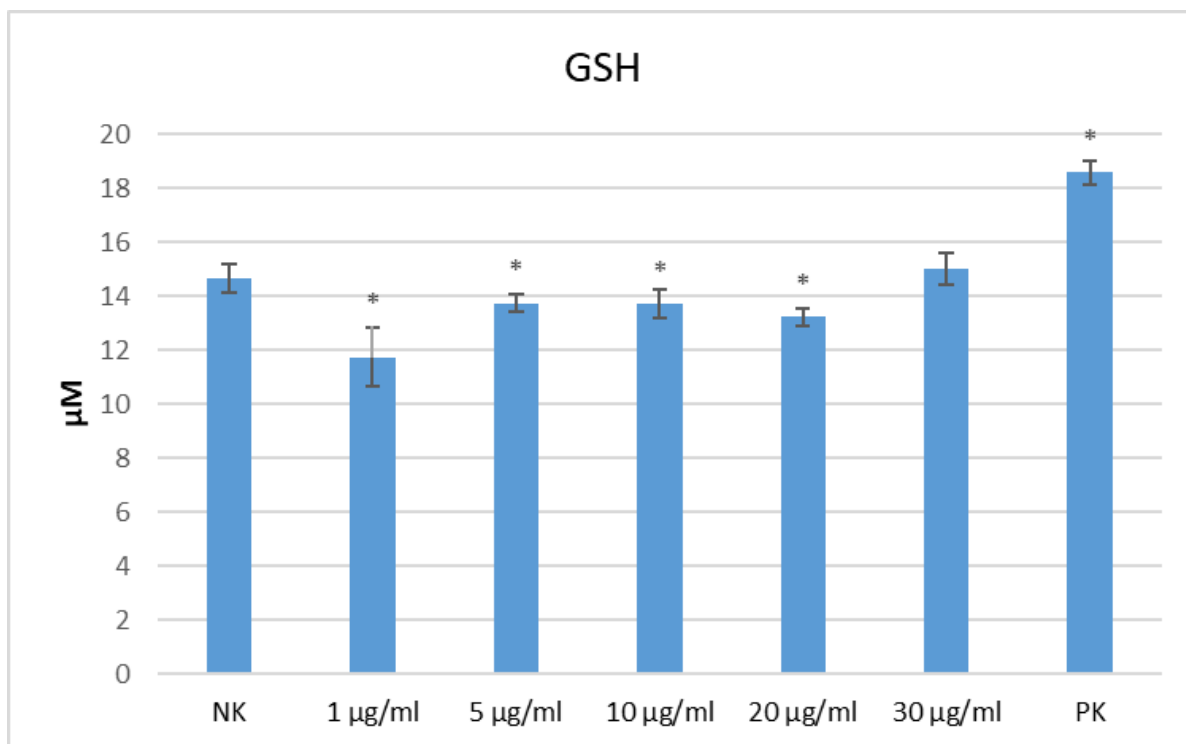


Slika 12: Masa svježeg tkiva klijanaca rotkvice nakon 3-dnevne izloženosti 2-MNQ u koncentracijama 1- 30 $\mu\text{g/mL}$; NK – negativna kontrola (deionizirana voda); PK – pozitivna kontrola (otopina CuSO_4); *statistički značajna razlika u odnosu na NK

4.2. GSH

Rezultati sadržaja GSH prikazani su na slici 13. Sadržaj GSH negativne kontrole (tretman s destiliranom vodom) bio je $14,664 \pm 0,527 \mu\text{M}$. U usporedbi s negativnom kontrolom, kod pozitivne kontrole uočava se rast sadržaja GSH ($18,587 \pm 0,418 \mu\text{M}$; $P < 0,05$). Taj rezultat ne čudi s obzirom da bakar u višim koncentracijama kao teški metal uzrokuje oksidacijski stres i odgovor organizma u vidu aktivacije i produkcije antioksidansa (Drazkiewicz i sur., 2003).

Iako 2-MNQ u ispitivanim koncentracijama nije imao izrazito fitotoksičan učinak (te nije došlo do snižavanja mase svježega tkiva) imao je učinak na sadržaj GSH u klijanaca. U klijanaca rotkvice izloženih tri dana otopini 2-MNQ u koncentraciji od $1 \mu\text{g/mL}$ primijećen je značajan pad sadržaja GSH u odnosu na negativnu kontrolu ($11,755 \pm 1,107 \mu\text{M}$; $P < 0,05$). Klijaneci rotkvice izloženi tri dana višim koncentracijama 2-MNQ ($5, 10$ i $20 \mu\text{g/mL}$) u usporedbi s negativnom kontrolom također su imali niži sadržaj GSH u odnosu na negativnu kontrolu ($P < 0,05$). Jedino je 3-dnevna izloženosti 2-MNQ u koncentraciji od $30 \mu\text{g/mL}$ dovela do neznatnog povećanja sadržaja GSH te je iznosio $15,017 \pm 0,579 \mu\text{M}$, što se nije značajnije razlikovalo od negativne kontrole. Navedeni rezultati naznačuju da se pri nižim koncentracijama 2-MNQ ($1 - 20 \mu\text{g/mL}$) u rotkvici troše zalihe GSH kao antioksidansa te zbog toga sadržaj GSH opada. To se može objasniti kemijskom strukturom NQ i njoj pripadajućim funkcionalnim skupinama. Poznato je da GSH može stvarati adukte s oksidiranim kinonima i na taj način umanjiti utjecaj oksidacijskog stresa, a time i oštećenje makromolekula (Klotz i sur., 2014). Povećanjem koncentracije 2-MNQ dolazi do porasta sadržaja GSH što bi se dalo objasniti sintezom novoga GSH u obrambene svrhe. Pri najvišoj koncentraciji 2-MNQ od $30 \mu\text{g/mL}$ uočen je blagi porast sadržaja GSH u odnosu na negativnu kontrolu što bi dalo naslutiti adaptaciju biljke na stresne uvjete, no za slične zaključke potrebno je provesti daljnje eksperimente. U ovome istraživanju, iako 2-MNQ u ispitivanom koncentracijskom rasponu nije bio fitotoksičan, došlo je do snižavanja sadržaja GSH što znači da 2-MNQ ima pro-oksidativan učinak na stanicu te se GSH „trošio“ na njegovu neutralizaciju. Izgleda da stanice klijanaca rotkvice uz GSH imaju uspješan antioksidacijski sustav koji je neutralizirao djelovanje 2-MNQ. U spomenutom istraživanju na gorušici pad sadržaja GSH zabilježen je nakon 3-dnevne izloženosti 2-MNQ u koncentraciji $1 \mu\text{g/mL}$, a porast već nakon izloženosti koncentraciji 2-MNQ od $20 \mu\text{g/mL}$ što je još jedan dokaz veće otpornosti rotkvice na vanjski stres (Kenfelj, 2022).

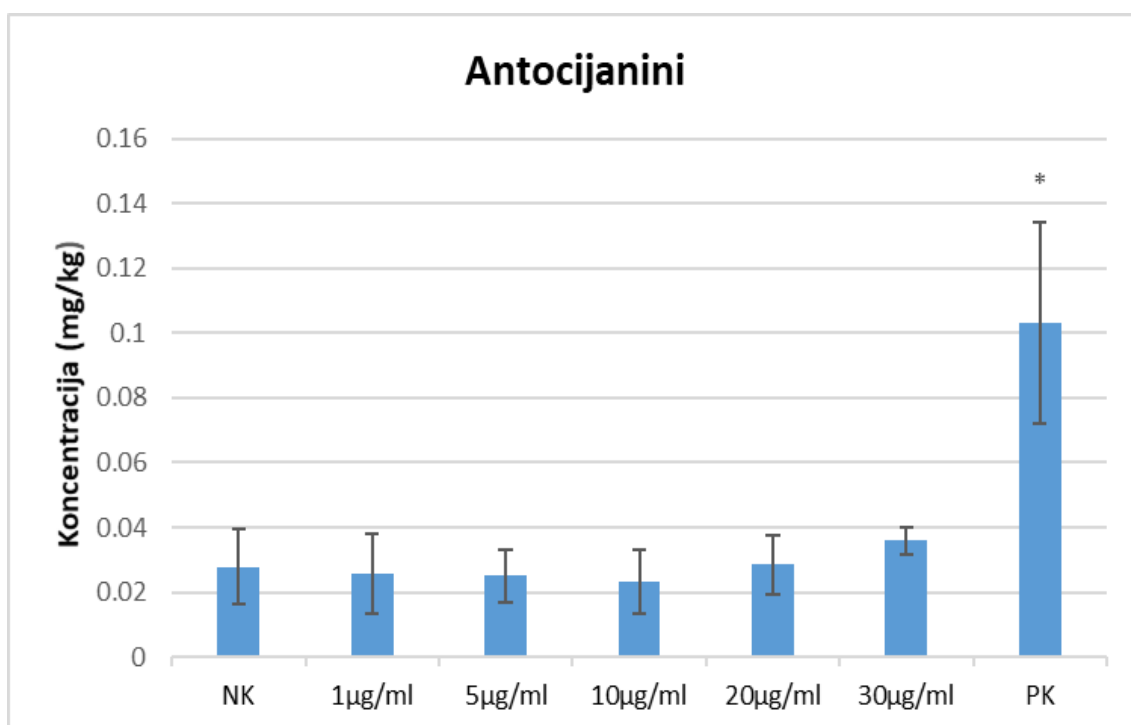


Slika 13: Sadržaj GSH u klijanaca rotkvice nakon 3-dnevne izloženosti 2-MNQ u koncentracijskom rasponu 1-30 µg/mL; NK – negativna kontrola (deionizirana voda); PK – pozitivna kontrola (otopina CuSO₄); *statistički značajna razlika u odnosu na NK

4.3. Antocijanini

Metoda kojom je određen sadržaj antocijanina u ovome istraživanju bila je pH diferencijalna metoda po Giusti i Wrolstadu (2001). Iako ovom metodom nije izmjeren sadržaj ukupnih antocijanina, obzirom da pH diferencijalnom metodom nije moguće izmjeriti degradirane i polimerizirane antocijanine, može se pretpostaviti da izmjeren sadržaj monomernih oblika antocijanina ukazuju na određen stupanj antioksidacijske sposobnosti. Na to ukazuje značajna pozitivna korelacija između izmjerenih monomernih antocijanina i antioksidativne aktivnosti temeljem prethodno provedenih studija (Yang i Zhai, 2010; Siti Azima, 2014). Na slici 14 prikazan je sadržaj antocijanina u rotkvici nakon izloženosti rastućim koncentracijama 2-MNQ te destiliranoj vodi (negativna kontrola) i otopini CuSO₄ (pozitivna kontrola). Zanimljivo je da u usporedbi s negativnom kontrolom ($0,028 \pm 0,012$ mg/kg) statistički značajna promjena u sadržaju antocijanina nije zabilježena niti u jednoj grupi klijanaca izloženih 2-MNQ što bi dalo za pretpostaviti da se biljka uvelike oslanja na neke druge obrambene mehanizme poput potrošnje zaliha GSH. Sadržaj antocijanina bio je značajno viši u odnosu na negativnu kontrolu samo kod pozitivne kontrole (klijanaca rotkvice izloženih

tri dana otopini CuSO_4) te je sadržaj antocijanina bio $0,103 \pm 0,031$ mg/kg ($P < 0,05$). To se može objasniti regulacijom na razini transkripcije i povećanom proizvodnjom antioksidansa prilikom izlaganja stresnim uvjetima kao što je u ovom slučaju prisutnost teških metala (Naing i Kim, 2021). Valja se osvrnuti na velike razlike u standardnim devijacijama što je za biološki pokus očekivano obzirom da su sjemenke različito vijabilne, odnosno da imaju različite sposobnosti preživljavanja i razvijanja. Osim toga antocijanini su podložni degradaciji uslijed različitih vanjskih utjecaja poput temperature, pH medija ili sekundarnih metabolita (Zhao i sur., 2021) pa ne začuđuje da njihov sadržaj u klijancima rotkvice varira.

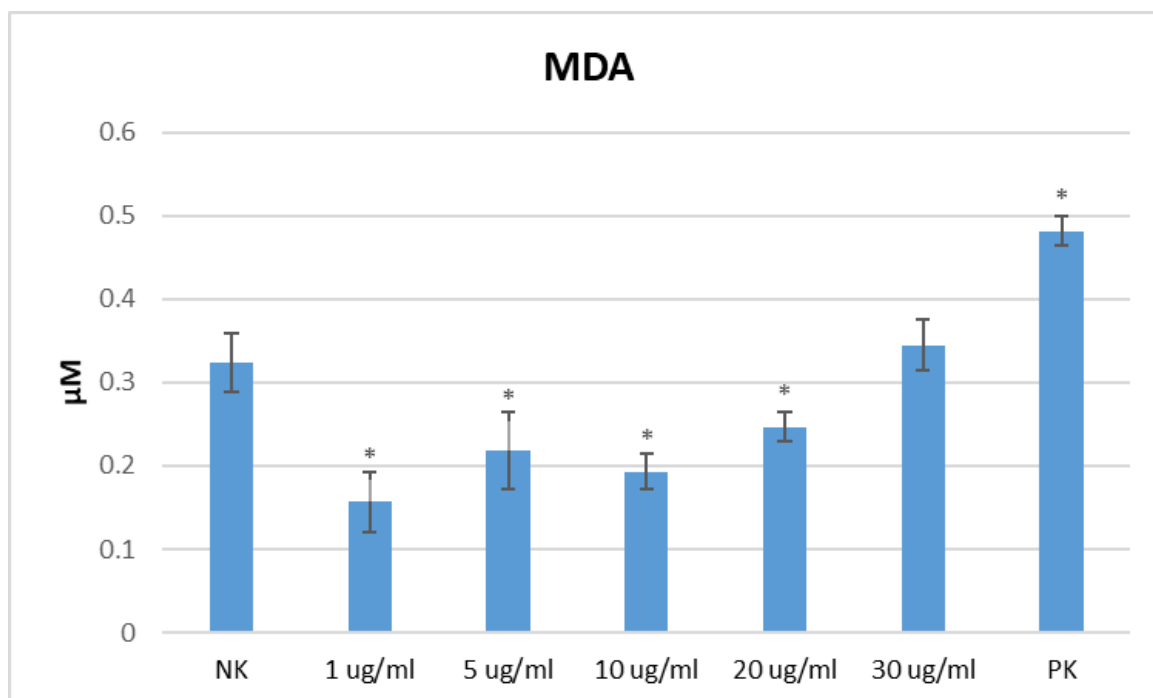


Slika 14: Sadržaj antocijanina u klijanaca rotkvice nakon 3-dnevne izloženosti 2-MNQ u koncentracijskom rasponu 1-30 µg/mL; NK - negativna kontrola (deionizirana voda); PK - pozitivna kontrola (otopina CuSO_4); *statistički značajna razlika u odnosu na NK

4.4. MDA

MDA jedan je od produkata lipidne peroksidacije te se uzima kao pokazatelj oksidacijskog stresa. U reakciji s TBA stvara crveno obojeni kompleks koji se može izmjeriti spektrofotometrijski. Na slici 15 prikazan je izmjeren sadržaj MDA u klijanaca rotkvice

izloženih kroz tri dana rastućim koncentracijama 2-MNQ te pozitivne (klijanci izloženi otopini CuSO_4) i negativne kontrola (klijanci izloženi destiliranoj vodi).



Slika 15: Sadržaj MDA u klijanaca rotkvice nakon 3-dnevne izloženosti 2-MNQ u koncentracijskom rasponu 1-30 $\mu\text{g/mL}$; NK – negativna kontrola (deionizirana voda); PK – pozitivna kontrola (otopina CuSO_4); *statistički značajna razlika u odnosu na NK

Sadržaj MDA u klijanaca rotkvice nakon 3-dnevne izloženosti 0,02 M otopini CuSO_4 (pozitivna kontrola) iznosio je $0,48 \pm 0,02 \mu\text{M}$ što je bilo značajno više u odnosu na negativnu kontrolu ($0,32 \pm 0,04 \mu\text{M}$; $P < 0,05$). U uzorcima izloženima otopini CuSO_4 očekivano je došlo do porasta koncentracije MDA u odnosu na negativnu kontrolu, obzirom na studije koje potkrijepljuju činjenicu da bakar inducira generiranje ROS-ova što dovodi do oštećenja membrana i povećanja sadržaja MDA (Sun i sur., 2010, Lukatkin i sur., 2014; Dutta i sur., 2018).

U klijanaca rotkvice izloženih tri dana 2-MNQ u koncentracijama 1-20 $\mu\text{g/mL}$ primijećen je niži sadržaj MDA u odnosu na negativnu kontrolu. U klijancima izloženima 2-MNQ u koncentraciji 1 $\mu\text{g/mL}$ sadržaj MDA bio je $0,16 \pm 0,04 \mu\text{M}$ što je bilo statistički značajno niže od negativne kontrole ($P < 0,05$). Značajno niži sadržaj MDA u odnosu na

negativno kontrolu zabilježen je i u klijanaca rotkvice izloženih 3 dana 2-MNQ koncentracijama 5, 10 i 20 $\mu\text{g/mL}$. U klijanaca izloženih 3 dana koncentraciji 2-MNQ od 30 $\mu\text{g/mL}$ zabilježen je porast sadržaja MDA ($0,35 \pm 0,03 \mu\text{M}$), no taj porast nije bio značajno viši u usporedbi s negativnom kontrolom. U klijanaca u kojima je zabilježen pad sadržaja MDA istovremeno je zabilježen i pad sadržaja GSH. To se može objasniti obranom organizma od stresa i poticanjem proizvodnje antioksidansa, odnosno potrošnje zaliha GSH u svrhu obrane od ROS-ova pri čemu sadržaj MDA u tom uzorku također opada.

U ovom istraživanju ispitan je učinak 2-MNQ na rast i parametre oksidacijskog stresa rotkvice. 2-MNQ u ispitivanom koncentracijskom rasponu 1-30 $\mu\text{g/mL}$ nije imao fitotoksični učinak, odnosno nije došlo do značajnije promjene u masi svježeg tkiva klijanaca. No, u istom koncentracijskom rasponu 2-MNQ imao je učinak na parametre oksidacijskog stresa. Izloženost 2-MNQ u koncentracijama 1, 5, 10 i 20 $\mu\text{g/mL}$ dovela je do pada sadržaja GSH rotkvice, ali i pada sadržaja MDA. To govori da je 2-MNQ aktivirao antioksidacijsku obranu u modelnom organizmu te da je došlo do sniženja sadržaja GSH koji se „trošio“ na antioksidacijsku obranu što je rezultiralo i nižim sadržajem MDA. Tek je 2-MNQ u koncentraciji 30 $\mu\text{g/mL}$ doveo do blagog porasta sadržaja GSH što ukazuje na sintezu GSH. Ista je koncentracija 2-MNQ (30 $\mu\text{g/mL}$) uzrokovala i blagi porast sadržaja MDA. Može se zaključiti da je 2-MNQ u ispitivanom koncentracijskom rasponu imao pro-oksidativno djelovanje, ali se rotkvice uspješno branila od 2-MNQ. Iako se u ovome istraživanju mjerio i sadržaj antocijanina kako bi se dokazala njihova uključenost u obranu od stresa u rotkvice uzrokovanog s 2-MNQ, to nije dokazano, vjerojatno zbog nemogućnosti mjerenja apsorbancije na točnoj valnoj duljini. Stoga se može zaključiti da 2-MNQ u rotkviči potiče oksidacijski stres, odnosno da je mehanizam djelovanja 2 -MNQ indukcija oksidacijskog stresa. U prethodnom istraživanju koje je ispitalo učinak 2-MNQ u istom koncentracijskom rasponu na gorušici također je pokazano da niže koncentracije 2-MNQ (1 i 5 $\mu\text{g/mL}$) uzrokuju pad sadržaja GSH, a da su više koncentracije (10, 20 i 30 $\mu\text{g/mL}$) uzrokovale porast sadržaja GSH (Kenfelj, 2022). U istom istraživanju sadržaj MDA je bio niži tek nakon 3-dnevnog tretmana s 2-MNQ u koncentracijama 10, 20 i 30 $\mu\text{g/mL}$. Navedeno se očituje u pretpostavci da rotkvice u odnosu na gorušicu ima snažniji obrambeni mehanizam tj. da pokazuje veću otpornost pri izloženosti istim koncentracijama otopine 2-MNQ.

U radu Wanga i suradnika (2011) određivana je najniža koncentracija 2 -MNQ kojom se može spriječiti rast *H. pylori*. U rasponu koncentracija od 0,156-0,625 $\mu\text{g/mL}$ 2-MNQ je pokazao značajnu antibakterijsku i baktericidnu aktivnost protiv različitih sojeva *H. pylori*. Za isti soj *H. pylori* pozitivna kontrola (amoksicilin) imala je MIC 2,5 $\mu\text{g/mL}$ dok je 2-MNQ imao

MIC od 0,625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ što iznosi 25 % MIC-a pozitivne kontrole. Također, 2-MNQ bio je bolji i od metronidazola i to za 1,22 % MIC-a. Dobra antibakterijska aktivnost 2-MNQ u koncentracijskom rasponu 0,156-0,625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dokazana u navedenom istraživanju može se usporediti s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju. U ovome istraživanju na klijancima rotkvice korištene su puno više koncentracije 2-MNQ (1-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) koje nisu imale značajni fitotoksični učinak na rotkvicu i tek je kod koncentracije 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zabilježen porast MDA. Stoga se može zaključiti da bi se ispitivane koncentracije 2-MNQ korištene u antimikrobnom ispitivanju protiv rezistentnih sojeva *H. pylori* (0,156-0,625 $\mu\text{g}/\text{mL}$) mogle koristiti kao alternativna terapija te da ne bi dovele do značajnijih oštećenja zdravih stanica. Ovaj zaključak treba uzeti s rezervom s obzirom da se radi o biljnome modelu, stoga ovakvo razmatranje služi samo kao pretpostavka u okviru istraživanja novih lijekova.

2-MNQ također je bio predmet istraživanja na području antimetastatskih lijekova. Liew i suradnici (2014) proveli su ispitivanje utjecaja 2-MNQ na migraciju humanih stanica metastatskog karcinoma dojke (MDA-MB-231) te utjecaj ovog NQ na ekspresiju enzima matriksne metaloproteinaze 9 (MMP-9). Za razliku od MMP-2 koji je obično konstitutivno eksprimiran, ekspresiju MMP-9 često induciraju različiti faktori rasta, citokini i stimulatorni signali koje proizvode stanice karcinoma (Yan i sur., 2007). Stoga bi regulacija ekspresije MMP-9 bila opravdan pristup u razvoju antimetastatskih lijekova. U istraživanju su se koristile koncentracije 2-MNQ od 2,5-7,5 μM . Rezultati istraživanja su pokazali da IC_{20} vrijednost, odnosno vrijednost koncentracije 2-MNQ koja inhibira vijabilnost 20 % MDA-MB-231 stanica iznosi 7,5 μM . Također je ta koncentracija pokazala 59 % inhibicije staničnog prodiranja koje je ispitano na membrani obloženoj Matrigelom koja predstavlja *in vitro* model bazalne membrane. U usporedbi s netretiranim stanicama, sposobnost stanica da se pokreću i prekriju brazgotinu stanica koja predstavlja ranu u *in vitro* uvjetima bila je smanjena za 46 % pri koncentraciji od 7,5 μM 2-MNQ. Koncentracija 2-MNQ od 7,5 μM reducirala je proteolitičku aktivnost enzima MMP-9 za 70 % u odnosu na netretiranu kontrolu. To istraživanje pokazuje efikasnost 2-MNQ u sprečavanju migracije MDA-MB-231 stanica, stanica karcinoma dojke već pri koncentraciji 7,5 μM . Usporedi li se koncentracija od 7,5 μM 2-MNQ s koncentracijama ispitivanim u ovome istraživanju provedenom na klijancima rotkvice može se uočiti velika razlika u koncentracijama. Naime, 7,5 μM 2-MNQ je 1,416 $\mu\text{g}/\text{mL}$ što je oko najniže koncentracije ispitivane u ovom istraživanju. Stoga bi se moglo pretpostaviti da 2-MNQ u koncentraciji od 7,5 μM (koja ima antimetastatski učinak na stanice karcinoma dojke) nema štetan učinak na zdrave stanice. Jasno je da bi se za donošenje stvarnih zaključaka trebalo

provesti istraživanje na zdravim animalnim stanicama kako bi se sa sigurnošću utvrdio učinak 2-MNQ na zdravim stanicama.

Navedeni primjeri samo su neki od brojnih studija koje istražuju biološka svojstva 2-MNQ. Svakako bi, osim ispitivanja primjerice njegovog antibakterijskog učinka ili antimetastatskog trebalo utvrditi učinak 2-MNQ na zdravim stanicama.

5. ZAKLJUČCI

Nakon provedenog istraživanja utjecaja 2-MNQ na parametre oksidacijskog stresa u klijanaca rotkvice može se zaključiti da ovaj spoj u koncentracijskom rasponu u kojem je ispitivan nema značajan fitotoksičan učinak što se može objasniti dobrim antioksidacijskim sustavom klijanaca rotkvice. U klijanaca rotkvice izloženih različitim koncentracijama 2-MNQ došlo je do značajnih promjena koncentracija GSH i MDA u odnosu na negativnu kontrolu. S time da su se pri nižim koncentracijama 2-MNQ zalihe GSH trošile, a pri višim koncentracijama došlo je do porasta, odnosno proizvodnje GSH za potrebe obrane od oksidacijskog stresa. Dokaz učinkovite obrane modelnog organizma od ROS-ova je pad sadržaja MDA u klijanaca izloženih 2-MNQ. Stoga se može zaključiti da je jedan od mehanizama djelovanja 2-MNQ izazivanje oksidacijskog staničnog stresa.

6. POPIS KRATICA, OZNAKA I SIMBOLA

1,4-NQ – 1,4-naftokinon

2-MNQ – 2-metoksi-1,4-naftokinon

DTNB – Ellmanov reagens; 5,5'-ditiol-2-nitrobenzojeva kiselina

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

GR – Glutation reduktaza

GSH – reducirani oblik glutaciona

GSSG - oksidirani oblik glutaciona

IC₂₀ - petina maksimalne inhibicijske koncentracije

MDA – malondialdehid

MDA-MB-231 – linija humanih stanica karcinoma dojke

MIC – minimalna inhibitorna koncentracija

MMP – matriksna metaloproteinaza

NQ – naftokinon

OEC – olfactory eyesheating cells

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

- Beevi SS, Mangamoori LN, Gowda BB. Polyphenolics profile and antioxidant properties of *Raphanus sativus* L. *Natural Product Research*, 2012, 26(6), 557–563.
- Binder RG, Benson ME, Flath RA. Eight 1,4-naphthoquinones from Juglans. *Phytochemistry*, 1989, 28(10), 2799–2801.
- Campora M, Canale C, Gatta E, Tasso B, Laurini E, Relini A, Tonelli M. Multitarget Biological Profiling of New Naphthoquinone and Anthraquinone-Based Derivatives for the Treatment of Alzheimer’s Disease. *ACS Chemical Neuroscience*, 2021, 12(3), 447–461.
- Catalá A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2006, 38(9).
- Chen M, Vial ML, Gee L, Davis RA, St John JA, Ekberg, JAK. The plant natural product 2-methoxy-1,4-naphthoquinone stimulates therapeutic neural repair properties of olfactory ensheathing cells. *Sci Rep*, 2020, 10, 951.
- Crouch IJ, Finnie JF, van Staden J. Studies on the isolation of plumbagin from in vitro and in vivo grown *Drosera* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1990, 21(1), 79–82.
- Das K, Roychoudhury A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2014, 2.
- Demidchik V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 2015, 109, 212–228.
- Demidchik V, Maathuis FJM. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development. *New Phytologist*, 2007, 175(3), 387–404.
- Demidchik V, Straltsova D, Medvedev SS, Pozhvanov GA, Sokolik A, Yurin V. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(5), 1259–1270.
- Ding ZS, Jiang FS, Chen NP, Lv GY, Zhu CG. Isolation and identification of an anti-tumor component from leaves of *Impatiens balsamina*. *Molecules*, 2008, 13, 220–229.

- Drażkiewicz M, Skórzyńska-Polit E, Krupa Z. Response of the ascorbate–glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L.). *Plant Science*, 2003, 164(2), 195–202.
- Dutta S, Mitra M, Agarwal P, Mahapatra K, De S, Sett U, Roy S. Oxidative and genotoxic damages in plants in response to heavy metal stress and maintenance of genome stability. *Plant Signaling & Behavior*, 2018, 1–49.
- Ellman’s assay for in-solution quantification of sulfhydryl groups, BMG labtech, <https://www.bmglabtech.com/fr/ellmans-assay-for-in-solution-quantification-of-sulfhydryl-groups/>, pristupljeno 12.4.2022.
- Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1959, 82(1), 70–77.
- Farmer EE, Mueller MJ. ROS-Mediated Lipid Peroxidation and RES-Activated Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 2013, 64(1), 429–450.
- Foong LC, Chai JY, Ho ASH, Yeo BPH, Lim YM, Tam SM. Comparative transcriptome analysis to identify candidate genes involved in 2-methoxy-1,4-naphthoquinone (MNQ) biosynthesis in *Impatiens balsamina* L. *Scientific Reports*, 2020, 10(1).
- Gamba M, Asllanaj E, Raguindin PF, Glisic M, Franco OH, Minder B, Metzger B, Kern H, Muka T. Nutritional and phytochemical characterization of radish (*Raphanus sativus*): A systematic review. *Trends in Food Science & Technology*, 2021, 113, 205–218.
- Giusti, MM, Wrolstad RE. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2001, 00(1), F1.2.1–F1.2.13.
- Hajdinák P, Czobor Á, Lőrincz T, Szarka A. The Problem of Glutathione Determination: a Comparative Study on the Measurement of Glutathione from Plant Cells. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, 2018, 63(1), 1–10.
- Halliwell B. Establishing the Significance and Optimal Intake of Dietary Antioxidants: The Biomarker Concept. *Nutrition Reviews*, 1999, 57(4), 104–113.
- Heath RL, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1968, 125(1), 189–198.

- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 2002, 13(10), 572–584.
- Hernández I, Alegre L, Van Breusegem F, Munné-Bosch S. How relevant are flavonoids as antioxidants in plants? *Trends in Plant Science*, 2009, 14(3), 125–132.
- Hook I, Mills C, Sheridan H. Bioactive Naphthoquinones from Higher Plants. *Studies in Natural Products Chemistry*, 2014, 119–160.
- Kenfelj I. Parametri oksidacijskog stresa bijele gorušice (*Sinapis alba* L.) nakon tretmana s 2-metoksi-1,4-naftokinonom, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2022, <https://repositorij.pharma.unizg.hr/islandora/object/pharma:2371>, pristupljeno 07.06.2022.
- Klotz, LO, Hou X., Jacob C. 1,4-Naphthoquinones: From Oxidative Damage to Cellular and Inter-Cellular Signaling. *Molecules*, 2014, 19(9), 14902–14918.
- Lee J, Durst RW, Wrolstad RE, Eisele T, Giusti MM, Hach J. Determination of Total Monomeric Anthocyanin Pigment Content of Fruit Juices, Beverages, Natural Colorants, and Wines by the pH Differential Method: Collaborative Study. *Journal of AOAC international*, 2005, 88(5), 1269–1278.
- Liew K, Yong PVC, Lim YM, Navaratnam V, Ho ASH. 2-Methoxy-1,4-Naphthoquinone (MNQ) suppresses the invasion and migration of a human metastatic breast cancer cell line (MDA-MB-231). *Toxicology in Vitro*, 2014, 28(3), 335–339.
- Liew K, Yong PVC, Navaratnam V, Lim YM, Ho ASH. Differential proteomic analysis on the effects of 2-methoxy- 1,4-naphthoquinone towards MDA-MB-231 cell line. *Phytomedicine*, 2015, 22, 517–527.
- Lin LC, Yang LL, Chou CJ. Cytotoxic naphthoquinones and plumbagic acid glucosides from *Plumbago zeylanica*. *Phytochemistry*, 2003, 62(4), 619–622.
- Lukatkin A, Egorova I, Michailova I, Malec P, Strzałka K. Effect of copper on pro- and antioxidative reactions in radish (*Raphanus sativus* L.) in vitro and in vivo. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2014, 28(1), 80–86
- Mattioli R, Francioso A, Mosca L, Silva P. Anthocyanins: A Comprehensive Review of Their Chemical Properties and Health Effects on Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. *Molecules*, 2020, 25(17), 3809.

- Meenu B, Neeraja E, Greeshma R, Alexeyena V. *Impatiens balsamina*: An overview. *J. Chem. Pharm. Res.* 2015, 7(9), 16–21.
- Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(9), 405–410.
- Møller IM, Jensen PE, Hansson A. Oxidative Modifications to Cellular Components in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 2007, 58(1), 459–481.
- Mullineaux PM, Rausch T. Glutathione, photosynthesis and the redox regulation of stress-responsive gene expression. *Photosynthesis Research*, 2005, 86(3), 459–474.
- Naing AH, Kim CK. Abiotic stress-induced anthocyanins in plants: Their role in tolerance to abiotic stresses. *Physiologia Plantarum*, 2021, 172(3), 1711-1723.
- Novais¹ JS, Carvalho¹ MF, Ramundo MS, Beltrame CO, Geraldo RB, Jordão AK, Ferreira VF, Castro HC, Figueiredo AGS. Antibiofilm effects of N,O-acetals derived from 2-amino-1,4-naphthoquinone are associated with downregulation of important global virulence regulators in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep.* 2020, 10(1), 19631.
- OECD Guidelines for the testing of chemicals, Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test, OECD, 208, 2003.
- Oku H, Ishiguro K. Antipruritic and antidermatitic effect of extract and compounds of *Impatiens balsamina* L. in atopic dermatitis model NC mice. *Phytotherapy Research*, 2001, 15(6), 506–510.
- Ong JYH, Yong PVC, Lim YM, Ho ASH. 2-Methoxy-1,4-naphthoquinone (MNQ) induces apoptosis of A549 lung adenocarcinoma cells via oxidation-triggered JNK and p38 MAPK signaling pathways. *Life Sci.* 2015, 35, 158–164.
- Oxidative stress, University of Washington, <https://osha.washington.edu/modrn/module4>, pristupljeno 13.5.2022.
- Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*, 2016, 5, e47.
- Petrusa E, Braidot E, Zancani M, Peresson C, Bertolini A, Patui S, Vianello A. Plant Flavonoids—Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(7), 14950–14973.
- Rodriguez R, Redman R. Balancing the generation and elimination of reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(9), 3175–3176.

- Rouhi HR, Zadeh FS, Aboutalebian MA, Karimi F. The effects of Osmo and Hydrothermal priming on germination traits of Sheep Fescue (*Festuca ovina* L.) *Annals of Biological Research*, 2012, 3 (5), 2479-2485.
- Sakunphueak A, Panichayupakaranant P. Comparison of antimicrobial activities of naphthoquinones from *Impatiens balsamina*. *Natural Product Research*, 2012, 26(12), 1119–1124.
- Shulaev V. Metabolic and Proteomic Markers for Oxidative Stress. New Tools for Reactive Oxygen Species Research. *Plant physiology*, 2006, 141(2), 367–372.
- Singh P, Singh R, Sati N, Ahluwalia V, Sati OP. Phytochemical and pharmacological significance of genus: *Impatiens*. *Int. J. Life. Sci. Scienti. Res.* 2017, 3, 868–881.
- Siti Azima AM, Noriham A, Manshoor N. Anthocyanin content in relation to the antioxidant activity and colour properties of *Garcinia mangostana* peel, *Syzigium cumini* and *Clitoria ternatea* extracts. *International Food Research Journal*, 2014, 21(6), 2369-2375
- Song R, Yu B, Friedrich D, Li J, Shen H, Krautscheid H, Kim MH. Naphthoquinone-derivative as a synthetic compound to overcome the antibiotic resistance of methicillin-resistant *S. aureus*. *Communications Biology*, 2020, 3(1), 529.
- Sun BY, Kan SH, Zhang YZ, Deng SH, Wu J, Yuan H, Qi H, Yang G, Li L, Zhang XH, Xiao H, Wang YW, Peng H, Li YW. Certain antioxidant enzymes and lipid peroxidation of radish (*Raphanus sativus* L.) as early warning biomarkers of soil copper exposure. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 183(1-3), 833–838.
- Štefan L, Tepšić T, Zavidic T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R. Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice *Medicina*, 2007, 43, 84-93.
- Tausz M. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(404), 1955–1962.
- Wang YC, Lin YH. Anti-gastric adenocarcinoma activity of 2-methoxy-1, 4-naphthoquinone, an anti-*Helicobacter pylori* compound from *Impatiens balsamina* L. *Fitoterapia*, 2012, 83, 1336–1344.
- Wang YC, Li WY, Wu DC, Wang JJ, Wu CH, Liao JJ, Lin CK. In Vitro Activity of 2-methoxy-1,4-naphthoquinone and Stigmasta-7,22-diene-3 β -ol from *Impatiens balsamina* L. against Multiple Antibiotic-Resistant *Helicobacter pylori*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 704721, 1–8.

- Widhalm JR, Rhodes D. Biosynthesis and molecular actions of specialized 1,4-naphthoquinone natural products produced by horticultural plants. *Horticulture Research*, 2016, 3(1), 16046.
- Winkel-Shirley B. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5(3), 218–223.
- Xie X, He Z, Chen N, Tang Z, Wang Q, Cai Y. The Roles of Environmental Factors in Regulation of Oxidative Stress in Plant. *BioMed Research International*, 2019, 1–11.
- Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *Journal of Cellular Physiology*, 2007, 211(1), 19–26
- Yang X, Summerhurst DK, Koval SF, Ficker C, Smith ML, Bernards MA. Isolation of an antimicrobial compound from *Impatiens balsamina* L. using bioassay-guided fractionation. *Phytotherapy Research*, 2011, 15(8), 676–680.
- Yang Z, Zhai . Identification and antioxidant activity of anthocyanins extracted from the seed and cob of purple corn (*Zea mays* L.). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2010, 11(1), 169–176.
- Yi G, Lim S, Chae WB, Park JE, Park HR, Lee EJ, Huh JH. Root Glucosinolate Profiles for Screening of Radish (*Raphanus sativus* L.) Genetic Resources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 64(1), 61–70.
- Yin Z, Zhang J, Chen L, Guo Q, Yang B, Zhang W, Kang W. Anticancer Effects and Mechanisms of Action of Plumbagin: Review of Research Advances. *BioMed Research International*, 2020, 1–10.
- Zhao YW, Wang CK, Huang XY, Hu DG. Anthocyanin stability and degradation in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 2021, 16, 12

8.SAŽETAK /SUMMARY

2-metoksi-1,4-naftokinon (2-MNQ) je sekundarni metabolit biljaka, gljiva i mikroorganizama. Zbog svojih antikancerogenih, antimetastatskih, antimikrobnih i drugih ljekovitih svojstava predmet je brojnih znanstvenih istraživanja. Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj 2-MNQ na fitotoksičnost i parametre oksidacijskog stresa u klijanaca obične rotkvice (*Raphanus sativus* L.). Sjemenke obične rotkvice bile su izložene tri dana 2-MNQ u koncentracijama 1, 5, 10, 20 i 30 $\mu\text{g/mL}$. U ispitivanje su bile uključene sjemenke rotkvice izložene tri dana destiliranoj vodi (negativna kontrola) i sjemenke rotkvice izložene tri dana 0,02 M otopini CuSO_4 (pozitivna kontrola). Modelni organizam tretiran je u triplikatu. Nakon trodnevna izlaganja izvagana je masa svježega tkiva te su pripremljeni homogenati klijanaca tkiva u trikloroocenoj kiselini (100 mg tkiva/0,5 mL). U supernatantu homogenata određeni su parametri oksidacijskog stresa: glutation (GSH), antocijanini i malondialdehid (MDA). Sadržaj GSH određen je pomoću DTNB reagensa, antocijanina pH diferencijalnom metodom, a MDA pomoću TBA testa spektrofotometrijski. Dobiveni rezultati su statistički obrađeni t-testom ($P \leq 0,05$).

Trodnevna izloženost 2-MNQ u koncentracijskom rasponu (1-30 $\mu\text{g/mL}$) nije dovela do statistički značajnog smanjenja mase klijanaca rotkvice u odnosu na negativnu kontrolu, što znači da ispitivane koncentracije 2-MNQ nisu imale fitotoksičan učinak na modelni organizam. Izloženost 2-MNQ u koncentracijama 1-20 $\mu\text{g/mL}$ kroz tri dana dovela je do statistički značajnog pad sadržaja GSH u odnosu na negativnu kontrolu ($P < 0,05$), dok je 2-MNQ u koncentraciji od 30 $\mu\text{g/mL}$ doveo do porasta sadržaja GSH. To se može objasniti potrošnjom zaliha GSH nakon trodnevne izloženosti nižim koncentracijama 2-MNQ u svrhu obrane od ROS-ova te *de novo* sintezom GSH kao odgovorom na oksidacijski stres nakon izloženosti višoj koncentraciji 2-MNQ. Značajnija promjena sadržaja antocijanina nakon trodnevne izloženosti 2-MNQ u ispitivanom koncentracijskom rasponu u odnosu na negativnu kontrolu nije zabilježena. Trodnevna izloženost najvišoj koncentraciji 2-MNQ (30 $\mu\text{g/mL}$) uzrokovala je blagi porast sadržaja MDA u odnosu na negativnu kontrolu, dok je izloženost nižim koncentracijama 2-MNQ (1-20 $\mu\text{g/mL}$) uzrokovala statistički značajan pad sadržaja MDA. S obzirom da je izloženost nižim koncentracijama 2-MNQ uzrokovala pad sadržaja i GSH i MDA, a viša koncentracija rast njihovog sadržaja, može se pretpostaviti da je rotkvice koristila GSH kao obrambeni sustav te se potrošnjom sadržaja GSH smanjivao i sadržaj MDA. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da ispitivane koncentracije 2-MNQ (1-30 $\mu\text{g/mL}$) nisu fitotoksične za rotkvicu te da je jedan od mehanizama djelovanja 2-MNQ oksidacijski stres.

2-methoxy-1,4-naphthoquinone (2-MNQ) is a secondary metabolite of plants, fungi, and microorganisms. Due to its anticancer, antimetastatic, antimicrobial and other beneficial properties, it has been subject of number of scientific studies. The aim of this study was to explore impact of 2-MNQ on phytotoxicity and parameters of oxidative stress in a plant model, radish (*Raphanus sativus* L.). Radish seeds were exposed to 2-MNQ at concentrations 1, 5, 10, 20 and 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 3 days. In the experiment a negative control (radish seeds exposed to distilled water for 3 days) and a positive control (radish seeds exposed to 0.02 M CuSO_4 solution for 3 days) were included. The model organism was treated in triplicate. After 3 days of exposure, fresh tissue weight was determined, and plant tissue homogenate was prepared using trichloroacetic acid (100 mg tissue/0.5 mL). As parameters of oxidative stress glutathione (GSH), anthocyanins and malondialdehyde (MDA) were assessed. GSH level was determined using DTNB reagent, anthocyanin level by pH differential method, and MDA with TBA assay, spectrophotometrically. The obtained results were statistically analysed by use of t-test ($P < 0.05$)

After 3-day exposure of radish seedlings to 2-MNQ (1-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) no significant reduction in fresh tissue weight was observed, suggesting that 2-MNQ in concentrations applied, is not phytotoxic to the model organism. A significant reduction of GSH level in comparison to the negative control was observed after exposure to 2-MNQ in concentrations 1-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. However, exposure to 2-MNQ at 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 3-days slightly increase GSH levels. A decrease in GSH level after exposure to lower 2-MNQ concentrations can be explained by its consumption by ROS, while an increase of GSH level after exposure to higher concentrations of 2-MNQ can be explained by its *de novo* synthesis in response to oxidative stress. No significant change in the level anthocyanins after 3-days exposure to 2-MNQ compared to the negative control was recorded. 3-days exposure to the highest 2-MNQ concentration (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) slightly increased MDA level comparing to negative control, while 2-MNQ at lower concentrations (1-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) significantly reduced MDA level. Similar pattern in the level of GSH and MDA in the radish cells after 3-days exposure to 2-MNQ could be due to utilization of GSH as an antioxidant in order to protect cells from oxidative stress that leads to decrease of MDA level. In conclusion, 2-MNQ in tested concentration range was not phytotoxic to radish, and one of its mechanisms of toxicity is oxidative stress.

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

UČINAK 2-METOKSI-1,4-NAFTOKINONA NA PARAMETRE OKSIDACIJSKOG STRESA U KLIJANACA OBIČNE ROTKVICE (*Raphanus Sativus L.*)

Sven Kraljević

SAŽETAK

2-metoksi-1,4-naftokinon (2-MNQ) je sekundarni metabolit biljaka, gljiva i mikroorganizama. Zbog svojih antikancerogenih, antimetastatskih, antimikrobnih i drugih ljekovitih svojstava predmet je brojnih znanstvenih istraživanja. Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj 2-MNQ na fitotoksičnost i parametre oksidacijskog stresa u klijanaca obične rotkvice (*Raphanus sativus L.*). Sjemenke obične rotkvice bile su izložene tri dana 2-MNQ u koncentracijama 1, 5, 10, 20 i 30 $\mu\text{g/mL}$. U ispitivanje su bile uključene sjemenke rotkvice izložene tri dana destiliranoj vodi (negativna kontrola) i sjemenke rotkvice izložene tri dana 0,02 M otopini CuSO_4 (pozitivna kontrola). Modelni organizam tretiran je u triplikatu. Nakon trodnevna izlaganja izvagana je masa svježega tkiva te su pripremljeni homogenati klijanaca tkiva u trikloroctenoj kiselini (100 mg tkiva/0,5 mL). U supernatantu homogenata određeni su parametri oksidacijskog stresa: glutation (GSH), antocijanini i malondialdehid (MDA). Sadržaj GSH određen je pomoću DTNB reagensa, antocijanina pH diferencijalnom metodom, a MDA pomoću TBA testa spektrofotometrijski. Dobiveni rezultati su statistički obrađeni t-testom ($P \leq 0,05$). Trodnevna izloženost 2-MNQ u koncentracijskom rasponu (1-30 $\mu\text{g/mL}$) nije dovela do statistički značajnog smanjenja mase klijanaca rotkvice u odnosu na negativnu kontrolu, što znači da ispitivane koncentracije 2-MNQ nisu imale fitotoksičan učinak na modelni organizam. Izloženost 2-MNQ u koncentracijama 1-20 $\mu\text{g/mL}$ kroz tri dana dovela je do statistički značajnog pad sadržaja GSH u odnosu na negativnu kontrolu ($P < 0,05$), dok je 2-MNQ u koncentraciji od 30 $\mu\text{g/mL}$ doveo do porasta sadržaja GSH. To se može objasniti potrošnjom zaliha GSH nakon trodnevne izloženosti nižim koncentracijama 2-MNQ u svrhu obrane od ROS-ova te *de novo* sintezom GSH kao odgovorom na oksidacijski stres nakon izloženosti višoj koncentraciji 2-MNQ. Značajnija promjena sadržaja antocijanina nakon trodnevne izloženosti 2-MNQ u ispitivanom koncentracijskom rasponu u odnosu na negativnu kontrolu nije zabilježena. Trodnevna izloženost najvišoj koncentraciji 2-MNQ (30 $\mu\text{g/mL}$) uzrokovala je blagi porast sadržaja MDA u odnosu na negativnu kontrolu, dok je izloženost nižim koncentracijama 2-MNQ (1-20 $\mu\text{g/mL}$) uzrokovala statistički značajan pad sadržaja MDA. S obzirom da je izloženost nižim koncentracijama 2-MNQ uzrokovala pad sadržaja i GSH i MDA, a viša koncentracija rast njihovog sadržaja, može se pretpostaviti da je rotkvice koristila GSH kao obrambeni sustav te se potrošnjom sadržaja GSH smanjivao i sadržaj MDA. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da ispitivane koncentracije 2-MNQ (1-30 $\mu\text{g/mL}$) nisu fitotoksične za rotkvicu te da je jedan od mehanizama djelovanja 2-MNQ oksidacijski stres.

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

Rad sadrži: 49 stranica, 15 grafičkih prikaza, 1 tablicu i 63 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: naftokinoni, 2-MNQ, rotkvice (*Raphanus sativus L.*), oksidacijski stres, GSH, MDA, antocijanini

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. Hrvoje Rimac, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Marijan Marijan, Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet.

Rad prihvaćen: srpanj 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

IMPACT OF 2-METHOXY-1,4-NAPHTOKINONE ON OXIDATIVE STRESS PARAMETERS OF RADISH (*Raphanus sativus* L.)

Sven Kraljević

SUMMARY

2-methoxy-1,4-naphthoquinone (2-MNQ) is a secondary metabolite of plants, fungi, and microorganisms. Due to its anticancer, antimetastatic, antimicrobial and other beneficial properties, it has been subject of number of scientific studies. The aim of this study was to explore impact of 2-MNQ on phytotoxicity and parameters of oxidative stress in a plant model, radish (*Raphanus sativus* L.). Radish seeds were exposed to 2-MNQ at concentrations 1, 5, 10, 20 and 30 µg/mL for 3 days. In the experiment a negative control (radish seeds exposed to distilled water for 3 days) and a positive control (radish seeds exposed to 0.02 M CuSO₄ solution for 3 days) were included. The model organism was treated in triplicate. After 3 days of exposure, fresh tissue weight was determined, and plant tissue homogenate was prepared using trichloroacetic acid (100 mg tissue/0.5 mL). As parameters of oxidative stress glutathione (GSH), anthocyanins and malondialdehyde (MDA) were assessed. GSH level was determined using DTNB reagent, anthocyanin level by pH differential method, and MDA with TBA assay, spectrophotometrically. The obtained results were statistically analysed by use of t-test (P < 0.05). After 3-day exposure of radish seedlings to 2-MNQ (1-30 µg/mL) no significant reduction in fresh tissue weight was observed, suggesting that 2-MNQ in concentrations applied, is not phytotoxic to the model organism. A significant reduction of GSH level in comparison to the negative control was observed after exposure to 2-MNQ in concentrations 1-20 µg/mL. However, exposure to 2-MNQ at 30 µg/mL for 3-days slightly increase GSH levels. A decrease in GSH level after exposure to lower 2-MNQ concentrations can be explained by its consumption by ROS, while an increase of GSH level after exposure to higher concentrations of 2-MNQ can be explained by its *de novo* synthesis in response to oxidative stress. No significant change in the level anthocyanins after 3-days exposure to 2-MNQ compared to the negative control was recorded. 3-days exposure to the highest 2-MNQ concentration (30 µg/mL) slightly increased MDA level comparing to negative control, while 2-MNQ at lower concentrations (1-20 µg/mL) significantly reduced MDA level. Similar pattern in the level of GSH and MDA in the radish cells after 3-days exposure to 2-MNQ could be due to utilization of GSH as an antioxidant in order to protect cells from oxidative stress that leads to decrease of MDA level. In conclusion, 2-MNQ in tested concentration range was not phytotoxic to radish, and one of its mechanisms of toxicity is oxidative stress.

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

Thesis includes: 49 pages, 15 figures, 1 table and 63 references. Original is in Croatian language.

Keywords: naphthoquinone, 2-MNQ, radish (*Raphanus sativus* L.), oxidative stress, GSH, MDA, anthocyanins

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
Hrvoje Rimac, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Marijan Marijan, Ph.D. University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2022.