

# Utjecaj kadmija na biokemijske pokazatelje stresa kod kukuruza (*Zea mays* L.)

---

Kirch - Leto, Annabella

Master's thesis / Diplomski rad

2024

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:837395>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-17**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij Kemija, istraživački smjer

Annabella Kirch-Leto

**Utjecaj kadmija na biokemijske pokazatelje stresa kod  
kukuruza (*Zea mays* L.)**

Diplomski rad

Osijek, 2024.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski sveučilišni studij Kemija, istraživački smjer

Annabella Kirch-Leto

**Utjecaj kadmija na biokemijske pokazatelje stresa kod  
kukuruza (*Zea mays* L.)**

Diplomski rad

Mentorica: izv. prof. dr.sc. Martina Šrajer Gajdošik

Komentor: dr.sc. Vlatko Galić, znanstveni suradnik

Osijek, 2024.

**TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA**

**Diplomski rad**

**Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku**

**Odjel za kemiju**

**Diplomski studij kemije**

**Znanstveno područje:** Prirodne znanosti

**Znanstveno polje:** Kemija

**UTJECAJ KADMIJA NA BIOKEMIJSKE POKAZATELJE STRESA KOD KUKURUZA  
(*Zea mays* L.)**

**Annabella Kirch-Leto**

**Rad je izrađena na:** Odjelu za kemiju Sveučilišta Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

**Mentorica:** Izv. Prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

**Komentor:** dr. sc. Vlatko Galić, znanstveni suradnik

**Sažetak:**

Kukuruz (*Zea mays* L.) je jednogodišnja biljka iz porodice trava (Poaceae). Zbog svog potencijala rodosti jedna je od najznačajnijih biljaka za prehrambenu industriju. Prisutnost teških metala u tlu jedan je od glavnih čimbenika oksidacijskog stresa u biljkama. U ovom radu istraživana je utjecaj kadmija na biokemijske pokazatelje stresa dvije linije kukuruza: 84-28A i OS 942 te njihovom hibridu OS 404. U tu su svrhu izmjereni enzimski (superoksid-dismutaza (SOD), gvajakol-peroksidaza (GPOD)) i neenzimski pokazatelji stresa (karotenoidi, klorofili te razina lipidne peroksidacije (TBARS)). Biljke su tretirane koncentracijama kadmija 150  $\mu\text{mol/L}$  (Cd150) i 375  $\mu\text{mol/L}$  (Cd375). Povećanje aktivnosti gvajakol peroksidaze uočeno je u linijama 84-28A i OS942 i njihovom hibridu OS 404 pri tretmanu s Cd150. Pad koncentracije klorofila prati pad koncentracije karotenoida. Snižavanje koncentracije TBARS-a vidljivo je u linijama OS 942 i OS 404 pri tretmanu kadmijem Cd150. Specifična aktivnost superoksid dismutaze nije pokazala značajne promjene u odnosu na kontrolne uzorke. Uočen je blagi pad aktivnosti SOD u liniji 84-28A pri tretmanu s Cd375. Dobiveni rezultati ukazuju da kadmij ima utjecaj na navedene biokemijske pokazatelje stresa kod kukuruza (*Zea mays* L.).

**Diplomski rad obuhvaća:** 43 stranice, 11 slika, 1 tablicu, 41 literaturni navod

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Ključne riječi:** kukuruz, oksidativni stres, kadmij, pigmenti, lipidna peroksidacija, gvajakol peroksidaza

**Rad prihvaćen:** 24.5.2024.

**Datum obrane:** 03.06.2024

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. izv. prof. dr. sc. Vlatka Gvozdić, predsjednica
2. izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik, mentorica i članica
3. dr. sc. Vlatko Galić, znanstveni suradnik, član
4. izv. prof. dr. sc. Lidija Kalinić, zamjena člana

Rad je pohranjen: u knjižnici Odjela za kemiju, Franje Kuhača 20, 31 000 Osijek

**FUNDAMENTAL DOCUMENTATION CARD****Master thesis****Josip Juraj Strossmayer University in Osijek****Department of Chemistry****Graduate study in chemistry****Scientific Area:** Natural sciences**Scientific Field:** Chemistry**THE INFLUENCE OF CADMIUM ON THE BIOCHEMICAL INDICATORS OF STRESS  
IN MAIZE (*Zea mays* L.)****Annabella Kirch-Leto****Thesis completed at:** Department of Chemistry, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek**Supervisor:** Assoc. Prof. Ph.D. Martina Šrajer Gajdošik**Co-Supervisor:** Vlatko Galić, Associate Prof., PhD**Abstract:**

Maize (*Zea mays* L.) is an annual plant from the grass family (Poaceae). Due to its fertility potential, it is one of the most important plants for the food industry. The presence of heavy metals in the soil is one of the main factors of oxidative stress in plants. In this work, the influence of cadmium on biochemical stress indicators of two corn lines: 84-28A and OS 942 and their hybrid OS 404 was investigated. For this purpose, enzymatic (superoxide dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (GPOD)) and non-enzymatic (carotenoids, chlorophylls and lipid peroxidation level (TBARS)) stress indicators were measured. The samples were treated with cadmium concentrations of 150  $\mu\text{mol/L}$  (Cd150) and 375  $\mu\text{mol/L}$  (Cd375). An increase in guaiacol peroxidase activity was observed in the lines 84-28A and OS942 and their hybrid OS 404 when treated with Cd150. The decrease in the concentration of carotenoids was observed in OS 942 and OS 404 when treated with Cd150. The specific activity of superoxide dismutase did not show any significant changes in comparison to control samples. A slight decrease in SOD activity was observed in line 84-28A upon treatment with Cd375. The obtained results indicate that cadmium has an impact on the mentioned biochemical stress indicators in corn (*Zea mays* L.).

**Thesis includes:** 43 pages, 11 figures, 1 table, 41 references**Original in:** Croatian**Key words:** maize, oxidative stress, cadmium, pigments, lipid peroxidation, guaiacol peroxidation**Thesis accepted:** 24.05.2024**Thesis defence:** 03.06.2024.**Reviewers:**

1. Assoc. Prof. Vlatka Gvozdić, Ph. D., chair
2. Assoc. Prof. Martina Šrajer Gajdošik, Ph. D., supervisor and member
3. Vlatko Galić, PhD, co-supervisor and member
4. Assoc. Prof. Lidija Kalinić, PhD, alternate member

**Thesis deposited in:** Department of Chemistry library, Franje Kuhača 20, 31 000 Osijek

## **Zahvale**

*Želim se zahvaliti svim djelatnicima Odjela za kemiju i vanjskim suradnjicima koji su mi pomogli na mom putu do diplome.*

*Hvala mojoj obitelji koja je bila uz mene u trenucima kada se kraj činio dalekim i nedodirljivim jer su me bodrili da nastavim i da ne odustanem.*

*Hvala svim mojim prijateljima koji su me ohrabivali i nasmijavali u vrijeme kada mi je to najviše trebalo.*

*Hvala mojim nadređenima koji su imali razumijevanja za mene i moje obaveze te što su me bodrili na putu do uspjeha.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2.1. KUKURUZ</b> .....	<b>2</b>
2.1.1. MORFOLOŠKA OBILJEŽJA KUKURUZA ( <i>ZEAMAYS</i> L.) .....	2
2.1.2. GOSPODARSKI ZNAČAJ .....	3
2.1.3. UVJETI UZGOJA .....	3
<b>2.2. BIOKEMIJSKI PARAMETRI STRESA KOD BILJAKA</b> .....	<b>4</b>
2.2.1. OKSIDACIJSKI STRES .....	4
2.2.2. SUPEROKSID-DISMUTAZA (SOD) .....	5
2.2.3. GVAJAKOL-PEROKSIDAZA (GPOD) .....	7
2.2.4. LIPIDNA PEROKSIDACIJA .....	8
2.2.5. KAROTENOIDI .....	9
2.2.6. KLOROFILI .....	10
<b>2.3. KADMIJ</b> .....	<b>12</b>
2.3.1. OPĆA SVOJSTVA KADMIJA .....	12
2.3.2. EKOTOKSIKOLOGIJA KADMIJA .....	13
2.3.3. UTJECAJ NA BILJKE .....	14
<b>3. MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>16</b>
3.1. KEMIKALIJE .....	16
3.2. UZGOJ BILJNOG MATERIJALA .....	17
3.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE FOTOSINTETSKIH PIGMENATA .....	18
3.4. ODREĐIVANJE RAZINE LIPIDNE PEROKSIDACIJE .....	19
3.5. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI GVAJAKOL-PEROKSIDAZE .....	20
3.6. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI SUPEROKSID DISMUTAZE .....	21
3.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA .....	23
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>24</b>
4.1. AKTIVNOST GVAJAKOL-PEROKSIDAZE .....	24
4.2. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE FOTOSINTETSKIH PIGMENATA .....	25
4.3. ODREĐIVANJE LIPIDNE PEROKSIDACIJE .....	27
4.4. ODREĐIVANJE SPECIFIČNE AKTIVNOSTI SUPEROKSID DISMUTAZE .....	28
<b>5. RASPRAVA</b> .....	<b>29</b>
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>33</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>34</b>

# 1. UVOD

Oksidacijski stres definiran je kao neravnoteža između oksidansa i antioksidansa s pomakom ravnoteže u korist oksidansa. Stres kod biljaka je uzrokovan salinitetom, sušom, promjenama temperature, izloženosti teškim metalima i drugim faktorima. U uvjetima oksidativnog stresa dolazi do povećane proizvodnje reaktivnih kisikovih oblika (*eng.* reactive oxygen species, ROS) koji uzrokuju oštećenja proteina, lipida i DNA [1]. Biljke su razvile široki spektar mehanizama u obrani od oksidacijskih oštećenja. Neki od njih su superoksid-dismutaza (SOD), askorbat-peroksidaza (AXP), pirogalol-peroksidaza (PPX) i katalaza (CAT) te pripadaju enzimskim mehanizmima. Od neenzimskih antioksidansa važno je spomenuti prolin, tokoferol, karotenoidae glutation, flavonoide i dr.[2].

Kadmij (Cd) je teški, prijelazni metal 12. skupine plavo-bijele boje koji se dobiva iz prirodnih izvora kao što su rudnici. Elektronska konfiguracija mu je [Kr] 4d<sup>10</sup> 5s<sup>2</sup>. Zbog sličnih svojstava povezuje s cinkom ([Ar] 3d<sup>10</sup> 4s<sup>2</sup>) s kojim se u prirodi često pojavljuje u primjesama [3]. U tlo najčešće dopijeva putem atmosferske depozicije, poljoprivredne djelatnosti (ponajprije gnojidbe fosforim gnojivima), ljudskim faktorom, te prirodnim procesima poput šumskih požara i starenja stijena. Smatra se jednim od najotrovnijih metala za žive organizme. Zbog veće topljivosti u odnosu na ostale metale u skupini, akumulira se u jestivim dijelovima biljke te je često prisutan u zelenoj salati, kupusu i špinatu. Prehranom ga je moguće unijeti konzumacijom iznutrica, gljiva, školjaka i biljaka [4]. U biljkama uzrokuje osmotski stres, promjene u građi biljke, smanjuje provodljivost vode, te dovodi do staničnih oštećenja. Zbog sposobnosti akumulacije i stabilizacije kadmijevih spojeva, biljke imaju mogućnost smanjenja onečišćenja okoliša [5].

Kukuruz (*Zea mays* L.) je jednogodišnja biljka iz porodice trava (Poaceae). Žitarica je od velike važnosti za prehranu i industriju. Dokazano je da kukuruz akumulira više kadmija u staničnim stjenkama u odnosu neke druge vrste. Gospodarski značaj kukuruza leži u činjenici da je svaki dio biljke moguće iskoristiti [6].

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi utjecaj kadmija na biokemijske pokazatelje stresa u dvjema različitim samooplođnim linijama kukuruza (*Zea mays*,L.) (OS84-28A) i (OS942) te njihovom hibridu (OS404).



## 2.1. KUKURUZ

### 2.1.1. Morfološka obilježja kukuruza (*Zea mays* L.)

Kukuruz je jednogodišnja biljka iz porodice trava (Poaceae) koja obuhvaća žitarice važne za prehranu i industriju. Vrsta *Zea mays* L. podrijetlom je iz Sjeverne Amerike odakle u Europu stiže u 15. stoljeću [6]. Na područje današnje Hrvatske dolazi iz Italije u Dalmaciju pomorskim putevima [7]. Korijen je dobro razvijen što mu omogućava opstanak na lošem tlu u sušnim uvjetima i dobre prinose. Ima razgranat korijen koji obuhvaća veliki volumen tla. Raste na dubini do 30 cm, a može narasti i do 3 metra. Stabljika je dugačka od 1 do 4 metra na području Hrvatske, a u drugim vegetacijama može narasti i do 7 metara [6]. Na stabljici su naizmjenično raspoređeni listovi koji štite klipove od vanjskih utjecaja, nametnika i bolesti. Ima razdvojene muške i ženske cvjetove. Muški cvijet je. metlica, a ženski klip Klip je dugačak od 8 do 40 cm. Plod kukuruza je pšeno koje se razlikuje po boji, veličini i obliku ovisno o hibridu. Njegova dužina je od 8 do 12 mm i ono je sjajno, glatko na dodir i spljošteno. Boja je najčešće žuta no može biti i drukčija [6].



Slika 1. Slikoviti prikaz kukuruza (*Zea mays* L.) [6].

### 2.1.2 Gospodarski značaj

Uz pšenicu i rižu, kukuruz je najzastupljenija žitarica na svijetu. Gospodarski je značajan jer se svaki dio biljke može iskoristiti [7]. Stabljike s listovima se upotrebljavaju za prehranu životinja u stočarstvu. Korijen popravlja strukturu tla i potiče njegovu mikrobiološku aktivnost. Značajan je za farmaceutsku, tekstilnu i prehrambenu industriju. Od njega se proizvode alkohol, hrana, škrob, kozmetički, farmaceutski proizvodi i tekstil. U prehrambenoj industriji se najviše upotrebljavaju hibridi kukuruza kokičar i šećerac. Od njih se prave peciva, kokice, alkohol etanol, te ulje. Kukuruzno ulje se priprema iz klice koja sadrži oko 30% ulja. Etanol se upotrebljava u svrhu dobivanja zamjene za fosilna goriva [6]. Iz kukuruza se proizvode automobilske gume i kompaktni diskovi. Često se koristi u istraživanjima u genetici i za selekciju jer ima najveći potencijal rodosti u odnosu na ostale žitarice. U Hrvatskoj se i dalje primarno upotrebljava kao stočna hrana te je preradba još na niskoj razini [7].

### 2.1.3 Uvjeti uzgoja

Po količini uzgoja, kukuruz je treća biljna vrsta s obzirom na proizvodnju u svijetu. SAD, Kina i Brazil su vodeći svjetski proizvođači, a od europskih država prednjače Ukrajina, Francuska i Rumunjska [7]. U Hrvatskoj se uzgaja na području između Drave, Save i Dunava, pretežno u Slavoniji i Baranji te Srijemu [6]. Početak klijanja je trenutak kada korijen dosegne pola dužine sjemena. Najniža potrebna temperatura za klijanje kukuruza je 8-12 °C dok je optimalna 32-35 °C, a maksimalna 40-45 °C. Na niskim temperaturama kukuruz sporije raste, te je veća vjerojatnost da će doći do kontaminacije različitim patogenim organizmima. Sjetva se odvija kada temperatura tla dosegne 12 °C. Proces nicanja se definira kao pojava prvog lista 2 cm iznad tla. Pri pogodnoj temperaturi 15-20 °C uz dovoljnu količinu vlage nicanje se odvija nakon 8 do 10 dana. Uz temperature više od 20 °C kukuruz će niknuti za 6 do 7 dana. U uvjetima niskih temperatura zraka pri 10-12 °C od sjetve do nicanja može proći i do 20 dana [7]. U sušnim uvjetima je manja aktivna površina korijena, te prodire više u dubinu i širinu zemlje. Kod prevelike vlažnosti korijen je slabiji zbog pojave nedostatka kisika.

Prva tri lista nastaju 5-7 dana nakon nicanja. Ostali listovi se pojavljuju vrlo brzo te biljka prelazi na autotrofnu prehranu nakon čega se rast listova usporava i kreće intenzivan rast stabljike. U periodu intenzivnog rasta stabljike porast kukuruza dnevno iznosi 10-15 cm. Cvatnja metlice traje 5-7 dana i ona predstavlja prekid rasta biljke. Prašničke niti iznose prašnice izvan područja cvijeta čime započinje postupak prašenja koji traje 1-2 dana. Svilanje je proces stvaranja svile i nastanak klipa. Izduživanje svile počinje oko tjedan dana prije svilanja te se prvo pojavljuje svila s baze klipa. Proces završavana nakon 4-5 dana. Svila je prekrivena dlačicama koje hvataju peludna zrnca i receptivna je narednih 10 dana. Zrno se razvija 20-25 dana nakon oplodnje [7].

## 2.2. BIOKEMIJSKI PARAMETRI STRESA KOD BILJAKA

### 2.2.1. Oksidacijski stres

Oksidansi se definiraju kao tvari koje prenose kisik ili oksidiraju druge tvari [8]. Nastaju aerobno kao međuprodukti oksidacije vode do molekularnog kisika [9]. Antioksidansi su tvari koje prisutne u malim koncentracijama mogu usporiti ili spriječiti oksidaciju [10]. Do inhibicije oksidacije dolazi čak i ako su koncentracije antioksidansa u stanici manje u odnosu na koncentraciju supstrata koji podliježe oksidaciji. Oksidacijski stres se može definirati kao neravnoteža između oksidansa i antioksidansa s pomakom ravnoteže u korist stvaranja oksidansa [1]. Stres kod biljaka može biti uzrokovan raznim vanjskim utjecajima poput promjena temperature, saliniteta, suše, izloženosti teškim metalima i slično. U uvjetima oksidativnog stresa dolazi do oštećenja važnih makromolekula kao što su proteini, lipidi i DNA. Također u povećanim koncentracijama nastaju reaktivni kisikovi oblici (ROS) koji mogu biti radikalni i neradikalni.

Primjeri radikalnih spojeva su superoksidni ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroksilni ( $OH^{\bullet}$ ) i peroksilni ( $RO_2^{\bullet}$ ) radikal, a reaktivnih neradikalnih derivata: vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i singletni kisik ( $^1O_2$ ) [12]. U biljkama djeluju kao signali u signalnim putevima te kao pokazatelji oštećenja stanica ukoliko nastaju u prevelikim koncentracijama. Kada su izložene  $Cd^{2+}$ , sadržaj ROS-a u biljkama će se povećati, čime će se poremetiti normalna metabolička ravnoteža. ROS se vežu za proteine, lipide i DNA. Taj proces uzrokuje smanjenu aktivnost enzima, povećanu propusnost membrane, odnosno mutacije. Nastanak ROS-a može negativno utjecati na metabolizam i rast stanice [12]. Biljke imaju snažne i učinkovite antioksidativne obrambene sustave koji se aktiviraju kao odgovor na stres. Primjeri takvih obrambenih sustava su enzimatski i neenzimatski mehanizmi. Enzimski mehanizmi su superoksid-dismutaza (SOD), askorbat-peroksidaza (ASP), pirogalol-peroksidaza (PPX) i katalaza (CAT) i drugi [2]. Osim što kontroliraju stvaranje ROS-a također štite i biljne stanice od oštećenja jer smanjuju razinu oksidacijskog stresa. Neenzimski mehanizmi koji štite biljke od oksidacijskih oštećenja su antioksidansi poput: prolina, tokoferola, klorofila, glutationa, askorbinske kiseline, karotenoida i flavonoida [1].

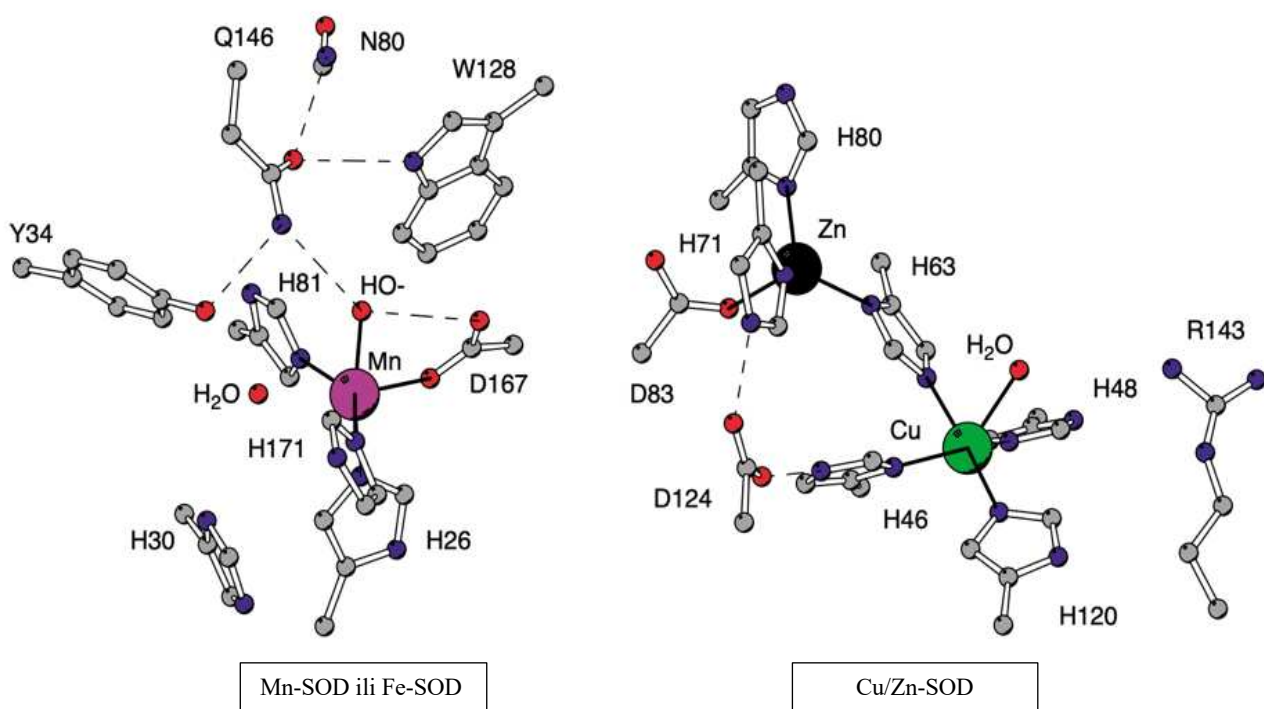
### 2.2.2. Superoksid-dismutaza (SOD)

SOD je enzim koji ima važnu ulogu u obrani organizma od oksidacijskog stresa u svim aerobnim organizmima tako i u biljkama. Pripada skupini metalo-enzima te katalizira pretvorbu superoksidnog radikala  $O_2^{\bullet-}$  u molekularni kisik  $O_2$  i vodikov peroksid  $H_2O_2$  u reakciji disproporcioniranja koja glasi [2]:



U biljkama se razlikuju tri vrste SOD-a prema centralnom metalnom atomu u enzimu. To su bakar-cink-SOD (Cu/Zn-SOD), željezo-SOD (Fe-SOD) te mangan-SOD (Mn-SOD) [14]. Fe-SOD se nalazi u kloroplastima, a Mn-SOD u mitohondrijima. Bakar-cink izoforma se pojavljuje u tri različita oblika koja su lokalizirana u citosolu, kloroplastima, mitohondrijima i peroksisomima. Dimerna Cu/Zn-SOD koja se nalazi u eukariotima je osjetljiva na prisutstvo cijanida, dok se Mn-SOD i Fe-SOD najčešće pojavljuju u obliku tetramera i nisu senzibilne na cijanide [14].

Aktivno mjesto Fe-SOD sadži jedan Fe ion koji je koordiniran u trigonalnoj bipiramidi s tri histidina, asparaginskom kiselinom (Asp) i molekulom OH/H<sub>2</sub>O koja se nalazi unutar mreže vodikovih veza koje tvori s bočnim ograncima glutamina (Gln69) i tirozina (Tyr34) [15]. Fe-SOD i Mn-SOD imaju vrlo sličnu strukturu i aktivno mjesto stoga se pretpostavlja da su rani oblici upotrebljavali Fe. Smatra se da je Mn zamjenio Fe s pojavom eukariota i povećanjem razine kisika. Mn i Fe-SOD su dimeri čiji se sastav aminokiselina podudara 43 %, odnosno tri histidina i jedan aspartat koji veže metalni ion u oba enzima [15]. Cu/Zn-SOD je homodimerni protein kod kojeg svaka podjedinica sadži bakrov i cinkov ion u aktivnom mjestu. Kod biljaka je prisutan i monomerni oblik enzima. Oksidirani oblik izoenzima Cu/Zn-SOD sadži dvovalentne bakrove ione u svom aktivnom mjestu na koje se veže molekula vode, jednovalentni bakrov ion se nalazi u reduciranom obliku. Svaki od izoenzima SOD se razlikuje po osjetljivosti na djelovanje KCN i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Vodikov peroksid inhibira Fe-SOD, ali je izoenzim otporan na djelovanje KCN. Mn-SOD je otporan na djelovanje obje tvari. Bakar-cink SOD ima sposobnosti aktivirati H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i KCN [2]. Strukture SOD-a prikazane su na slici 2.

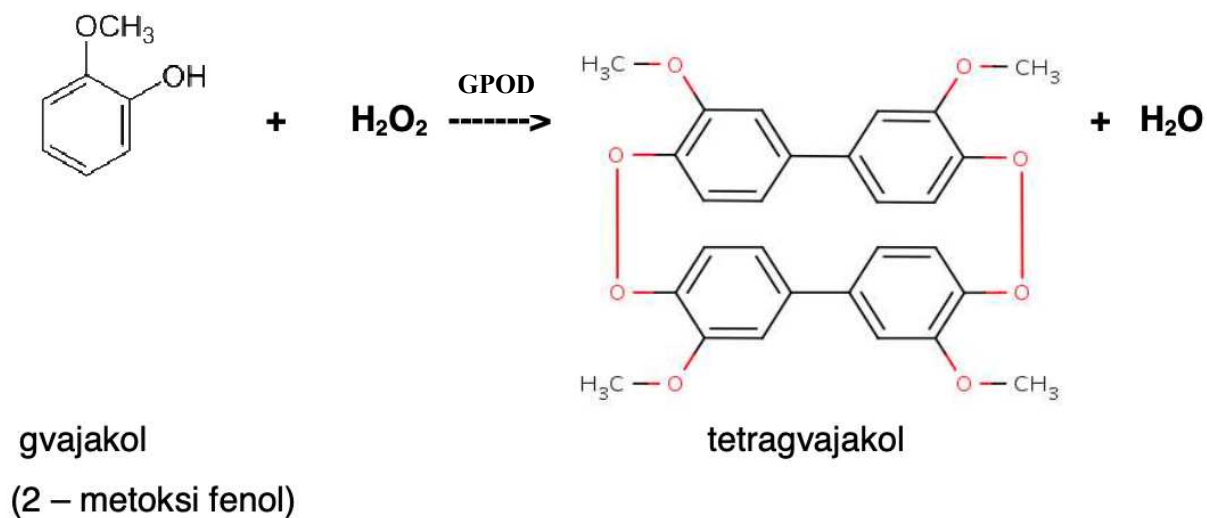


Slika 2. Prikaz struktura izomera SOD [15].

Mehanizam djelovanja SOD najlakše je pojasniti na primjeru djelovanja Mn-SOD kod eukariota. Manganski centar nalazi se u pukotini dimera, odnosno u aktivnom mjestu enzima te je okružen pozitivno nabijenim aminokiselinama His74, His26, His163 i Asp159. Aktivni dio enzima predstavlja hidroksilni ( $\text{OH}^-$ ) dio koji potječe od vodenog liganda vezan na His74. Aktivno mjesto je formirano na način da se supstrat specifično veže odnosno da se savršeno prostorno uklapa pri čemu je onemogućeno vezanje drugih molekula.  $\text{OH}^-$  skupina omogućava prijenos elektrona s radikala na metal i obrnuto. Superoksidni anion će nakon ulaska u aktivno mjesto enzima predati elektron hidroksilnoj skupini nakon čega se Mn(III) reducira u Mn(II). Hidroksilna skupina veže proton te dolazi do nastanka vodenog liganda i molekuskog kisika  $\text{O}_2$ . Drugi superoksidni ion ulazi u aktivno mjesto i veže proton iz otopine te preuzima elektron i drugi proton od  $\text{H}_2\text{O}$  liganda. Dolazi do oksidacije Mn(II) u Mn(III) i ponovno nastaje  $\text{OH}^-$  [16]. Kod biljaka može doći do oksidativnog stresa uslijed izloženosti teškim metalima, suši, visokoj temperaturi i sl. Povećanje aktivnosti SOD-a je pokazatelj povećane razine tolerancije na oksidativni stres [13]. Pri smanjenoj aktivnosti SOD-a, u uvjetima povećanog oksidacijskog stresa, dolazi do karbonilacije proteina te do oštećenja membrana i DNA. [2].

### 2.2.3. Gvajakol-peroksidaza (GPOD)

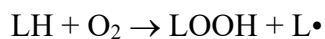
Gvajakol-peroksidaza pripada biljnim peroksidazama koje sudjeluju u regulaciji fizioloških procesa i antioksidacijskom odgovoru u uvjetima oksidativnog stresa. Peroksidaze su glikoproteini, u aktivnom središtu sadrže atom željeza, a kataliziraju redoks reakcije između vodikovog peroksida i drugih reducensa. Zbog slabe specifičnosti peroksidaza prema supstratima te zbog prisutnosti velikog broja izoformi u biljkama, njihove točne funkcije još i dalje nisu u potpunosti razjašnjene. Poznato je da biljne peroksidaze sudjeluju u peroksidacijskom ciklusu kojim se uklanja vodikov peroksid te dolazi do oksidiranja različitih supstrata. Također sudjeluju i u hidroksilnom ciklusu u kojem se oslobađaju ROS. Gvajakol-peroksidaze imaju afinitet prema aromatskim elektron donorima stoga se gvajakol često upotrebljava kao supstrat za mjerenje aktivnosti peroksidaza. Gvajakol je sintetički supstrat čijom oksidacijom u prisutnosti vodikovog peroksida i GPOD-a nastaje žuto-smeđi produkt tetragvajakol (slika 3). Gvajakol peroksidaze su prisutne u organizmu u velikom broju izoenzimskih formi. [17].



Slika 3. Reakcija pretvorbe gvajakola u tetragvajakol [17].

#### 2.2.4. Lipidna peroksidacija

Organski spojevi prisutni u živim organizmima uključujući i lipide, podložni su oksidaciji. Prilikom pojave oksidacijskog stresa, slobodni radikali napadaju stanične membrane koje su građene od višestruko nezasićenih masnih kiselina. Kao posljedica ove interakcije dolazi do procesa lipidne peroksidacije koja se odvija mehanizmom lančanih reakcija radikala. Tri su faze lipidne peroksidacije, inicijacija, propagacija i terminacija [1]. Reakcija kisika i lipida prikazana je izrazom:



Proces započinju okidači poput svjetlosti, temperature, ionizirajućeg zračenja, iona prijelaznih metala i različitih kemijskih inicijatora. Faza inicijacije započinje izdvajanjem vodika pri čemu nastaje bis-alilni radikal, L<sup>•</sup>. Dvostruka veza na α-C atomu prema CH<sub>3</sub> skupini slabi C-H vezu te olakšava izlazak H atoma. Dolazi do homolitičkog cijepanja C-H veze unutar nezasićenih masnih kiselina. Alil-radikal koji nastaje je stabiliziran rezonancijom i daje konjugirani dien L<sup>•</sup> [11]. Prilikom razgradnje lipidnih hiperoksida (LOOH) dolazi do nakupljanja aldehida i ugljikovodika tj. produkata peroksidacije [1]. U fazi propagacije dolazi do adicije kisika na konjugirani dien L<sup>•</sup>, dolazi do nastanka peroksilnog radikala LOO<sup>•</sup>. Ponovno se izdvaja vodikov atom iz druge molekule nezasićene masne kiseline i nastaje prvi stabilni produkt, lipidni hidroperoksid (LOOH) i novi alkilni radikal (L<sup>•</sup>) te se lančane reakcije nastavljaju. Posljednja faza, terminacija je faza lančanih reakcija i ona završava stvaranjem neradikalnih produkata koji su nastali rekombinacijom radikala ili nekih drugih molekula poput proteina i antioksidansa [11].

Oštećenja nastala procesom lipidne peroksidacije se mogu odrediti mjerenjem količine krajnjih produkata te reakcije. Najčešće se mjere koncentracije nastalih produkata kao što su malondialdehid (MDA), izoprostan i 4-hidroksinonenal (HNE). Malondialdehid se može detektirati reakcijom pomoću tiobarbituratne kiseline (TBA) pri kojoj nastaju obojeni produkti nazvani tiobarbiturne reaktivne supstance (TBARS) [18]. MDA se određuje spektrometrijski pri valnoj duljini od 532 nm i 600 nm [17]. Lipidna peroksidacija i nastanak MDA imaju utjecaj na svojstva membrana kao što su djelovanje na transport iona i fosfolipida između lipidnog dvosloja, povećanje propusnosti za tvari kojima je prije stanja oksidacijskog stresa bio onemogućen prolaz kroz membranu te smanjuju fluidnost membrane [1].

### 2.2.5. Karotenoidi

Karotenoidi su pigmenti s antioksidativnom aktivnošću koji se nalaze u biljkama i mikroorganizmima kao što su gljive, alge, bakterije [19]. Napolarni su i topljivi u lipidima te imaju sposobnost ukloniti ROS, posebice peroksidne radikale [20]. U strukturi sadržavaju i do 40 ugljikovih atoma, no također postoje i oni s 45 i 50 ugljikovih atoma [19]. Dugački



nezasićeni alkilni lanci karotenoida pospješuju lipofilnost čime se olakšava zaštita staničnih membrana i lipoproteina [20]. Najpoznatiji predstavnik karotenoida je beta-karoten.

Pigmenti se kod viših biljaka nalaze u plodu, cvijetu i korijenu, a karotenoidi najčešće dolaze u obliku crvene, narančaste i žute boje. Povećanje temperature potiče izomerizaciju dvostruke veze u lancu stoga može doći do smanjenja intenziteta boje. U nekih biljaka zelene boje karotenoidi postaju vidljivi tek u vrijeme jeseni kada dolazi do degradacije klorofila [9].

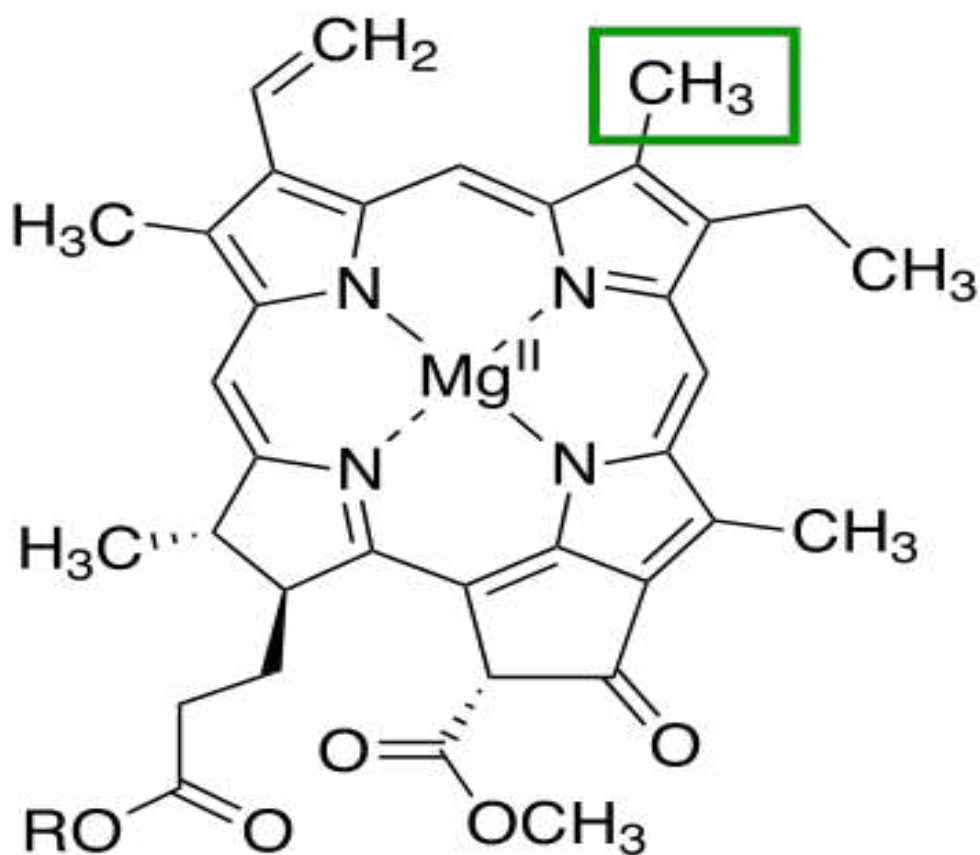
Karotenoidi apsorbiraju svjetlost u području od 400 do 500 nm gdje klorofili slabo apsorbiraju, te prenose energiju na druge pigmente sve do molekule klorofila. U biljnom organizmu osim antioksidativnog djelovanja, imaju ulogu u jačanju imunološkog sustava, regulaciji međustanične komunikacije, izazivanju stanične apoptoze, regulaciji ekspresije gena te modulacije detoksifikacijskih enzima [19].

### 2.2.6. Klorofili

Klorofili pripadaju skupini fotosintetskih pigmenata jer imaju mogućnost apsorpcije Sunčeve svjetlosti. Klorofil *a* naziva se još i primarni fotosintetski pigment jer prevodi svjetlosnu energiju u kemijsku. Svi ostali fotosintetski pigmenti se mogu svrstati u sekundarne jer imaju pomoćnu i/ili zaštitnu ulogu [21]. Unutar svakog kloroplasta u biljci nalazi se oko 600 milijuna molekula klorofila. Duljina dana, salinitet tla, suša, temperatura i onečišćenja česticama prašine imaju utjecaj na omjer i sadržaj fotosintetskih pigmenata u listovima biljaka. Na udio klorofila u biljkama također utječu i tvari poput teških metala i ksenobiotika primjerice herbicidi. Imaju utjecaj na pigmente djelujući na enzime prisutne u njihovom biosintetskom putu. [21]. Klorofili *a* i *b* daju biljkama zelenu boju kao posljedica apsorpcije svjetlosti u plavom i crvenom dijelu elektromagnetskog spektra. Klorofil *b* ima zeleno-plavu boju jer je njegov spektar apsorpcije pomaknut u crveno u odnosu na klorofil *a* koji je žuto-zelene boje [22]. S obzirom na strukturu, klorofili se mogu podijeliti na *a*, *b*, *c* i *d* klorofile te na bakterioklorofile. Klorofili središnjem atomu magnezija koji je koordinacijski povezan na dodatni peti izociklički prsten. Klorofili sadrže porfirinski prsten, građen od četiri pirolna prstena. U središtu porfirinske jezgre se nalazi atom

magnezija ( $Mg^{2+}$ ) vezan sa četiri koordinacijske veze na atome dušika koji se nalaze unutar strukture pirolnih prstena [21]. Esterskom vezom na četvrtom prstenu je povezan fitol, spoj koji nastaje spajanjem četiri izoprenske jedinice i predstavlja hidrofobni dio molekule zbog čega je klorofil dobro topljiv u lipidima.

Upravo topljivost u lipidima omogućava klorofilu smještanje u hidrofobno okruženje tilakoidne membrane [21]. Razlike između struktura klorofila *a* i *b* primjećuju se na trećem pirolnom prstenu na kojem klorofil *a* sadržava metilnu ( $-CH_3$ ) skupinu dok klorofil *b* umjesto zeleno označene metilne skupine sadrži aldehidnu skupinu ( $-CHO$ ) (Slika 4.) [23].



Slika 4. Struktura klorofila *a* [24].

## 2.3. KADMIJ

### 2.3.1. Opća svojstva kadmija

Kadmij (Cd) je teški, prijelazni metal 12. skupine plavo-bijele boje koji se dobiva iz prirodnih izvora. Naziv za kadmij dolazi od latinske riječi *cadmia* koja je bila naziv za kalamín tj. smjesu dvije cinkove rude, karbonata i silikata. Mekan je te je po svojim svojstvima vrlo sličan ostalim elementima 12. skupine kao što su cink i živa. U prirodi se nalazi osam izotopa kadmija dok je najzastupljeniji kadmij 114 i 112. Cd-113 je radioaktivni izotop koji ima najduži životni vijek od svih izotopa [3]. Često se zbog sličnih svojstava povezuje s cinkom, jer oba elementa imaju po dva slobodna s elektrona izvan popunjene d ljuske. U prirodi se također često pojavljuju zajedno u primjesama.  $\text{Cd}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  ioni su slični  $\text{Mg}^{2+}$  ionima te zajedno tvore mnoge izomorfne soli.

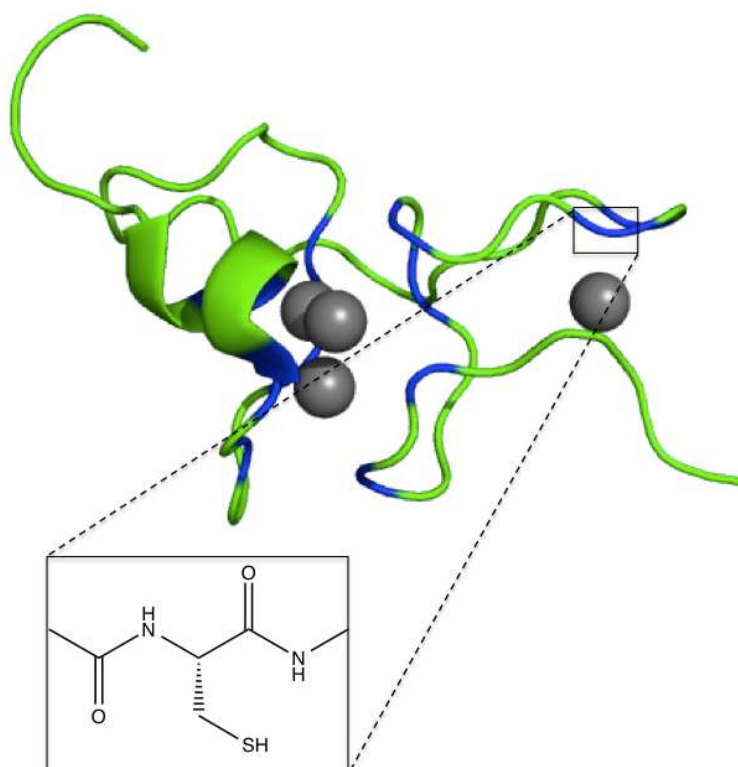
U vodenim otopinama tvore komplekse s koordinacijskim brojem 4 i 6, a najčešći ligandi su amonijak, cijanid i halogenidi [25]. Koncentracija kadmija u Zemljinoj kori je mala te iznosi  $1,8 \times 10^{-5} \%$ . Dobiva se kao nusprodukt u proizvodnji cinka i olova jer se u prirodi u najčešće pojavljuje u sulfidnim rudama cinka i olova. Može se i rjeđe pronaći u obliku samostalne rude grinokit (CdS). Dobiva se elektrolitskim i suhim dobivanjem cinka kao nusprodukt. U procesu suhog dobivanja iz cinkovih ruda kadmij se loše reducira u reakciji te isparava jer ima niže vrelište od cinka. Kadmij se destilira u mufole, posude od vatrostalnog stakla i prevodi u kadmijev oksid (CdO). Dobija se cinkov prah koji sadrži CdO te se on u manjim mufolama miješa s koksom i ponovno destilira. Kadmij se izdvaja procesom kondenzacije, djelomično u obliku metala, a drugim dijelom u obliku praha. Kako bi se dobila veća čistoća metala u iznosu od 99,5 % kadmijem obogaćen prah ponovno se destilira s koksom pri višoj temperaturi [4].

### 2.3.2. Ekotoksikologija kadmija

Kadmijev ciklus u okolišu je kompleksan te ovisi o brojnim procesima kojima je moguće manipulirati kako bi se smanjila njegova akumulacija u okolišu, a samim time i njegovo dospijevanje u hranu koja se svakodnevno konzumira. Istraživanje 1980-ih u Rothamstedu, UK [25] je pokazalo da kadmij u tlo najčešće dospijeva iz atmosfere uslijed velike industrijske aktivnosti u to vrijeme. U drugim dijelovima svijeta gdje industrijalizacija nije glavni uzrok zagađenja, neki od mogućih zagađivača su produkti agrikulture poput gnojiva, bio-kemijskih izmjenjivača tla i otpadnih bio-krutih tvari [25]. Procijenjeno je da godišnje  $3 \times 10^3$  tona kadmija dospije u atmosferu te je 90 % tog iznosa uzrokovano ljudskim faktorom. Ostali izvori onečišćenja uključuju talionice cinka gdje se kadmij dobiva kao nusprodukt, stari rudnici olova, cinka i kadmija, prirodni izvori škriljevca s morskog dna [4]. U prirodne izvore kadmija u ekosustavu ubrajaju se šumski požari, otpadne vode, erupcije vulkana i proces starenja stijena [28.] Put kadmija i drugih teških metala u tlu ovise o više procesa, najvažniji je ravnoteža između apsorpcije tla, upijanja vode i propusnosti te sposobnosti biljke da upija tvari iz tla. Na te procese također utječu i redoks ravnoteža, pH, udio organskih tvari u tlu, gline, karbonata, hidroksida i slično. Stoga će se koncentracije kadmija uvelike razlikovati u tlima koja su namijenjena samo za poljoprivredu i primjerice tla u šumi [25]. Jedan od glavnih problema je kontaminacija stočne hrane kadmijem putem zagađivanja okoliša ispušnim plinovima i industrijskim procesima te prirodnim putem kada ga biljke apsorbiraju kroz korijen ukoliko rastu na tlu s visokim koncentracijama teških metala. Uobičajene propisane koncentracije kadmija u tlu prema propisima Republici Hrvatskoj su 0,1 – 1 mg Cd/kg tla. Koncentracije kadmija u većini slučajeva ne prelaze vrijednosti iznad 1 mg/kg. Propisane vrijednosti kadmija u tlu koje preporuča EU su do 3 mg/kg. Najkritičnijim područjima po koncentracijama kadmija u tlu smatraju se središnja Europa i Japan [4].

### 2.3.3. Utjecaj na biljke

U slučaju izloženosti biljaka kadmiju dolazi do različitih promjena u staničnim procesima i funkcijama. Zbog svoje veće topljivosti u odnosu na ostale metale u skupini, kadmij se akumulira u biljkama. U doticaju s većim koncentracijama može doći do poremećaja funkcije ionskih kanala, redoks ravnoteže, antioksidativne aktivnosti, smanjenja fotosintetske aktivnosti biljke, promjene statusa vode, te do smanjenja rasta i proliferacije [28]. Kadmij također može imati negativan utjecaj na prijenos mineralnih tvari, uzrokovati osmotski stres, prekomjernu proizvodnju ROS i smanjiti provodljivost vode u listovima što dovodi do oštećenja biljke. Zbog povećane koncentracije ROS-a dolazi do oštećenja staničnih membrana i organela. Kako bi ušao u biljku, kadmij prelazi iz fiksnog u mobilni oblik i taj je proces se omogućen smanjenjem pH vrijednosti tla [26]. Kadmij je u tlu prisutan u obliku iona ili kao kompleks s drugim ionima kao što su  $\text{CdCl}^{3-}$ ,  $\text{Cd}(\text{HS})_4^{2-}$ ,  $\text{Cd}(\text{OH})^{3-}$  i  $\text{Cd}(\text{OH})_4^{2-}$  u anionskom obliku te kationski oblici  $\text{CdCl}^+$ ,  $\text{CdHS}^+$ ,  $\text{CdHCO}_3^+$ ,  $\text{CdOH}^+$ . Akumulacija kadmija u korijenju biljaka ovisi o njegovoj koncentraciji u tlu te o samom tipu biljke. Dokazano je da kukuruz (*Zea mays* L.) može akumulirati više kadmija u staničnim stjenkama u odnosu na grah (*Vicia faba* L.) [26]. Biljke također kao i sisavci posjeduju metalotioneine. To su neenzimski, unutarstanični proteini bogati cisteinom (Cys) male molekulske mase. Razlika u biljnom metalotioneinu je što sadrži manji udio cisteina, ima manju molekulsku masu i značajke kompleksa metal-tiol [27]. Biljke sa sposobnošću akumulacije i mogućnosti stabilizacije kadmijevih spojeva dobivaju na sve većem značaju jer na taj način smanjuju zagađenje okoliša kadmijem [5].



Slika 5. Struktura metalotioneina pšenice [29].

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Kemikalije

Za pripremu svih reakcijskih smjesa, otopina i pufera korištena je deionizirana voda. Bile su upotrijebljene sljedeće kemikalije:

**Nitro-plavi tetrazolium klorid, NBT, 75  $\mu$ M**

**Etilendiamintetraoctena kiselina, EDTA, 0,1 mM**

**Kalij-fosfatni pufer, KPB, 50 mM, pH = 7,8**

**Otopina ksantina, C<sub>5</sub>H<sub>4</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, 10,8 mM**

**Natrijev hidoksid, NaOH, 1 mM**

**Otopina ksantin-oksidade, 0,05 U/mL**

**Tris/HCl pufer, 100 mM, pH = 8**

**Vodikov peroksid, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 5 mM**

**Gvajakol, C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>, 5 mM**

**Fosfatni pufer, (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), pH = 5,8**

**Trikloroctena kiselina, TCA, 0,1 % i 20 %**

**Tiobarbituratna kiselina, TBA, 0,5 %**

**Tekući dušik**

**Aceton, C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O, 100%**

**Magnezijev hidrogenkarbonat, Mg(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>**

### 3.2. Uzgoj biljnog materijala

Za potrebe ovog istraživanja bili su uzgajani kultivari kukuruza (*Zea mays* L.) linija 84-28A i OS 942, te njihov hibrid OS 404. Koncentracije kadmija koje su bile upotrijebljene u svrhu istraživanja su odabrane po uzoru na prethodno istraživanje (Anjum et al. [30]) i iznosile su 150 i 375  $\mu\text{mol/L}$  (Cd150 i Cd375). Dvije sjemenke kukuruza su posijane u plastične posude dimenzija 35 x 21 x 7 cm, u tri replike. Kontrola (K) nije bila tretirana kadmijem, dok su ostali uzorci bili tretirani odgovarajućim koncentracijama kadmija. Za sijanje je upotrebljeno 1 kg univerzalnog supstrata (Brill 5) uz dodatak 1100 g NPK koji je sadržavao elemente u tragovima: pH ( $\text{H}_2\text{O}$ ): 5,5-6,5, struktura je bila srednje fina. pH ( $\text{CaCl}_2$ ): 5,7, udio soli: 1,0 g/L, kalij ( $\text{K}_2\text{O}$ ): 190 mg/L, fosfor ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ): 150 mg/L. Po supstratu su raspršene otopine  $\text{CdCl}_2$  uz miješanje.

Posijani uzorci stavljeni su u uzgojnu komoru FITOCLIMA 12000 PLH (Aralab) pri sljedećim uvjetima: dan/noć interval od 16/8h, dnevna temperatura  $25^\circ\text{C}$ , vlaga 60%, noćna temperatura do maksimalno  $18^\circ\text{C}$ , relativna vlažnost zraka 75% te  $500 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Kako bi se nadoknadio izgubljeni udio vode posudama je svakog dana izmjerena masa te su biljke zalijevane ovisno o dobivenoj masi. Nadzemni dio biljke je nakon 28 dana uzgoja uzorkovan i pohranjen na temperature od  $-80^\circ\text{C}$ . Biljno tkivo i listovi su usitnjeni pomoću tekućeg dušika kako bi se dobio fini prah za potrebe daljnjih analiza.



Slika 6. Uzgoj kukuruza (foto: Vlatko Galić)



### 3.3. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmenta

U tubice kojima je prethodno određena masa stavljeno je oko 3 mg tkiva usitnjenog pomoću tekućeg dušika. Na odvagani uzorak je dodan 1 mL 100 % acetona i  $\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$ . Tijekom 24 sata pigmenti su ekstrahirani na  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Poslije ekstrakcije tubice su centrifugirane pri 18 000 g na  $4\text{ }^\circ\text{C}$  tijekom 15 minuta. Nakon centrifugiranja uzorcima spektrofotometrijski (Specord 40, Analytik Jena) izmjerene apsorbancije na valnim duljinama 470 nm, 645 nm i 662 nm. Za slijepu probu je upotrijebljen 100 % aceton. Koncentracije pigmenta su određene metodom po Lichenthaleru [31]. Upotrijebljene su slijedeće jednadžbe, uvršteni koeficijenti odgovarajući su za 100 % aceton kao otapalo:

$$\text{Chl } a = ( 11.24A_{661.6\text{nm}} - 2.04A_{644.8\text{nm}} ) \times V / (m \times 1000)$$

$$\text{Chl } b = ( 20.13A_{644.8\text{nm}} - 4.19A_{661.6\text{nm}} ) \times V / (m \times 1000)$$

$$\text{Chl } a+b = ( 7.05A_{661.6\text{nm}} + 18.09A_{644.8\text{nm}} ) \times V / (m \times 1000)$$

$$\text{Car} = ( 1000A_{470\text{nm}} - 1.90 \times ( 11.24A_{661.6\text{nm}} - 2.04A_{644.8\text{nm}} ) - 63.14 \times ( 20.13A_{644.8\text{nm}} - 4.19A_{661.6\text{nm}} ) ) \times V / (214 \times m \times 1000)$$

Pri tome je:

Chl *a* = Koncentracija klorofila a izražena u mg/g svježe tvari biljnog uzorka

Chl *b* = Koncentracija klorofila b izražena u mg/g svježe tvari biljnog uzorka

Chl *a+b* = Koncentracija ukupnog klorofila u mg/g svježe tvari biljnog uzorka

Car = Koncentracija karotenoida u mg/g svježe tvari biljnog uzorka

A = apsorbancija pri izmjerenoj valnoj duljini

V = volumen ekstrakta

m = masa svježe tvari biljnog uzorka

### 3.4. Određivanje razine lipidne peroksidacije

Razina lipidne peroksidacije određena je pomoću metode Verma i Dubey (2003) [32]. Mjerenjem razine reaktivnih tvari tiobarbiturne kiseline (TBARS) u tkivima moguće je odrediti aktivnost lipidne peroksidacije. Približno 0,2 g usitnjenog biljnog tkiva odvagano je i stavljeno u tubicu volumena 2 mL. Ekstrakcija se vrši dodatkom 1 mL 0,1 % trikloroacetne kiseline (TCA) koja je prethodno pripremljena otapanjem 0,1 g TCA u 100 mL destilirane vode na magnetnoj mješalici. Uzorak je 5 minuta centrifugiran na 6000 g pri temperaturi 4 °C. Volumen od 0,5 mL supernatanta je prebačen u tubicu s čepom na navoj te je dodan 1 mL tiobarbituratne kiseline TBA u TCA (0,5 % TBA otopljene u 20 % TCA). Reakcijska smjesa se promiješa na vortexu nakon čega slijedi inkubacija u vodenoj kupelji 30 minuta na 95 °C. Uzorci se stavljaju na led nakon inkubacije kako bi se zaustavila reakcija te se centrifugiraju na 18000 g 15 minuta na 4 °C. Dobiveni supernatanti se ispipetiraju u plastične kivete te im se izmjeri apsorbancija pri valnim duljinama od 532 i 600 nm. Rezultati su izraženi kao nmol/g svježe tvari biljnog uzorka.

### 3.5. Određivanje aktivnosti gvajakol-peroksidaze

Aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPOD) određena je pomoću metode Siegel, Galston (1967) [33] koja je temeljena na oksidaciji gvajakola u tetragvajakol u prisutnosti  $H_2O_2$ . Oko 0,5 g praha prethodno homogeniziranog biljnog tkiva odvagano je u tubicu od 2 mL. U kivetu je dodan 1 mL 100 mM Tris/HCl ekstrakcijskog pufera pH vrijednosti 8. Sve je promiješano na vorteksu i ekstrahirano tijekom 15 minuta na ledu. Uzorci su zatim centrifugirani 10 minuta na 18 000 g pri temperaturi od 4 °C. Reekstracija je ponovljena s 1 mL ekstrakcijskog pufera. Mjerenje aktivnosti provedeno je spektrofotometrijski pomoću čitača mikrotitarskih pločica na valnoj duljini 470 nm (Tecan, Spark), svake sekunde tijekom dvije minute. Reakcija se započinje dodatkom 200  $\mu$ L u 800  $\mu$ L reakcijske smjese koja je pripremljena iz 5 mM gvajakola i 5 mM vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) u 0,2 M fosfatnom puferu pH vrijednosti 5,8. Aktivnost GPOD-a izražava se preko koncentracije nastalog tetragvajakola tj. pomoću U jedinice aktivnosti GPOD po gramu proteina ( $U = GPOD \times g^{-1} \text{ proteina}$ ;  $U = \mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$ )

Aktivnost GPOD-a izračunata je korištenjem molarnog ekstinkcijskog koeficijenta ( $\epsilon = 15,83 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) te izražena kao jedinice (U) aktivnosti po gramu proteina ( $U = g^{-1} \text{ proteina}$ ) [2].

### 3.6. Određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost enzima superoksid-dismutaze (SOD) određena je spektrofotometrijski prema metodi Beauchamp i Fridovicha (1971) [35]. Aktivnost SOD se mjeri kao stupanj inhibicije redukcije nitroplavo tetrazolijeva klorida (eng. Nitro blue tetrazolium chloride, NBT) koji se reducira superoksidnim radikalom nastalim u sustavu ksantin/ksantin oksidaza. Ksantin-oksidaza oksidira ksantin pri čemu nastaje mokraćna kiselina te superoksidni anion. Nastali superoksidni anion reducira NBT. Ovisno o prisutnoj koncentraciji, SOD će u određenoj mjeri inhibirati taj proces redukcije reagirajući sa superoksidnim anionom. Reakcijska smjesa sastojala se od 75  $\mu\text{M}$  NBT i 0,1 mM etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA) u 50 mM kalij-fosfatnom puferu (KPB), pH vrijednosti 7,8. Otopina ksantina koncentracije 10,8 mM pripremljena je u 1 mM NaOH, uz miješanje i grijanje na temperaturi od 70 °C do potpunog otapanja ksantina. Otopina (0,05 U/ml) ksantin-oksidaze pripremljena je u 50 mM kalij-fosfatnom puferu. Sve su otopine dodane u jažice mikrotitarskih pločica prema Tablici 1. apsorbancija je mjerena na valnoj duljini od 560 nm na čitaču mikrotitarskih pločica (Tecan, Spark).

Tablica 1. Postupak ispunjavanja jažica mikrotitarske pločice

	Slijepa proba/ $\mu\text{L}$	Neinhibirana reakcija/ $\mu\text{L}$	Uzorak/ $\mu\text{L}$
Reakcijska smjesa	165	165	165
Ksantin	15	15	15
KPB, pH 7,8	20	10	-
UZORAK	-	-	10
XOD	-	10	10

Postotak inhibicije izračunava se prema formuli:

$$\% \text{ inhibicije} = \frac{\Delta A_{560\text{nm}/\text{min}} \text{Neinhibirana} - \Delta A_{560\text{nm}/\text{min}} \text{Inhibirana}}{\Delta x \Delta A_{560\text{nm}/\text{min}} \text{Neinhibirana} - \Delta A_{560\text{nm}/\text{min}} \text{Slijepa proba}} * 100$$

$$U/m = \frac{\% \text{inhibicije} * df * V_e}{50\% * 0,05} * \frac{V_e}{m}$$

Gdje je:

df = faktor razrjeđenja originalnog enzimskog ekstrakta

0.05 = volumen enzimskog ekstrakta izražen u mL upotrijebljen za enzimsku reakciju

V<sub>e</sub> = volumen ekstrakta

m = masa svježeg tkiva

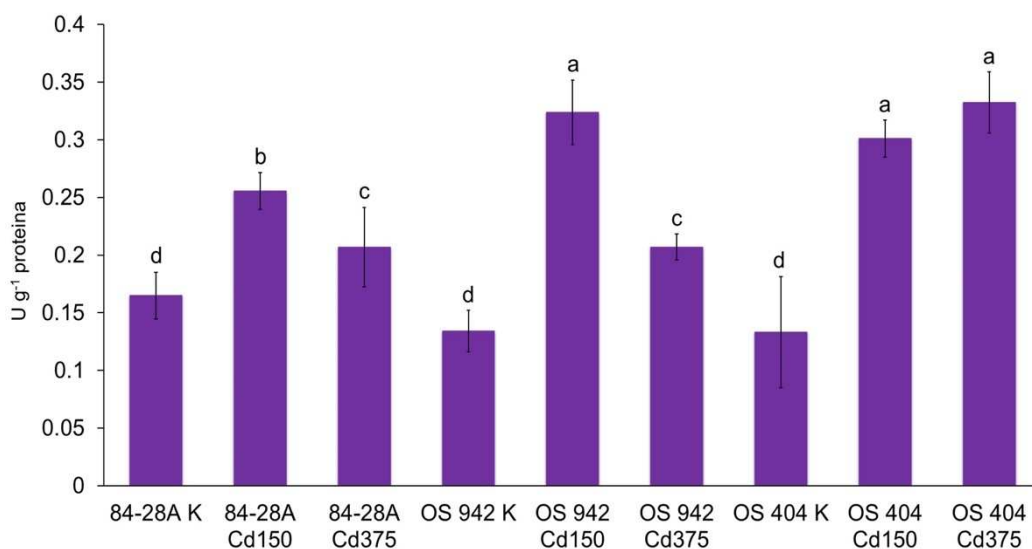
### 3.7. Statistička obrada podataka

Za obradu podataka upotrijebljen je statistički program R studio. Rezultati su izraženi u obliku srednjih vrijednosti  $\pm$  standardna devijacija (SD). Shapiro-Wilk testom je provjerena normalnost distribucije. Korištena je dvofaktorska analiza varijance (two-way ANOVA) s testom najmanje značajne razlike (LSD post *hoc test*) kako bi se utvrdile razlike između različitih kultivara, kontrole i tretmana. Zatim je upotrijebljena monofaktorijska analiza za rasčlanjivanje efekata značajnih interakcija u svrhu utvrđivanja genotipskih razlika. Ispitivanja su provedena na razini značajnosti od  $p < 0,05$ . Podaci su analizirani koristeći T-test, a statističke obrade podataka je napravljena pomoću Microsoft Excela.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Aktivnost gvajakol-peroksidaze

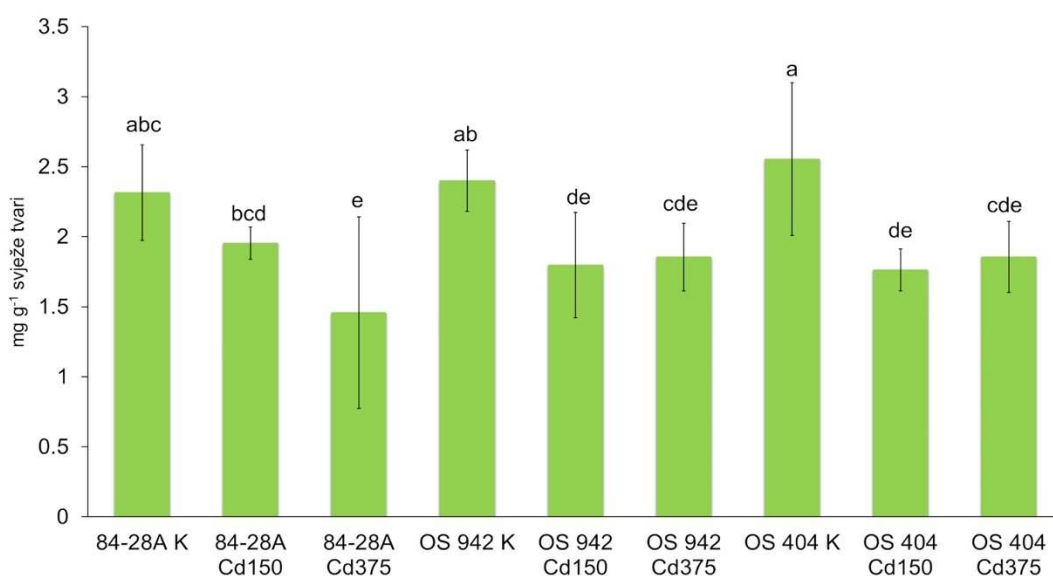
Najniža aktivnost GPOD-a je vidljiva u kontrolama (K). Porast aktivnosti zabilježen je u tretmanima sa 150  $\mu\text{mol/L}$  (Cd150). U liniji 84-28A došlo je do nešto manjeg porasta aktivnosti GPOD-a u tretmanu s Cd150 u odnosu na liniju OS 942 te hibrid OS404. Značajan porast aktivnosti GPOD-a u odnosu na kontrolu zabilježen je pri tretmanu kadmijem (Cd375) u linijama 84-28A i OS 942. Kod hibrida OS 404 je također došlo do porasta aktivnosti GPOD-a u odnosu na (K), ali nema značajne razlike u aktivnostima između tretmana (Cd150) i (Cd375). (Slika 7).



Slika 7. Aktivnost gvajakol peroksidaze (GPOD) u dvije linije (84-28A i OS 942) kukuruza (*Zea mays* L.) i njihovom hibridu (OS404) u kontroli (K) i uzorcima tretiranim dvjema koncentracijama kadmija: 150  $\mu\text{mol/L}$  (Cd150) i 375  $\mu\text{mol/L}$  (Cd375). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su LSD *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između skupina ( $p < 0,05$ ).

## 4.2. Određivanje koncentracije fotosintetskih pigmentata

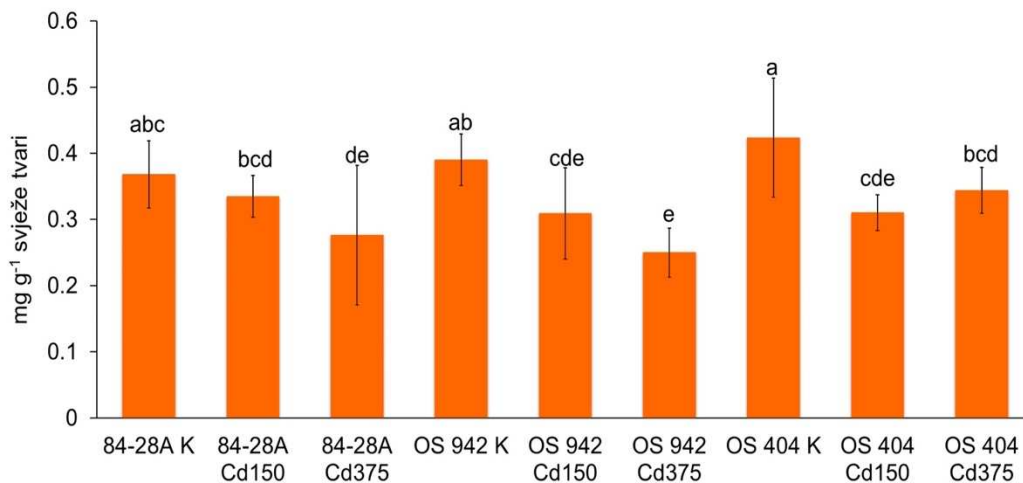
Analizom podataka je utvrđeno da je najveća koncentracija ukupnog klorofila prisutna u kontrolama (K). Iz dijagrama (Slika 8) je vidljivo da se koncentracija klorofila smanjila prilikom oba tretmana kadmijem (Cd150 i Cd375) u odnosu na kontrolu (K), osim u liniji 84-28A gdje u tretmanu (Cd150) nema značajne razlike u odnosu na kontrolu (K). Koncentracija klorofila nije se značajno razlikovala između dva tretmana kadmijem osim kod linije 84-28A gdje je zabilježen značajan pad koncentracije klorofila u odnosu na tretman (Cd150) i kontrolu (Slika 8.).



Slika 8. Ukupna koncentracija klorofila *a* i *b* u dvije linije (84-28A i OS 942) kukuruza (*Zea mays* L.) i njihovom hibridu (OS404) u kontroli (K) i uzorcima tretiranim dvjema koncentracijama kadmija : 150  $\mu\text{mol/L}$  (Cd150) i 375  $\mu\text{mol/L}$  (Cd375). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su LSD *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između skupina ( $p < 0,05$ ).



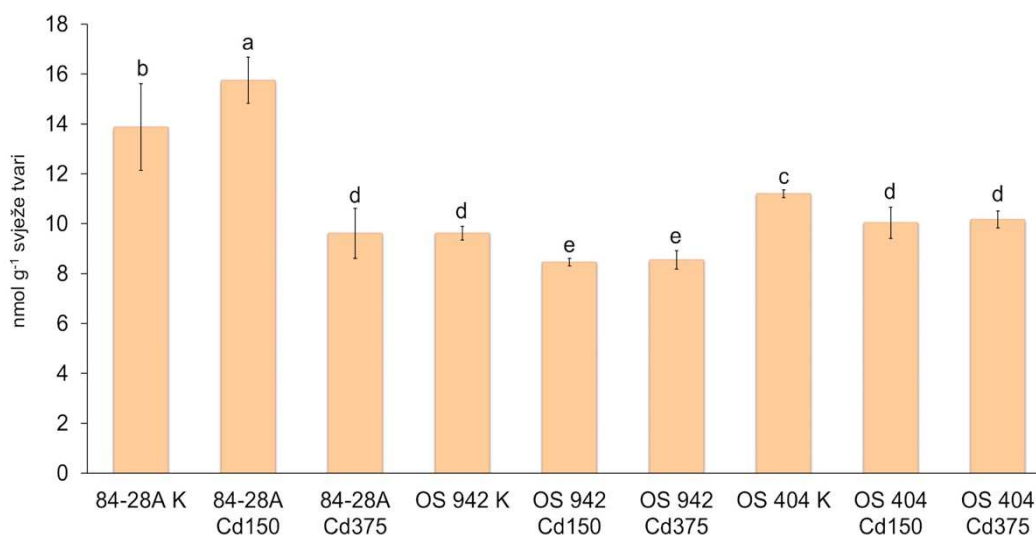
Obradom podataka utvrđeno je da su najveće koncentracije karotenoida prisutne u kontrolama (K). U tretmanu kadmijem (Cd150) došlo je do pada koncentracije karotenoida u linijama 84-28A i OS 942 te njihovom hibridu OS 404 u odnosu na kontrolu. Nakon tretmana kadmijem (Cd375) u svim linijama se koncentracija karotenoida značajno smanjila u odnosu na kontrolu. U linijama 84-28A i OS 942 nema statistički značajne razlike pri tretmanu višom koncentracijom kadmija (Cd375) u odnosu na tretman nižom koncentracijom kadmija (Cd150) (Slika 9).



Slika 9. Koncentracija karotenoida linije (84-28A i OS 942) kukuruza (*Zea mays* L.) i njihovom hibridu (OS404) u kontroli (K) i uzorcima tretiranim dvjema koncentracijama kadmija : 150  $\mu\text{mol/L}$  (Cd150) i 375  $\mu\text{mol/L}$  (Cd375). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su LSD *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između skupina ( $p < 0,05$ ).

### 4.3. Određivanje lipidne peroksidacije

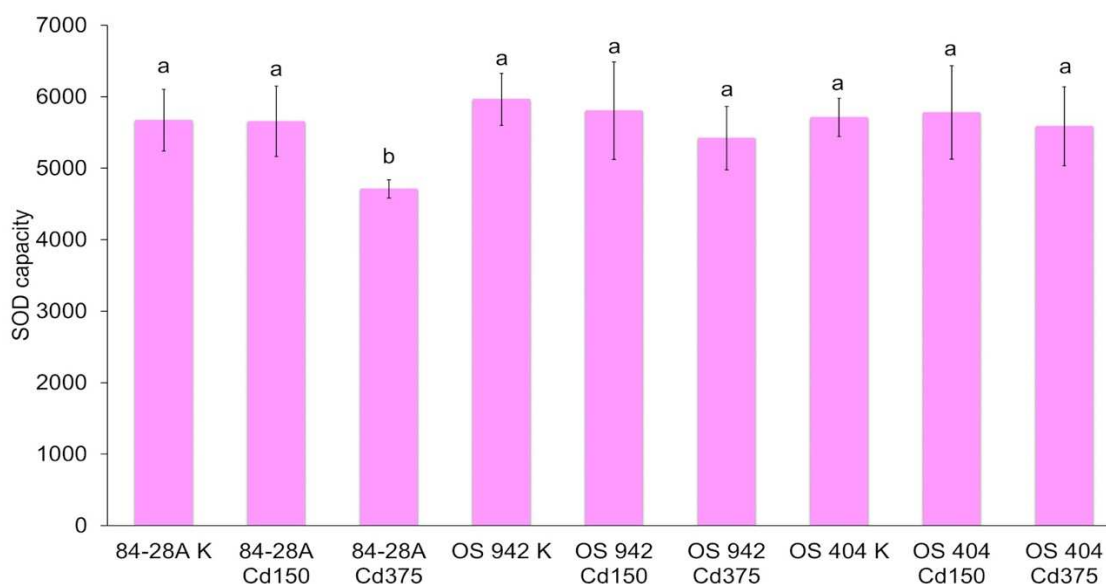
Lipidna peroksidacija u kukuruзу je praćena mjerenjem promjena koncentracije TBARS. Iz rezultata je vidljivo da je najveća koncentracija TBARS u linijama OS 942 i OS 404 zabilježena u kontrolama (K) u odnosu na oba tretmana. U obje linije između (Cd150) i (Cd375), nisu uočene statistički značajne razlike. U liniji 84-28A, najveća koncentracija TBARS zabilježena je na tretmanu Cd 150, a najmanja vrijednost na tretmanu kadmijem pri koncentraciji 375  $\mu\text{mol/L}$  (Cd375) (Slika 10).



Slika 10. Koncentracije reaktivnih tvari tiobarbiturne kiseline (TBARS) u tkivima linije (84-28A i OS 942) kukuruза (*Zea mays* L.) i njihovom hibridu (OS404) u kontroli (K) i uzorcima tretiranim dvjema koncentracijama kadmija : 150  $\mu\text{mol/L}$  (Cd150) i 375  $\mu\text{mol/L}$  (Cd375). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su LSD *post hoc* testom. Različita slova oznaćavaju statistički znaćajne razlike između skupina ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4. Određivanje specifične aktivnosti superoksid dismutaze

Istraživanjem je utvrđeno da nije došlo do nikakve značajne promjene u specifičnoj aktivnosti superoksid dismutaze u linijama 84-28A i OS 942 kukuruza te njihovom hibridu OS 404. Pad aktivnosti vidljiv je samo u tretmanu kadmijem više koncentracije (Cd375) u liniji 84-28A u odnosu ostale uzorke (Slika 11).



Slika 11. Specifična aktivnost superoksid dismutaze u linijama (84-28A i OS 942) kukuruza (*Zea mays* L.) i njihovom hibridu (OS404) u kontroli (K) i uzorcima tretiranim dvjema koncentracijama kadmija : 150  $\mu\text{mol/L}$  (Cd150) i 375  $\mu\text{mol/L}$  (Cd375). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su LSD *post hoc* testom. Različita slova označavaju statistički značajne razlike između skupina ( $p < 0,05$ ).

## 5. RASPRAVA

Nakupljanje teških metala u organizmu dovodi do prekomjernog stvaranja ROS-a koji su jedni od glavnih uzročnika oksidacijskog stresa. Među ROS je  $O_2^{\cdot -}$  koji prelazi u  $O_2$  i  $H_2O_2$ . Pomoću Gvajakol peroksidaze vodikov peroksid može biti direktno ili indirektno preveden u  $H_2O$  i  $O_2$  čime se sprječavaju njegove negativne posljedice. Aktivnost GPOD-a direktno je povezana s održavanjem niskih koncentracija  $H_2O_2$  [34]. Prema tome sposobnost biljke da se opire oksidacijskom stresu može se utvrditi mjerenjem aktivnosti nespecifičnih peroksidaza koje razgrađuju  $H_2O_2$ . [35].

Iz rezultata ovog istraživanja vidljiv je porast aktivnosti GPOD-a u tretmanima Cd150 u odnosu na kontrole. Vujčić i sur. [35] u svom istraživanju također navode porast koncentracije GPOD-a uslijed izloženosti vodene leće (*Lemma minor* L.) i luka (*Allium cepa* L.) niskim koncentracijama teških metala iz Zagrebačkih otpadnih voda. Pokazalo se kako su teški metali iz otpadnih voda imali negativan utjecaj na rast vodene leće što je praćeno i smanjenjem broja stanica u određenim staničnim fazama u odnosu na kontrolu [35]. Istraživanje Šarec i sur. [36] pokazalo je da je djelovanje metala  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  i  $Hg^{2+}$  na korijen graška (*Pisum sativum* L.) dovelo do značajnog povećanja aktivnosti GPOD-a. Demirevska-Kepova i sur. [37] izvjestili su o povećanju aktivnosti GPOD-a prilikom tretiranja ječma različitim koncentracijama  $Cu^{2+}$  i  $Mn^{2+}$ . Utvrdili su da je povećanje aktivnosti GPOD-a odgovor viših biljaka na toksične koncentracije metala [37]. Povećana aktivnost gvajakol-peroksidaze može ukazivati na povećanu produkciju ROS-a u stanici. Nadalje, povećanje aktivnosti može biti reakcija na oksidativnu štetu prouzročenu teškim metalima i/ili uobičajeni odgovor na različite tipove stresa [35].

Fotosintetski pigmenti klorofili i karotenoidi važni su za proces fotosinteze. Teški metali utječu na biosintezu fotosintetskih pigmenata što dovodi do smanjene akumulacije pigmenata u biljkama. Takva pojava može se zamijetiti tijekom faze rasta novih listova jer tada dolazi do aktivne sinteze pigmenata. Također dolazi do supstitucije  $Mg^{2+}$  iona s metalnim ionima različitih teških metala uključujući i  $Cd^{2+}$ , što se pokazalo kao uzrok poremećaja u procesu fotosinteze [35].

Našim istraživanjem utvrđeno je smanjenje koncentracije klorofila prilikom tretmana kadmijem Cd150 u odnosu na kontrolne uzorke i odstupanje u liniji 84-28A gdje nema značajne razlike. Istraživanje Kupper i sur. 1998. pokazalo je da se zamjenom središnjeg magnezijevog iona u molekuli klorofila s atomom olova sprječava sakupljanje svjetlosti čime se onemogućava fotosinteza [38].

U istraživanju Vujčić i sur. [35] je primijećeno i smanjenje koncentracije klorofila *a* i *b* te karotenoida u listovima vodene leće (*Lemna minor* L.). Mysliwa -Kurdziel i sur. [39] u svom istraživanju primijetili su inhibiciju biosinteze klorofila primarno uzrokovanu utjecajem kadmija. Inhibicija biosinteze klorofila i ostalih fotosintetskih pigmenata rezultirala je manjom koncentracijom pigmenata u biljkama. Nadalje, isto istraživanje je pokazalo da promjene koncentracije klorofila uzrokovane tretmanom teškim metalima jako ovise o fazi rasta i razvoja biljke koja je tretirana kadmijem. Tako je kadmij imao veći utjecaj na promjenu koncentracije klorofila kod starijih listova biljke koji su već imali pravilno raspoređene stanične membrane u odnosu na one u razvoju. Promjene su primijećene kod listova u razvoju tek kada su bili dugotrajno izloženi kadmiju.

Nadalje, ionska izmjena koja će se odvijati unutar molekula klorofila ovisi o intenzitetu svjetlosti koja dopire do biljke. Pri slabom osvjetljenju svi  $Mg^{2+}$  ioni su dostupni za ionsku izmjenu sa ionima teških metala. Kompleksi koji nastaju u kombinaciji s ionima teških metala su stabilniji u odnosu na magnezijeve komplekse i otporniji [36]. Smanjenje učinkovitosti fotosinteze može biti posljedica smanjene koncentracije fotosintetskih pigmenata što je povezano s inhibicijom njihove sinteze. Izloženost teškim metalima uzrok je smanjene koncentracije klorofila i prosječnog broja struktura grana u kloroplastima. Utvrđeno je da osjetljivost fotosintetskog aparata ovisi o starosti biljke i trajanju izloženosti nekom teškom metalu [35].

Značajno smanjenje ukupne koncentracije karotenoida vidljivo je u obje linije i njihovom hibridu pri tretmanima kadmijem Cd375, dok je najveći pad vidljiv u linijama 84-28A i OS 942 pri istom tretmanu. Mysliwa -Kurdziel i sur. [39] u svom istraživanju su također primijetili da kadmij utječe na smanjenje koncentracije karotenoida i to uglavnom beta-karotena [36]. U istraživanju Borščak i sur. [9] utvrđen je pad koncentracije karotenoida uslijed izloženosti maslačka (*Taraxacum officinale* Weber) antropogenim utjecajima. Isto istraživanje je pokazalo smanjenje antioksidativne aktivnosti biljke uslijed pada koncentracije karotenoida i klorofila.

Ovo istraživanje je pokazalo da je došlo do smanjenja lipidne peroksidacije (LP) uslijed tretiranja kadmijem. Prilikom niske stope LP, stanice aktiviraju signalne puteve i antioksidativne sustave kako bi se povećala razina antioksidativnih proteina. Povećanjem LP ne mogu se popraviti oštećenja membrana i druga oksidativna oštećenja te dolazi do apoptoze ili nekroze što dovodi do molekularnih oštećenja u stanici, samim time i ubrzanog starenja [40]. U istraživanju na različitim sortama pšenice, Kaur i Asthir, [40] uvidjeli su da smanjena koncentracija TBARS-a ukazuje na manju oksidativnu štetu nastalu na membrani, a time i bolju toleranciju na stres. Također su utvrdili kako antioksidativni sustav kod genotipova s visokim koncentracijama TBARS-a ne može regulirati količinu stresa u dovoljnoj mjeri.

Najniža promjena koncentracije TBARS-a nastala je na kultivarima linije OS 942 pri tretmanu kadmijem 375  $\mu\text{mol/L}$  (Cd375) u odnosu na kontrolu. Taj podatak ukazuje da linija OS 942 ima najveću toleranciju na stres. Smanjenje LP također može biti indikator povećanja aktivnosti drugih nespecifičnih peroksidaza. U nekih biljaka poput kvinoje je primijećen porast LP, ali istodobno i porast aktivnosti enzima što ukazuje na neučinkovitost antioksidacijskog sustava i nemogućnost adekvatne zaštite od oksidativnog stresa [34]. U svom radu A.Vuković [34] navodi da je tretman selenatom uzrokovao porast aktivnosti antioksidacijskih enzima askorbat- peroksidaze i GPOD-a, te smanjenje količine  $\text{H}_2\text{O}_2$  i razine lipidne peroksidacije (LPO). Iz naših podataka o aktivnosti GPOD-a i lipidnoj peroksidaciji vidljivo je kako je došlo do odstupanja parametara i porasta LP u liniji 82-28A pri tretmanu kadmijem (Cd150) te do povećanja aktivnosti GPOD-a, što potvrđuje tezu o netolerantnosti ove linije na stres uzrokovan teškim metalima. Vuković u svom istraživanju ukazuje kako je u većini tretmana Selen smanjio intenzitet LP što ukazuje na zaštitnu ulogu selena u održavanju biomembrana i aktivan antioksidacijski sustav koji uspješno održava količinu  $\text{H}_2\text{O}_2$ . [34]. Istraživanje Szabados, Savoure i sur, 2010. je pokazalo kako prolin ima sposobnost smanjiti produkciju ROS-a u gljiva i kvasca te da na taj način sprječava apoptozu, dok kod algi koje su tretirane teškim metalima smanjuje učinak lipidne peroksidacije [41], istraživanje Malović i sur. [5], koje je prethodilo ovome, ukazalo je da kadmij utječe na povećanje aktivnosti prolina u tretmanima Cd150 što ukazuje na mogućnost da je povećana koncentracija prolina rezultirala smanjenjem lipidne peroksidacije.

Naše istraživanje nije pokazalo značajne razlike u aktivnosti SOD-a između linija 84-28A i OS 942 pri tretmanima kadmijem (Cd150) i (Cd 375) (Slika 11). Značajne razlike u aktivnosti SOD-a također nisu primijećene ni u istraživanju Antunović i sur. [17] što ukazuje na potrebu za razmatranjem i ostalih izmjerenih parametara kao što su GPOD, LP, karotenoidi, klorofili.

Dosadašnja literatura navodi kako je SOD enzim koji se prvi aktivira u uvjetima oksidacijskog stresa [17]. SOD katalizira razgradnju ROS-a na manje toksičan vodikov peroksid i kisik. Istraživanja pokazuju značajan porast aktivnosti SOD-a prilikom oksidacijskog stresa što se u ovom istraživanju nije pokazalo kao slučaj. U uvjetima hiperprodukcije ROS-a uglavnom dolazi do povećanja aktivnosti peroksidaza. Povećanje aktivnosti GPOD-a može ukazivati na mogućnost peroksidaza da preuzmu aktivnost prilikom oksidacijskog stresa nastalog utjecajem teških metala [26]. Pretpostavka je da je u ovom istraživanju upravo GPOD preuzeo aktivnost u odnosu na SOD. Nadalje, jedan od mogućih ishoda jest da je SOD reagirao prije vremena kada je izvršeno mjerenje stoga nije bilo moguće zabilježiti promjene aktivnosti u trenutku mjerenja.

## 6. ZAKLJUČAK

Ovo istraživanje je pokazalo da kadmij utječe na biokemijske pokazatelje stresa kod kukuruza (*Zea mays* L.). Povećanje aktivnost gvajakol peroksidaze primijećeno je u linijama 84-28A i OS 942 te njihovom hibridu OS 404 u tretiranim s Cd150. Iznimka je hibrid OS 404 gdje je uzorak tretiran s Cd375 pokazao veću vrijednost u odnosu na uzorak tretiran s Cd150. Povećanje aktivnost gvajakol-peroksidaze ukazuje na povećanu produkciju ROS-a u stanici te na oksidativnu štetu prouzročenu teškim metalima. Pad koncentracije klorofila praćen je padom koncentracije karotenoida. Smanjeni udio klorofila vidljiv je u linijama 84-28A i OS942 te njihovom hibridu OS 404 pri tretmanu s Cd150, dok je najveći pad bio u liniji 84-28A pri tretmanu s Cd375. Kod karotenoida je primijećen značajan pad koncentracije u linijama 84-28A i OS942 pri tretmanu Cd375 dok je najveći pad bio kod hibrida OS 404 pri tretmanu s Cd150. Nadalje, smanjenje antioksidativne aktivnosti biljke može biti posljedica pada koncentracije karotenoida i klorofila. Također je utvrđeno da smanjenje koncentracije klorofila utječe na učinkovitost fotosintetskog aparata i smanjenje broja kloroplasta. Lipidna peroksidacija praćena je mjerenjem promjene koncentracije reaktivnih tvari tiobarbituratne kiseline (TBARS) u tkivima kukuruza te je jasno vidljivo sniženje koncentracije TBARS-a u liniji OS 942 i OS 404, dok je u liniji 84-28A došlo do odstupanja i povećanja koncentracije TBARS-a pri tretmanu kadmijem Cd150. Utvrđeno je da je smanjenje LP pokazatelj aktiviranog antioksidacijski sustava biljke. Specifična aktivnost superoksid dismutaze nije pokazala nikakve značajne promjene u odnosu na kontrolne uzorke, ali u uzorku tkiva linije 84-28A tretiranog s Cd375 je vidljivo odstupanje, te dolazi do blagog pada aktivnosti. Pretpostavka je da je u ovom istraživanju upravo GPOD preuzeo aktivnost u odnosu na SOD te da zbog toga nije došlo do značajnih promjena aktivnosti SOD-a. Dobiveni rezultati ukazuju na značajan utjecaj kadmija na pokazatelje biokemijskog stresa kod kukuruza.



## 7. LITERATURA

- [1] Ž. Bajan, Oksidacijski stres u biljkama duhana( *Nicotiana tabacum* L.) izloženim nanočesticama srebra, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, diplomski rad, 2017; 2-5
- [2] A. Božić, Aktivnost Superoksid dismutase (SOD) u biljkama, Odjel za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, završni rad, 2022; 6-13
- [3] J. Emsley, Vodič kroz elemente, Izvori, Zagreb, 2005; 89-95
- [4] D. Drčić, G. Pavlović, Ekotoksikologija kadmija, TEDI 4 (2014), 66-76
- [5] M. Malović, Utjecaj kadmija na antioksidativnu aktivnost kukuruza (*Zea mays* L.), Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, diplomski rad, 2023;15-16, 33
- [6] A. Balatinac, Kukuruz (*Zea mays* L.) – morfološka obilježja, uzgoj i značaj, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, završni rad, 2021; 2-11
- [7] V. Kovačević, M.Rastija, Žitarice, Poljoprivredni fakultet Sveučilišta J. J. Strossmayera u Osijeku, Osijek, 2014, 125-143
- [8] <https://hol.lzmk.hr/clanak/oksidansi> (12.1.2024)
- [9] D. Borščak, Procjena biokemijskih parametara fiziološkog stanja maslačka (*Taraxacum officinale* Weber) u urbanoj sredini, Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, diplomski rad, 2020; 5-27
- [10] <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=3084> (12.1.2024)
- [11] I. T. Bujak, Radikalima potaknute peroksidacije i izomerizacije nezasićenih masnih kiselina, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu; doktorski rad, 2015; 7-9
- [12] H.Sies, Oxidative stress, Academic Press, Dusseldorf, 1985, 2
- [13] R. Mittler, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, Trends Plant Science 7 (2002), 405-406

- [14] P.Sharma, A. B. Jha, R.S. Dubey, M. Pessaraki, Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions, *Journal of Botany* **2012** (2012), 8-11
- [15] A. F. Miller, Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills, *Current Opinion In Chemical Biology*, **8** (2004) 163-168
- [16] <https://www.youtube.com/watch?v=KLrzfwCY3uY> (12.1.2024)
- [17] J. Antunović, Utjecaj ekstremnog zasušivanja na biokemijske i fiziološke značajke klijanaca ječma (*Hordeum vulgare* L.) uzgojenih pri slabom i jakom osvjetljenju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, doktorski rad, (2013) 20-28;56, 120-141
- [18] R.L. Heath, L.Packer, Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **125**, (1968)189-198
- [19] A. Valerija, Analiza materijalnih i konceptualnih modela u prehrani: karotenoidi, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, završni rad, 2021; 2-3
- [20] I. Ivanac, Procjena biokemijskih parametara fiziološkog stanja maslačka u ruralnim sredinama,, Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, diplomski rad, 2020; 7
- [21] A. Cvrtila, Fotosintetski pigmenti u listovima posidonije zadarskog akvatorija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, diplomski rad, 2015; 4-9
- [22] R. Willows, Chlorophylls, Plant Pigments and their Manipulation, *Annual plant reviews Blackwell Publishing* **14**, (2004), 23-56
- [23] D. Von Wettstein, S. Gough, C. Kannangara, Chlorophyll Biosynthesis. *The Plant Cell* **7**, (1995); 1039–1057
- [24] Slika 4. <https://i0.wp.com/pediaa.com/wp-content/uploads/2017/04/Difference-Between-Chlorophyll-A-and-B-1.png?w=364&ssl=1> (6.5.2024)
- [25] M.J. McLaughlin, B.R. Singh, Cadmium in soils and plants, Springer Science+Business Media, Dordrecht, 1999; 3-40, 97-100, 236
- [26] U. Zulfiqar, W. Jiang, W. Xiukang, Cadmium Phytotoxicity, Tolerance, and Advanced Remediation Approaches in Agricultural Soils, *Frontiers at plant science* **13**, (2022) 13-15

- [27] K.Poljak, Struktura i funkcija metalotioneina, Odjel za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, završni rad, 2018; 7-13
- [28] M. Franić, V.Galić, Z. Lončarić, D. Simić, Genotypic Variability of Photosynthetic Parameters in Maize Ear-Leaves at Different Cadmium Levels in Soil, *Agronomy* **10**, (2020); 986
- [29] Slika 5. <https://sites.williams.edu/bigchem/topics/metal-iron-storage-and-transport/metallothioneins/> (1.4.2024)
- [30] S. A. Anjum, M. Tanveer, S. Hussain, Cadmium toxicity in Maize (*Zea mays* L.): consequences on antioxidative systems, reactive oxygen species and cadmium accumulation, *Environmental Science and Pollution Research* **22**, (2015).
- [31] H. K. Lichtenthaler, Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes, *Methods Enzymol.* **148**, (1987); 350-382
- [32] S. Verma, R.S. Dubey, Leads toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants, *Plant Science* **164**, (2003) 645-655
- [33] B.Z. Siegel, W. Galston, The isoperoxidases of *Psium Sativum*, *Plant Physiology* **42**, (1967), 221-226
- [34] A.Vuković, Biokemijski i molekularni mehanizmi odgovora klijanaca pšenice na selen, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, doktorska disertacija, 2022; 15,26;100-136
- [35] V. Vujčić, Pokazatelji toksičnosti teških metala u vodenoj leći (*Lemna minor* L.) i luku (*Allium cepa* L.), Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu ,diplomski rad, 2008; 38-41
- [36] T. Šarec, Utjecaj mangana, kobalta i žive na oksidativni stres u korijenu i listu graška (*Pisum sativa*, L.), Odijel za biologiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, diplomski rad, 2012; 40-42
- [37] K. Demirevska- Kepova, L. Simova-Stoilova, Z. Stoyanova, R. Holzer, U. Feller, Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. *Environmental and Experimental Botany* **52**, (2002); 253-266
- [38] H. Küpper, F. Küpper, M. Spiller, Environmental relevance of heavy metal- substituted chlorophylls using the example of water plants. *J Exp Bot* **47**, (1996) 259-266

- [39] B. Mýśliwa–Kurdziel, M. N. V. Prasad, K. Strzalka, Photosynthesis in heavy metal stressed plants, *Heavy Metal Stress in Plants. From Biomolecules to Ecosystems*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2004; 148-152
- [40] M. Marelja, Genotipske razlike u fiziološkom odgovoru klijanaca kukuruza na zasušivanje, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Diplomski rad, 2020; 3-19
- [41] L. Szabados, A. Savoure, Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science* **15**, (2010); 91-92

## 8. ŽIVOTOPIS AUTORA

### **Osobni podaci:**

*Ime i prezime: Annabella Kirch-Leto*

*Datum i mjesto rođenja: 20.09.1997. Osijek*

*e-mail: [klannabella@gmail.com](mailto:klannabella@gmail.com)*

### **Obrazovanje:**

*2021.-2024. Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku*

*Diplomski sveučilišni studij Kemija, istraživački smjer*

*2017.-2021. Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku*

*Sveučilišni preddiplomski studij kemije*

*2012.-2016 Tehnička škola i prirodoslovna gimnazija Ruđera Boškovića u Osijeku*

*smjer: Prirodoslovna gimnazija*