# Pokazatelji oksidacijskog stresa u duhanu (Nicotiana tabacum L.) izloženom talijevom (I) acetatu

**Prigorec, Tanja**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2015**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:209410

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-11**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

**Sveučilište u Zagrebu**
**Prirodoslovno–matematički fakultet**
**Biološki odsjek**

**Tanja Prigorec**

# POKAZATELJI OKSIDACIJSKOG STRESA U DUHANU (*Nicotiana tabacum* L.) IZLOŽENOM TALIJEVOM (I) ACETATU

**Diplomski rad**

**Zagreb, 2015.**

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za fiziologiju bilja na Botaničkom zavodu Biološkog odsjeka Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Branke Pevalek-Kozlina. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno–matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja profesor biologije i kemije.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

**Sveučilište u Zagrebu**
**Prirodoslovno-matematički fakultet**
**Biološki odsjek** **Diplomski rad**

# POKAZATELJI OKSIDACIJSKOG STRESA U DUHANU (*Nicotiana tabacum* L.) IZLOŽENOM TALIJEVOM (I) ACETATU

**Tanja Prigorec**
**Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska**

Oksidacijski stres uzrokovan metalima u biljaka se javlja kao sekundarna reakcija. Kao pokazatelje oksidacijskog stresa u izdancima duhana (*Nicotiana tabacum* L.) izloženim talijevom (I) acetatu pratila sam promjenu sadržaja proteina, vodikovog peroksida, malondialdehida i karbonila te promjenu aktivnosti enzima askorbat peroksidaze, pirogalol peroksidaze i katalaze. Biljke su tretirane s 2, 4, 20 i 40 μM Tl-acetata, 40 μM Tl-acetata i 40 μM K-acetata (kombinirani tretman), te 40 μM K-acetata koji je služio kao dodatna acetatna kontrola. Uzorci izdanaka duhana analizirani su nakon 3 dana. Sadržaj proteina, vodikovog peroksida i karbonila u odnosu na kontrolu se povećao dok se sadržaj malondialdehida nije značajno mijenjao. Aktivnost askorbat i pirogalol peroksidaze kao i aktivnost katalaze povećala se značajno u biljkama izloženim 2 μM i 4 μM Tl-acetata. Rezultati istraživanja pokazuju da talij izaziva oksidacijski stres u izdanku duhana, ali također ukazuju na učinkovitost antioksidacijskih mehanizama duhana pri različitim koncentracijama tog toksičnog metala upotrebljenim u ovom radu.

(34 stranica, 8 slika, 1 tablica, 51 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: duhan, oksidacijski stres, talijev (I) acetat
Voditelj: Prof. dr. sc. Branka Pevalek-Kozlina
Neposredni voditelj: Dr. sc. Marija Babić
Ocjenitelji:
Rad prihvaćen:

BASIC DOCUMENTATION CARD

**University of Zagreb**
**Faculty of Science**
**Division of Biology**

**Graduation Thesis**

# INDICATORS OF OXIDATIVE STRESS IN TOBACCO ( *Nicotiana tabacum* L. ) EXPOSED TO THALLIUM (I ) ACETATE

**Tanja Prigorec**
**Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia**

Oxidative stress in plants occurs as a secondary reaction to heavy-metals stress. In this work I analysed the change of protein content, hydrogen peroxide, malondialdehyde, carbonyls as well as activity of ascorbate peroxidase, pyrogallol peroxidase and catalase as indicators of oxidative stress in the shoots of tobacco (*Nicotiana tabacum L.*) exposed to thallium (I) acetate. Plants were treated with 2, 4, 20 and 40 μM Tl-acetate, 40 μM Tl-acetate and 40 μM K-acetate (combined treatment) and 40 μM K-acetate which served as an additional control of the acetate. Samples of tobacco shoots were analyzed after 3 days. The protein content, as well as hydrogen peroxide and carbonyl content, increased in relation to the control, while MDA content did not change. Ascorbate and pyrogallol peroxidase activity and catalase activity increased significantly in plants exposed to 2 μM and 4 μM Tl-acetate. The research results show that thallium causes oxidative stress in tobacco shoots, but also the efficiency of antioxidative mechanisms of tobacco at different concentrations of that toxic metal used in this work.

(34 pages, 8 figures, 1 table, 51 references, original in: croatian language)

Thesis deposited in the Central Biological Library
Key words: tobacco, oxidative stress, thallium (I) acetate
Supervisor: Dr. Branka Pevalek Kozlina, Prof.
Direct supervisor: Dr. Marija Babić
Reviewers:
Thesis accepted:

**SADRŽAJ**


**1. UVOD** 1

1.1. TALIJ 1

1.1.1. Usporedba talija i kalija 2

1.2. OKSIDACIJSKI STRES 2

1.2.1. Vodikov peroksid 3

1.2.2. Lipidna peroksidacija 4

1.2.3. Oksidacija proteina 5

1.3. ANTIOKSIDACIJSKI SUSTAV 6

1.3.1. Enzimski mehanizmi 6

1.3.1.1. Superoksid dismutaza 6

1.3.1.2. Peroksidaze 7

1.3.1.3. Katalaza 8

1.3.2. Neenzimski mehanizmi 8

1.3.2.1. Askorbinska kiselina 8

1.3.2.2. Glutation 9

1.3.2.3. Fenoli 9

1.3.2.4. Tokoferoli 9

1.3.2.5. Karotenoidi 10

**2. CILJ ISTRAŽIVANJA** 11

**3. MATERIJALI I METODE** 12

3.1. BILJNI MATERIJAL 12

3.1.1. Duhan (*Nicotiana tabacum* L.) 12

3.2. METODE 13

3.2.1. Uzgoj duhana u uvjetima *in vitro* 13

3.2.2. Određivanje sadržaja vodikovog peroksida 15

3.2.3. Određivanje sadržaja malondialdehida 15

3.2.4. Određivanje sadržaja karbonila 16

3.2.5. Određivanje sadržaja proteina 17

3.2.6. Određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima 17

3.2.6.1. Određivanje aktivnosti katalaze 18

3.2.6.2. Određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze 19

3.2.6.3. Određivanje aktivnosti pirogalol peroksidaze 19

3.2.7. Statistička obrada podataka 19

**4. REZULTATI** **20**

4.1. SADRŽAJ VODIKOVOG PEROKSIDA 20

4.2. SADRŽAJ MALONDIALDEHIDA 21

4.3. SADRŽAJ KARBONILA 22

4.4. SADRŽAJ PROTEINA 23

4.5. AKTIVNOST PEROKSIDAZA 24

4.5.1. AKTIVNOST KATALAZE 24

4.5.2. AKTIVNOST ASKORBAT PEROKSIDAZE 25

4.5.3. AKTIVNOST PIROGALOL PEROKSIDAZE 26

**5. RASPRAVA** **27**

**6. ZAKLJUČAK** **30**

**7. LITERATURA** **31**

# 1. UVOD

Biljke su prilagođene rastu, razvoju i razmnožavanju u određenom rasponu okolišnih uvjeta. Obzirom da su biljke sesilni organizmi na svojem su prirodnom staništu izložene različitim oblicima stresa i djelovanju različitih ekoloških čimbenika. Uzroci stresa mogu biti prirodni, ali i potaknuti ljudskim djelovanjem. U oba slučaja stres utječe na rast, razvoj i reprodukciju biljaka. Nepovoljni okolišni uvjeti koji najčešće uzrokuju stres su visoke i niske temperature, nedostatak ili suvišak vode u tlu, povišeni salinitet, povišena koncentracija teških metala, promjene pH vrijednosti tla, intenzitet svjetlosti te manjak kisika u tlu. Nepovoljni okolišni čimbenici uzrokuju oštećenja vitalnih molekula u biljnoj stanici kao i nastanak toksičnih molekula koje sekundarno razaraju osjetljive stanične molekule. Mnoge biljke uslijed prethodnog izlaganja stresnim uvjetima mogu povećati otpornost na stres i aklimatizirati se na nepovoljne uvjete okoliša. Takva aklimatizacija je različita od adaptacije koja podrazumijeva genetski uvjetovanu otpornost koja je rezultat selekcije tijekom mnogo generacija (Pevalek-Kozlina, 2003). Biljke su zbog nemogućnosti napuštanja staništa u nepovoljnim uvjetima razvile učinkovitu zaštitu u svrhu preživljavanja i obrane.

Akumulacija teških metala u prirodi je rezultat poljoprivrede i industrije. Teški metali koje biljka prima putem korjenovog sustava mogu inhibirati fiziološke procese što na kraju rezultira kržljavim rastom, klorozama i nekrozama.

## 1.1. TALIJ

Talij je otkrio engleski kemičar Wiliam Crookes 1861. godine. Naziv je dobio prema grčkoj riječi *thallos* koja označava propupalu zelenu grančicu, a karakterizira ga zelena linija u atomskom spektru (Schoer, 1984). Nalazi se u III A grupi periodnog sustava elemenata s atomskim brojem 81, relativnom atomskom masom 204,37, a budući da mu je gustoća 11,83 g/cm$^3$, uvršten je među teške metale.

Elementarni talij je mekan metal i može se rezati nožem. Plavo–bijele je boje, nema mirisa i okusa. Talij formira dvije vrste spojeva: monovalentne talo–spojeve i trovalentne tali–spojeve.

U Zemljinoj kori talij se može pronaći u tragovima u spojevima s bromom, klorom, fluorom i jodom (Galván-Arzate i Santamaría, 1998). Pojava talija u okolišu

povećala se kao posljedica različitih industrija. Izrazito je toksičan za ljude, životinje, biljke i mikroorganizme u jednovalentnom i trovalentnom obliku. Svojedobno se talij upotrebljavao kao insekticid i rodenticid. Sve do ranih godina 20. stoljeća talijeve soli su korištene u liječenju malarije, veneričnih bolesti, tuberkuloze te kožnih infekcija (Kazantzis, 2000). Danas se uglavnom koristi u termometrima za mjerenje niskih temperatura, fotoelektričnim ćelijama, cementu kao i u proizvodnji optičkih leća i lažnog dragog kamenja.

### 1.1.1. USPOREDBA TALIJA I KALIJA

Ionski radijus monovalentnog talijevog kationa iznosi 330 pm i sličan je ionskome radijusu kalijevog kationa koji iznosi 331pm (Logan, 1985). Zato talij može zamijeniti kalij u metaboličkim procesima jer stanična membrana ne razlikuje talij od kalija te prihvaća talij isto kao i kalij. U ljudi i životinja talij je u obliku jednovalentnog kationa pronađen u intracelularnim i ekstracelularnim tekućinama. Toksičnost jednovalentnog talija može biti efektivno ublažena kalijevim ionima pri sličnoj koncentraciji (Siegel i Siegel, 1975). Također, talij stvara komplekse sa sulfhidrilnim i fosfatnim ligandima pa se tako veže i sa sulfidrilnim skupinama proteina i enzima inaktivirajući ih.

## 1.2. OKSIDACIJSKI STRES

Aerobni organizmi koriste molekularni kisik ($O_2$) za disanje i oksidaciju hranjivih tvari čime dobivaju energiju potrebnu za život. U uvjetima oksidacijskog stresa dolazi do pojačanog stvaranja reaktivnih oblika kisika poput superoksidnog ($O_2^-$) i hidroksilnog radikala (·OH), singletnog kisika ($_1O_2$), i vodikovog peroksida ($H_2O_2$). Navedene molekule odnosno spojevi inaktiviraju enzime, denaturiraju proteine, oštećuju DNA i važne stanične komponente kao što su plazmatske membrane. U normalnim uvjetima reaktivni oblici kisika nastaju kao stalni produkti metabolizma a biljke ih uspješno neutraliziraju zahvaljujući djelovanju antioksidacijskog sustava. Stresna stanja dovode do povećanog stvaranja reaktivnih

oblika kisika koje antioksidacijski sustav više ne može u potpunosti ukloniti pa nastupa oksidacijski stres.

### 1.2.1. VODIKOV PEROKSID

Vodikov peroksid nastaje u peroksisomima i kloroplastima u reakcijama oksidacije (Del Rio i sur., 1992). Također nastaje u mitohondrijima biljaka u transportnom lancu elektrona i oksidacijskoj fosforilaciji (Braidot i sur., 1999). Kao jedan od reaktivnih spojeva kisika vodikov peroksid je prirodni produkt metabolizma biljaka te nastaje u neenzimskim i enzimskim reakcijama. Vodikov peroksid može nastati na nekoliko načina: oksalat oksidaza katalizira stvaranje vodikovog peroksida i ugljikovog dioksida iz oksalata u prisutnosti kisika (Bolwell i Wojtaszek, 1997), a amino oksidaza katalizira oksidaciju biogenih amina u aldehide uz oslobađanje amonijaka i vodikovog peroksida (Reggiani i Bertani, 1989).

Vodikov peroksid inaktivira brojne metaloenzime jer u prisutnosti metala formira visokoreaktivni hidroksilni radikal. Glavni štetni učinci vodikovog peroksida očituju se u poticanju lipidne peroksidacije i inaktivaciji enzima. Vodikov peroksid inaktivira Cu/Zn superoksid dismutazu (SOD) putem redukcije $Cu^{2+}$ u $Cu^{+}$ ione u reakcijskom središtu enzima. Razina $H_2O_2$ unutar stanice regulirana je enzimski peroksidazama i katalazama. Obje skupine enzima imaju ulogu u otklanjanju $H_2O_2$.

Osim štetnog djelovanja vodikov peroksid ima i pozitivnu ulogu. Naime, $H_2O_2$ je neutralna molekula pri pH vrijednosti ispod 10 te zbog toga može difundirati kroz biomembrane što mu omogućuje ulogu signalne molekule stresa (Inźe i Van Montagu, 2002) koja djeluje na aktivaciju gena čiji će produkti uspostaviti novi stabilni metabolizam u biljnom organizmu.

## 1.2.2. LIPIDNA PEROKSIDACIJA

Lipidna peroksidacija ukazuje na prisutnost oksidacijskog stresa u biljnom organizmu, do kojeg dolazi ukoliko je produkcija otrovnih spojeva kisika premašila mogućnosti mehanizama za njihovo uklanjanje (Jinmin i Huang, 2002). Tu sekundarnu reakciju na stres izazivaju primarni proizvodi stresa, a to su reaktivni oblici kisika.

Dvostruka lipidna membrana se sastoji od fosfolipida i glikolipida u kojima su lanci masnih kiselina vezani esterskom vezom na prvom i drugom ugljikovom atomu alkohola glicerola. Masne kiseline su posebno osjetljive na peroksidaciju. Njihova sinteza *de novo* zahtijeva mnogo energije pa je očuvanje membranskih lipida pomoću antioksidacijskog sustava najbolji način očuvanja membrana (Blokhina i sur. 2003).

Lipidna peroksidacija se zbiva u tri stadija: inicijacija, propagacija i terminacija. U prvom koraku hidroksilni radikal i singletni kisik reagiraju s metilenskom skupinom polinezasićene masne kiseline (PNMK) uz izdvajanje vodika s metilnenske skupine pri čemu nastaje peroksilni radikal (PNMK-OO$^{\bullet}$).

$$PNMK\text{-}H + X^{\bullet} \rightarrow PNMK^{\bullet} + X\text{-}H$$
$$PNMK^{\bullet} + O_2 \rightarrow PNMK\text{-}OO^{\bullet}$$

Peroksilni radikal je vrlo reaktivan i u drugom koraku reagira s drugom polinezasićenom masnom kiselinom.

$$PNMK\text{-}OO^{\bullet} + PNMK\text{-}H \rightarrow PNMK\text{-}OOH + PNMK^{\bullet}$$

Tada nastaju lipidni hidroksiperoksid (PNMK-OOH) i lipidni radikal (PNMK$^{\bullet}$) koji nastavlja lančanu reakciju (propagacija). Lanac reakcija završava kada reagiraju dva radikala stvarajući produkte koji nisu radikali. Slobodni radikali kisika mogu formirati i konjugirane diene masnih kiselina kidajući dvostruke veze u njima.

Lipidna peroksidacija se može zaustaviti neenzimskim i enzimskim sustavima. Tokoferol (vitamin E) važan je antioksidans koji zaustavlja lipidnu peroksidaciju popravljajući radikale masnih kiselina tako da donira vodikov kation radikalu lipida, a

kako time postaje i sam radikal za oporavak mu treba askorbinska kiselina (vitamin C) ili glutation. Tokoferol funkcionira u lipidnoj fazi membrane, a askorbat u hidrofilnoj fazi i njihovo je djelovanje sinergijsko (Blokhina i sur., 2003).

### 1.2.3. OKSIDACIJA PROTEINA

Endogeno nastali reaktivni oblici kisika reagiraju s različitim makromolekulama u stanici uzrokujući oksidacijski stres. Nastala oštećenja se akumuliraju tijekom vremena i smatra se da su jedan od razloga starenja organizama (Stadtman, 1992; Sohal i sur., 1993). Posljedice oksidacijskog stresa su modifikacije aminokiselina, fragmentacija peptidnih lanaca, promjena električnog naboja proteina i njihova povećana osjetljivost na proteolizu. Aminokiseline u peptidu se razlikuju i po osjetljivosti na napad reaktivnih oblika kisika koji se također razlikuju po svojoj reaktivnosti. Na relativnu osjetljivost proteina utječu primarna, sekundarna i tercijarna struktura proteina.

Unatoč kompleksnosti, neke generalizacije se mogu napraviti. Aminokiseline koje sadrže sumpor su vrlo osjetljive na oksidacijski stres jer aktivirani kisik može eliminirati vodikov atom iz cisteinskih ogranaka formirajući tiolni radikal koji se može unakrsno povezati s drugim istovjetnim radikalom stvarajući disulfidni most. Kisik se može vezati na metioninske ogranke stvarajući metionin sulfoksidne derivate (Farr i Kogoma, 1991). Ove reakcije su uz pomoć određenih enzima reverzibilne. Međutim, postoje i oblici djelovanja slobodnih radikala na proteine koji su ireverzibilni. Na primjer, oksidacija Fe-S središta superoksidom poništava funkciju enzima (Gardner i Fridovich, 1991).

Mnoge se aminokiseline ireverzibilno mijenjaju uslijed oksidacije proteina. Na primjer histidin, lizin, prolin, arginin i serin stvaraju karbonilne grupe (Stadtman, 1986). Karbonilizacija proteina inhibira ili mijenja aktivnost proteina te povećava osjetljivost na proteolizu. Sadržaj karbonilnih skupina često se koristi kao marker oksidacije proteina. Oksidacijska razgradnja proteina povećana je u prisutnosti metalnih kofaktora npr. željeza. Metal se veže na dvovalentni kation u aktivnom mjestu te reagira s vodikovim peroksidom dajući hidroksilni radikal ($OH^{\bullet}$) koji brzo oksidira aminokiselinski ogranak inaktivirajući enzim.

$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\bullet}$

## 1.3. ANTIOKSIDACIJSKI SUSTAV

Pojavom kisika u atmosferi došlo je do razvoja obrambenih mehanizama koji su održavali optimalnu razinu reaktivnih oblika kisika ili su popravljali oštećenja nastala njihovim djelovanjem. Budući da se reaktivni oblici kisika razlikuju po mjestu nastanka u stanici, reaktivnosti s pojedinim molekulama, topivosti i mogućnosti difuzije, biljci je potreban kompleksan antioksidacijski sustav obrane (Elstner, 1982; Smirnoff, 1993). Razinu štetnih reaktivnih oblika kisika kontroliraju enzimski i neenzimski mehanizmi.

Neenzimski mehanizmi obuhvaćaju antioksidanse male molekulske mase kao što su askorbat, glutation, fenoli i tokoferol. Antioksidansi su tvari koje sprječavaju oksidaciju drugih tvari, a u biološkim sustavima služe za neutralizaciju slobodnih radikala. Svi antioksidansi imaju sposobnost stabilizacije nesparenih elektrona i neutralizacije potencijalno štetnog djelovanja slobodnih radikala, a da pri tome sami ne postaju nestabilni.

Enzimski mehanizmi obrane uključuju aktivnost antioksidacijskih enzima superoksid dismutaze, katalaze i peroksidaza. Za regeneraciju molekula antioksidansa potreban je niz enzima, od kojih je jedan i glutation reduktaza. Uz njih postoje i enzimi za uklanjanje štetnih produkata lipidne peroksidacije (Blokhina i sur., 2003).

### 1.3.1. ENZIMSKI MEHANIZMI

#### 1.3.1.1. SUPEROKSID DISMUTAZA

Superoksid dismutaza (SOD) je prva linija obrane od reaktivnih kisikovih spojeva u stanici i katalizira dismutaciju superoksidnih radikala ($O_2^{\bullet -}$) na vodikov peroksid i molekularni kisik.

$2\ O_2^{\bullet -} + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Superoksid nastaje u svim staničnim odjeljcima u kojima je prisutan lanac elektrona i gdje se formira superoksidni radikal (Elstner, 1991). Fosfolipidne membrane su nepropusne za nabijene superoksidne molekule. Stoga je važno da se superoksid dismutaze nalaze u odjeljcima u kojima superoksid nastaje kako bi ga mogle razgraditi (Takahashi i Asada, 1983). Na temelju metalnih kofaktora superoksid dismutaze se dijele u četiri skupine: željezo (Fe SOD), mangan (Mn SOD), nikal ($Ni^{3+}$ SOD) i bakar-cink (Cu-Zn SOD) superoksid dismutaze. One se nalaze u različitim odjeljcima unutar stanice: Mn SOD se nalazi u mitohondrijima, Fe SOD u kloroplastima, a Cu-Zn SOD u kloroplastima i citosolu. Svaka SOD forma je nezavisno regulirana ovisno o stupnju stresa u pojedinom staničnom odjeljku. Ove četiri izoforme enzima mogu se odvojiti na temelju osjetljivosti na KCN ili $H_2O_2$ te elektroforezom u poliakrilamidnom gelu.

### 1.3.1.2. PEROKSIDAZE

Biljne peroksidaze su glikoproteini koji sadrže protohematin IX kao prostetičku skupinu. Ti enzimi kataliziraju oksidaciju staničnih komponenti (npr. fenolnih spojeva, askorbinske kiseline, glutationa i dr.) koristeći vodikov peroksid kao supstrat koji služi kao akceptor protona. Reakcije katalizirane peroksidazama uklanjaju suvišak vodikovog peroksida iz stanice pri čemu se peroksid reducira do vode. Peroksidaze se dijele u dvije skupine s obzirom na supstratnu specifičnost (Asada, 1992).

Prvoj skupini pripadaju askorbat peroksidaza (APX) i glutation peroksidaza, a njihova glavna funkcija je uklanjanje suviška $H_2O_2$ te lipidnih peroksida kako ne bi nastali jako reaktivni radikali koji oksidiraju brojne stanične komponente i na taj način uzrokuju oštećenja stanice. Peroksidaze za redukciju $H_2O_2$ koriste reducirajući supstrat, a to je u biljaka uglavnom askorbat. Askorbat peroksidaza je najvažnija za razgradnju $H_2O_2$ u citosolu te u stromi i tilakoidima kloroplasta. Da bi se reducirala jedna molekula $H_2O_2$ potrebne su dvije molekule askorbata, a produkt reakcije su dvije molekule vode i dvije molekule monodehidroksiaskorbata:

$$2 \text{ askorbat} + H_2O_2 \rightarrow 2 \text{ monodehidroksiaskorbat} + 2\ H_2O$$

Drugu skupinu čine nespecifične peroksidaze (POX) koje sudjeluju u procesima razgradnje auksina, zarastanja rana itd. Ove peroksidaze koriste vodikov

peroksid za različite oksidacijske reakcije, a kao donori elektrona mogu poslužiti različite molekule kao na primjer pirogalol i gvajakol.

#### 1.3.1.3. KATALAZA

Katalaza je tetramerni enzim koji sadrži hem skupinu, a katalizira dismutaciju vodikovog peroksida na molekularni kisik i vodu.

$$2\ H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2\ H_2O$$

Prisutna je u svim aerobnim eukariotima, a nalazi se u peroksisomima i glioksisomima. U peroksisomima uklanja vodikov peroksid koji nastaje oksidacijom masnih kiselina i fotorespiracijom. Katalaza može vodikov peroksid ukloniti na dva načina: direktnom dismutacijom ili oksidacijom alkohola, formalaldehida ili nitrita vodikovim peroksidom. Postoje tri glavne izoforme katalaze: KAT1, KAT2 i KAT3. Geni koji ih kodiraju nalaze se na različitim kromosomima, a njihova je ekspresija nezavisno regulirana (Scandalias, 1990). KAT1 i KAT2 se nalaze u peroksisomima i citosolu dok se KAT3 nalazi u mitohondrijima.

### 1.3.2. NEENZIMSKI MEHANIZMI

#### 1.3.2.1. ASKORBINSKA KISELINA

Askorbinska kiselina ili vitamin C je vitamin topljiv u vodi, prisutan u biljnim tkivima izuzev dormantnih pupova i sjemenaka (Córdoba i González-Reyes, 1994). Udio askorbinske kiseline veći je u mlađim tkivima biljke, a smanjuje se starenjem biljke i u uvjetima manje količine svjetlosti. U normalnim fiziološkim uvjetima većina askorbinske kiseline se nalazi u reduciranom obliku i ima ulogu antioksidansa u vodenoj fazi stanice sudjelujući u regeneraciji karotenoida i α-tokoferola. Može ukloniti singletni kisik i hidroksilni radikal što ju čini važnim dijelom neenzimskog antioksidacijskog sustava.

#### 1.3.2.2. GLUTATION

Glutation je tripeptid sastavljen od glicina, cisteina i glutaminske kiseline. Zbog sulfhidrilne skupine cisteina ima antioksidacijsko djelovanje. Biljnoj stanici služi kao pričuvni oblik reduciranog sumpora. U normalnim fiziološkim uvjetima glutation se nalazi u reduciranom obliku. Stresni uvjeti pogoduju nastanku oksidiranog oblika glutationa, dolazi do dehidrogenacije uslijed čega prelazi u disulfidni oblik. Reakcija dehidrogenacije je reverzibilna te kao prenositelj vodika i glavna sulfhidrilna komponenta u biljnim stanicama glutation ima bitnu ulogu u održavanju redoks-ravnoteže.

#### 1.3.2.3. FENOLI

Fenoli djeluju kao prirodni pesticidi, antioksidansi, antibiotici i signalne molekule. Sudjeluju u uklanjanju vodikova peroksida u biljnim stanicama. Fenolni derivati poput tanina, flavonoida, lignina, kutina i suberina čine građevni materijal biljnih stanica, a utječu i na izmjenu tvari jer čine stanične stijenke nepropusnima za plinove i vodu.

Polifenoli su vrlo reaktivni donori vodika i elektrona zbog čega su vrlo važni kao antioksidansi (Takahama i Oniki, 1997). Tanini se vežu za proteine fenolnim skupinama čime ih štite od enzimske razgradnje. Flavonoidi smanjuju fluidnost membrana promjenama rasporeda lipida utječući na kinetiku peroksidacije.

#### 1.3.2.4. TOKOFEROLI

Tokoferoli su spojevi koji se nalaze u tilakoidnim membranama plastida fotosintetizirajućih organizama (Munné-Bosch, 2005, DellaPenna, 2005). Poznatiji su kao vitamin E koji čine prirodni tokoferoli (α, β, γ i δ). α-tokoferol je najzastupljeniji i ima sposobnost detoksikacije hidroksilnog radikala i singletnog kisika.

Tokoferol ulazi u reakcije s lipidnim radikalima u membranama donirajući vodikov kation slobodnom radikalu lipida. Time sam postaje radikalom, a za oporavak mu je potreban glutation ili askorbinska kiselina (vitamin C).

### 1.3.2.5. KAROTENOIDI

Karotenoidi se sintetiziraju isključivo u biljkama i gljivama. To su linearne molekule ugljikovodika s brojnim konjugiranim dvostrukim vezama. Imaju karakterističnu žutonarančastu boju, a najjače apsorbiraju svjetlost valnih duljina između 380 i 550 nm, proširujući tako spektar boja koje mogu pokretati fotosintezu (Pevalek-Kozlina, 2003). Karotenoidi imaju i važnu zaštitnu ulogu. Velike količine energije koju apsorbiraju pigmenti mogu oštetiti fotosintetske membrane ako se ta energija ne pohrani fotokemijski. Ukoliko pobuđeno stanje klorofila brzo ne prestane, doći će do reakcije s molekulskim kisikom pri čemu nastaje vrlo reaktivni singletni kisik koji može prouzrokovati štetu u stanici posebice u lipidima. Zaštitna uloga karotenoida očituje se u „gašenju“ pobuđenog stanja klorofila. Budući da pobuđeno stanje karotenoida nema dovoljno energije za nastanak singletnog kisika brzo se vraća u osnovno stanje otpuštajući višak energije u obliku topline (Pevalek-Kozlina, 2003).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi uzrokuje li talij oksidacijski stres u duhanu te može li se biljka učinkovito obraniti aktivirajući svoj antioksidacijski sustav. Pokušalo se utvrditi imaju li talij i kalij anatagonističko djelovanje obzirom da imaju slične ionske radijuse. U tu svrhu jedna od istraživanih otopina je sadržavala talijev i kalijev acetat u dvostruko većoj koncentraciji. Kako bi se utvrdo učinak samog acetata na biljku duhan je tretiran samo otopinom kalijevog acetata.

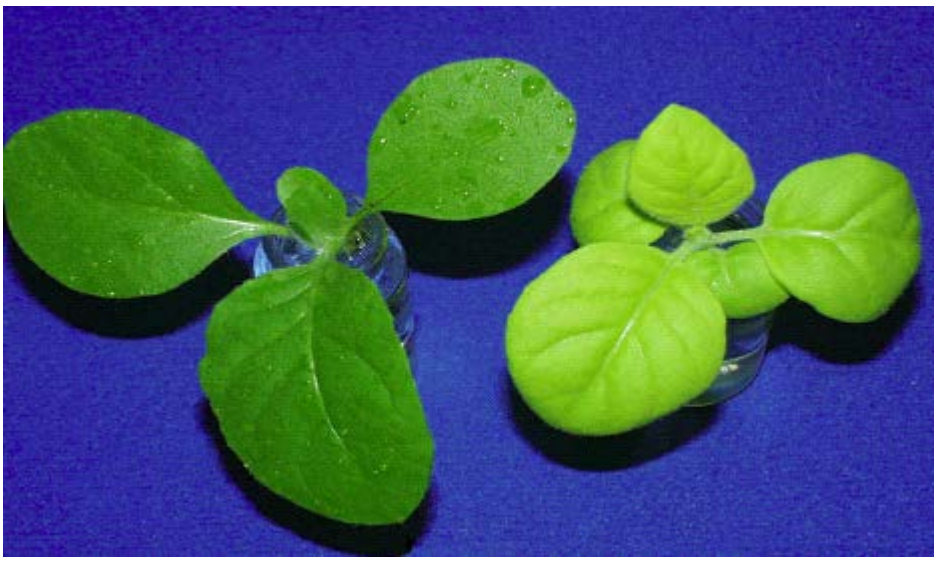
S obzirom da je ovo istraživanje među prvima koje se bavi proučavanjem učinaka jednovalentnog talija na biljne organizme, dobiveni rezultati će doprinijeti ne samo novim spoznajama o toksičnom djelovanju talija na fiziološke procese u duhanu već i boljem poznavanju mehanizama djelovanja teških metala.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. BILJNI MATERIJAL

#### 3.1.1. DUHAN (*Nicotiana tabacum* L.)

Duhan (*Nicotiana tabacum* L.) je biljka iz porodice pomoćnica (Solanaceae) podrijetlom iz južne Amerike. Danas je poznato 65 sorti duhana. Zajedničko im je da sadrže alkaloid nikotin koji biljka proizvodi u korijenu i odlaže ga u listovima.



**SLIKA 1.** *Nicotiana tabacum.* Lijevo: tamnozeleni varijetet, divlji tip; desno: svijetlozeleni varijetet, heterozigot koji se koristi u istraživanju mutacija i oštećenja DNA.

U svom istraživanju koristila sam sortu duhana *Nicotiana tabacum* var. *xanthii*. Ovaj varijetet je heterozigot i ima svijetlozelene listove za razliku od dominantnog, divljeg tipa koji ima tamnozelene listove (Slika 1).

## 3.2. METODE

### 3.2.1. UZGOJ DUHANA U UVJETIMA IN VITRO

Biljke duhana koje sam koristila u pokusima razmnožene su presađivanjem bočnih izdanaka na hranjivoj podlozi MS (Murashige i Skoog, 1962) uz dodatak 500 mg/l MES soli (2-N-morfolino-etansulfonska kiselina), 1,5% saharoze i 2,2 g/L phytagela (Gichner i sur., 2000). Sastav korištene hranjive podloge MS prikazan je u Tablici 1. Vrijednost pH podloge podesila sam na 5,6 što odgovara pH vrijednosti tla na prirodnom staništu duhana. Erlenmeyerove tikvice volumena 300 ml napunila sam s oko 60 ml hranjive podloge. Nakon toga sam tikvice začepila vatom i aluminijskom folijom te zajedno s metalnim i ostalim priborom sterilizirala u autoklavu na temperaturi od 121 °C i tlaku 0,15 MPa u trajanju od 18 minuta. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu na hranjive sam podloge nasađivala eksplantate duhana u laminaru. Nakon presađivanja kulture su inkubirane u klima komori na temperaturi od 24 ± 2 $^{o}$C pod umjetnom rasvjetom fluorescentnih svjetiljki (90 µE $s^{-1}$ $m^{-2}$).

Za izvođenje pokusa koristila sam biljke koje su na krutoj podlozi rasle 2 mjeseca, nakon čega sam ih presadila na tekuću hranjivu podlogu MS uz dodatak 500 mg/l MES soli i 1,5% saharoze. Radi utvrđivanja učinka talija, priredila sam tekuće podloge istog osnovnog sastava koje su još sadržavale talijev (I) acetat i kalijev (I) acetat u različitim koncentracijama:

- K – osnovna hranjiva podloga
- KA – osnovna hranjiva podloga uz dodatak 40 µM kalijeva(I) acetata
- Tl2 – osnovna hranjiva podloga uz dodatak 2 µM talijeva(I) acetata
- Tl4 – osnovna hranjiva podloga uz dodatak 4 µM talijeva(I) acetata
- Tl20 – osnovna hranjiva podloga uz dodatak 20 µM talijeva(I) acetata
- Tl40 – osnovna hranjiva podloga uz dodatak 40 µM talijeva(I) acetata
- TlKl – osnovna hranjiva podloga uz dodatak 40 µM kalijeva(I) acetata i 40 µM talijeva(I) acetata

Erlenmeyerove tikvice volumena 300 ml napunila sam s oko 60 ml istraživanih otopina. Nakon toga sam tikvice začepila vatom i aluminijskom folijom te zajedno s

metalnim i ostalim priborom sterilizirala u autoklavu na temperaturi od 121 °C i tlaku 0,15 MPa u trajanju od 18 minuta. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, na tekuće hranjive sam podloge nasađivala eksplantate duhana stare 2 mjeseca. Kulture su inkubirane u klima komori na temperaturi od 24 ± 2 $^{o}$C pod umjetnom rasvjetom fluorescentnih svjetiljki (90 µE $s^{-1}$ $m^{-2}$) tijekom 3 dana.

**TABLICA 1.** Sastav hranjive podloge MS.

| **MAKROELEMENTI** | **mgl $^{-1}$** | **mM** |
|---|---|---|
| $KNO_3$ | 1900 | 18,80 |
| $NH_4NO_3$ | 1650 | 20,60 |
| $CaCl_2$ x 2 $H_2O$ | 440 | 2,99 |
| $KH_2PO_4$ | 170 | 1,25 |
| $MgSO_4$ x 7 $H_2O$ | 370 | 1,50 |
| **MIKROELEMENTI** | **mgl $^{-1}$** | **mM** |
| $H_3BO_3$ | 6,2 | 100,0 |
| $CoCl_2$ x 6 $H_2O$ | 0,025 | 0,1 |
| KI | 0,83 | 5,0 |
| $Na_2MoO_4$ x 2 $H_2O$ | 0,25 | 1,0 |
| $CuSO_4$ x 5 $H_2O$ | 0,025 | 0,1 |
| $MnSO_4$ x 4 $H_2O$ | 22,3 | 100,0 |
| $ZnSO_4$ x 7 $H_2O$ | 8,6 | 29,9 |
| **ŽELJEZO** | **mgl $^{-1}$** | **mM** |
| $FeSO_4$ x 7 $H_2O$ | 27,8 | 100,0 |
| $Na_2EDTA$ | 37,3 | 100,0 |
| **ORGANSKI DODACI** | **mgl $^{-1}$** | **mM** |
| m-inozitol | 50,0 | 277,5 |
| tiamin·HCl | 0,05 | 0,15 |

### 3.2.2. ODREĐIVANJE SADRŽAJA VODIKOVOG PEROKSIDA

Uzorke svježih listova mase 200 mg ekstrahirala sam u 1 ml hladnog acetona na ledu. Smjesu sam centrifugirala 3 minute na 1 000 g pri 4°C kako bih odstranila kruti stanični materijal. Potom sam u smjesu dodala 400 µl titanil-sulfata i 500 µl koncentrirane otopine amonijevog hidroksida. Smjesu sam zatim centrifugirala 10 minuta na 10 000 g pri 4°C, odlila supernatant te tako dobivene precipitate otopila u 1 ml 2 M $H_2SO_4$. Apsorbancija uzoraka mjerena je na 415 nm. Koncentraciju $H_2O_2$ odredila sam iz baždarne krivulje dobivene s poznatim koncentracijoma $H_2O_2$ (0,23-1,27 x $10^{-3}$ M).

Pri dodatku titanil-sulfata i amonijevog hidroksida precipitirao je peroksid-titanil kompleks, prema kojemu je izvršena procjena sadržaja $H_2O_2$ (Mukherjee i Choudhouri, 1983).

$$[H_2O_2] = \frac{A \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uzor.} \times \varepsilon \times l} \qquad [\mu M/ml]$$

$$H_2O_2/g = \frac{[H_2O_2] \times 1000}{m\,(g) / 1 ml} \qquad [nM/g_{st.}]$$

$V_{r.s}$= volumen reakcijske smjese = 1 ml
F.R. = faktor razrjeđenja = 1
$V_{uzor.}$ = volumen uzorka = 1 ml
ε = ekstincijski koeficijent = 1,878 $mM^{-1}cm^{-1}$
l = duljina optičkog puta = 1 cm

### 3.2.3. ODREĐIVANJE SADRŽAJA MALONDIALDEHIDA

Kako bih odredila sadržaj malondialdehida (MDA), krajnjeg produkta lipidne peroksidacije, pomiješala sam 200 µl sirovog proteinskog supernatanta (priprema proteinskih ekstrakata opisana je u poglavlju 3.2.6. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ANTIOKSIDACIJSKIH ENZIMA) s 1300 µl reakcijske smjese (0,25% tiobarbiturna kiselina otopljena u 10%-tnoj trikloroctenoj kiselini). Kao slijepu probu koristila sam 1,5 ml reakcijske smjese. Uzorke i slijepu probu prelila sam u staklene

semimikroepruvete te ih zagrijavala u sušioniku 30 min na 95 $^{o}$C. Zatim sam ih naglo ohladila na ledu te centrifugirala 10 min na 10 000 g pri 4°C. Nakon toga slijedilo je očitavanje apsorbancije na 532 te na 600 nm zbog korekcije na nespecifično zamućenje (Heath i Packer, 1968).

Tijekom zagrijavanja reakcijske smjese niske pH vrijednosti dolazi do raspadanja lipidnih peroksida nastalih kao posljedica stresa pri čemu nastaje malondialdehid (MDA). Jedna molekula MDA reagira s dvije molekule TBA, a time se stvara crvenkasti kromogen kojemu se mjeri apsorbancija. Koncentracija lipidnih peroksida izražena je kao MDA u jedinicama nmol/$g_{sv.t.}$ uz ekstinkcijski koeficijent $\varepsilon_{532}$ = 155 $mM^{-1}cm^{-1}$.

### 3.2.4. ODREĐIVANJE SADRŽAJA KARBONILA

Uzorke mase 400 mg homogenizirala sam u 2 ml 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7,0) koji sadrži 0,1 mM EDTA i 5 mM natrijevog askorbata. Homogenat sam centrifugirala 30 minuta na 25 000 g. Po 200 µl supernatanta pomiješala sam s 300 µl dinitrofenilhidrazina (DNPH) u 2 M HCl za cijepanje proteina. Kao slijepu probu koristila sam alikvot istog uzorka (200 µl) pomiješan samo s 2 M HCl-om (300 µl). Pripremljene uzorke inkubirala sam 1 sat na sobnoj temperaturi (promiješala sam ih nakon 30 minuta). Nakon inkubacije je slijedila precipitacija proteina s 500 µl 10% trikloroctene kiseline (TCA), zatim su se uzorci hladili nekoliko minuta na –20 $^{o}$C te sam ih centrifugirala 10 minuta na 12 000 g. Dobiveni talog sam ispirala smjesom etanola i etilacetata u omjeru 1:1 (2 x 500 µl) da bi se uklonilo nevezani reagens. Zatim sam talog otapala u 1 ml 6 M otopine uree u 20 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 2,4) u ultrazvučnoj kupelji oko 10 min.

Sadržaj karbonila temelji se na reakciji karbonilnih skupina s DNPH, a određivala sam ga spektrofotometrijskim mjerenjem otopljenih uzoraka na valnoj duljini od 370 nm (Levine i sur., 1990).

$$[\text{KARBONILI}] = \frac{A \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uzor.} \times \varepsilon \times l} \qquad [\mu M/ml]$$

$$\text{KARBONILI/g} = \frac{[\text{KARB}] \times 1000}{\text{m (g)} / 1\text{ml}} \qquad [\text{nmol/g}_{\text{st.}}]$$

$V_{r.s}$= volumen reakcijske smjese = 1 ml
F.R. = faktor razrjeđenja = 1
$V_{uzor.}$ = volumen uzorka = 1 ml
ε = ekstincijski koeficijent = 22 $mM^{-1}cm^{-1}$
l = duljina optičkog puta = 1 cm

### 3.2.5. ODREĐIVANJE SADRŽAJA PROTEINA

Supernatant sam koristila kao sirovi ekstrakt u kojem sam određivala koncentraciju proteina metodom Bradforda (1976). Ova metoda temelji se na mjerenju apsorbancije smjese proteinskog ekstrakta i reagensa pri valnoj duljni 595 nm. U 1 ml radne otopine Bradford – 15 ml etanola, 30 ml 88%-tne $H_3PO_4$, 30 ml Bradford matične otopine (100 ml 96%-tnog etanola, 200 ml 88%-tne $H_3PO_4$ i 350 mg Coomassie brillant blue G 250) i 450 ml $H_2O$ – dodala sam 50 µl uzorka sirovog ekstrakta. Koncentraciju proteina u svakom uzorku odredila sam očitavanjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina serumskog goveđeg albumina poznatih koncentracija (od 0,096 mg/ml do 0,8 mg/ml).

### 3.2.6. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ANTIOKSIDACIJSKIH ENZIMA

Po 400 mg uzorka svježih listova homogenizirala sam u 2,0 ml 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7,0) koji sadrži 0,1 mM EDTA i 5 mM natrijevog askorbata. Homogenat sam centrifugirala u rotoru 12154H visokookretajne centrifuge (Sigma 3K18) pri temperaturi 4 $^{o}$C 30 minuta na 25 000 g. Dobiveni sirovi ekstrakt koristila sam za određivanje sadržaja proteina, aktivnosti enzima kao i određivanje sadržaja malondialdehida.

3.2.6.1. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI KATALAZE

Za mjerenje aktivnosti katalaze koristila sam reakcijsku otopinu koja sadrži 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7,0) i 10 mM $H_2O_2$ (Aebi, 1984). Na 970 µl otopine dodala sam 30 µl sirovog ekstrakta i mjerila pad apsorbancije svakih 10 sekundi tijekom 2 minute pri valnoj duljini od 240 nm. Aktivnost katalaze izražena je kao jedinica aktivnosti po miligramu proteina (U = µmol / min g sv.t):

$$KAT = \frac{\Delta Asv \times 6xV_{r.s.} \times F.R.}{V_{uzor.} \times \varepsilon \times l} \qquad [\mu mol/min\ ml]$$

$$KAT = \frac{\Delta A \mu mol\ min\ ml}{m\ (g)} \qquad [\mu mol/min\ g_{sv\ t}]$$

λ = 240 nm
∆A sv = srednja vrijednost promjene aporbancije u 10 s
$V_{r.s.}$= volumen reakcijske smjese
F.R. = faktor razrjeđenja uzorka
$V_{uzor.}$ = volumen uzorka
6= faktor s kojim se množi ∆A sv da bi se rezultat izrazio u minuti
$\Sigma_{240}$ = 40 $mM^{-1}cm^{-1}$
l = duljina optičkog puta (1 cm)
m = masa svježe tvari

Specifična aktivnost katalaze:

$$\frac{\text{aktivnost katalaze}\left[\frac{\Delta A\ \mu mol}{min\ g_{sv.t.}}\right]}{\text{sadržaj proteina}\left[\frac{mg}{g_{sv.t.}}\right]}$$

### 3.2.6.2. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI ASKORBAT PEROKSIDAZE

Kao reakcijsku otopinu za askorbat peroksidazu koristila sam otopinu po Nakanu i Asadi (1981) koja je sadržavala 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7,0), 0,5 mM askorbinske kiseline, 0,1 mM EDTA i 12 mM $H_2O_2$. Vodikov peroksid (10 µl) sam dodala u reakcijsku smjesu neposredno prije mjerenja. Na 880 µl ove otopine dodala sam 100 µl sirovog ekstrakta i mjerila pad apsorbancije zbog oksidacije askorbinske kiseline svaku sekundu tijekom 15 sekundi pri valnoj duljini od 290 nm. Aktivnost APX je izračunata na isti način kao i aktivnost KAT, no uz odgovarajući ekstinkcijski koeficijent ($\varepsilon_{290}$ = 2,8 $mM^{-1}cm^{-1}$).

### 3.2.6.3. ODREĐIVANJE AKTIVNOSTI PIROGALOL PEROKSIDAZE

Za mjerenje aktivnosti pirogalol peroksidaze koristila sam reakcijsku otopinu po Chanceu i Maehlyu (1955) koja sadrži 50 mM kalij fosfatnog pufera (pH 7,0), 20 mM pirogalola i 1 mM $H_2O_2$ kojeg sam dodala neposredno prije mjerenja. Na 990 µl otopine dodala sam 10 µl uzorka i mjerila pad apsorbancije svakih 15 s tijekom 2,5 min pri valnoj duljini od 430 nm. Aktivnost POX je izražena kao količina nastalih produkata u µmolima po minuti po miligramu proteina koristeći $\varepsilon_{430}$ = 2,47 $mM^{-1}cm^{-1}$.

### 3.2.7. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Svaki rezultat aritmetička je sredina 6 replika. Odstupanje od aritmetičke sredine izraženo je kao standardna devijacija.

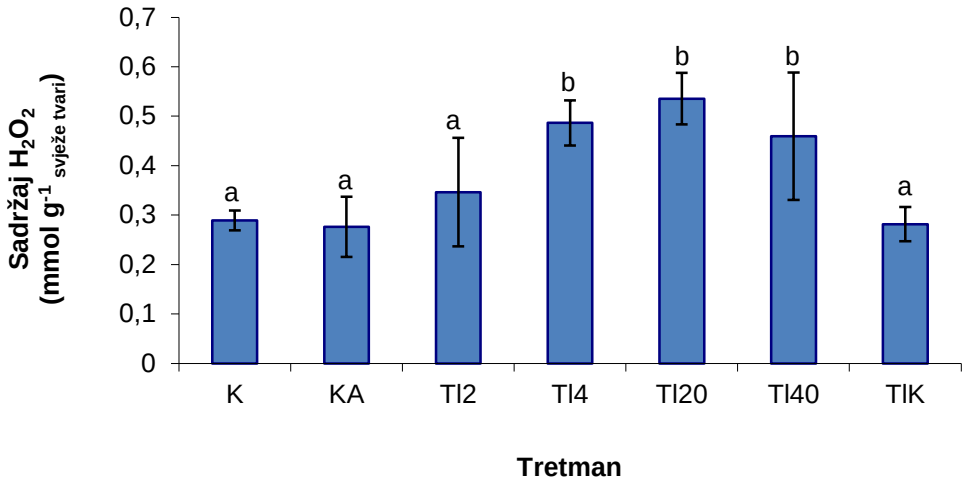
Statističku značajnost rezultata odredila sam koristeći “Duncan's New Multiple Range Test“ (DNMRT) za usporedbu kontrole i pojedinih tretmana međusobno na razini značajnosti $p \leq 0,05$ (Duncan, 1955).

# 4. REZULTATI

## 4.1. SADRŽAJ VODIKOVOG PEROKSIDA

Sadržaj vodikovog peroksida (Slika 2) u biljaka izloženih tretmanu 2 μM talijevim (I) acetatom ne pokazuje statistički značajan porast u odnosu na kontrolu dok je sadržaj vodikovog peroksida u biljaka na tretmanima s 4 μM, 20 μM i 40 μM talijevim (I) acetatom bio u statistički značajnom porastu u odnosu na kontrolne biljke. Najviši sadržaj je zabilježen u biljaka izloženih 20 μM talijevom (I) acetatu.

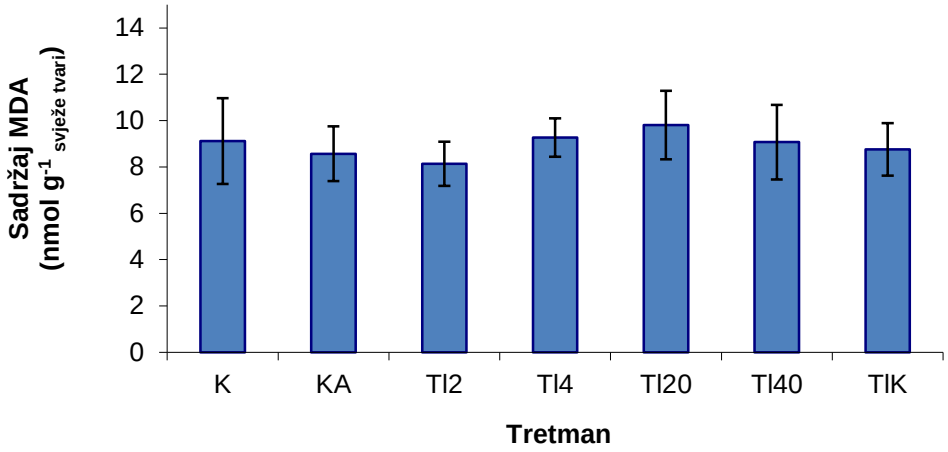
Biljke izložene 40 μM kalijevom (I) acetatu i kombiniranom tretmanu 40 μM talijevim (I) acetatom i 40 μM kalijevim (I) acetatom ne pokazuju statistički značajno odstupanje od sadržaja vodikovog peroksida izmjerenog u kontrolnim biljkama.




SLIKA 2. Sadržaj vodikovog peroksida u izdancima duhana tijekom izlaganja od tri dana u otopinama bez talijevog (I) i kalijevog (I) acetata (K), 40 μM kalijeva (I) acetata (KA), 2 μM (Tl2), 4 μM (Tl4), 20 μM (Tl20) i 40 μM (Tl40) talijevog (I) acetata te 40 μM talijevog (I) acetata i 40 μM kalijevog (I) acetata (TlK). Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički razlikuju (P≤0,05 prema DNMRT). Na stupcima je označena standardna devijacija.

## 4.2. SADRŽAJ MALONDIALDEHIDA

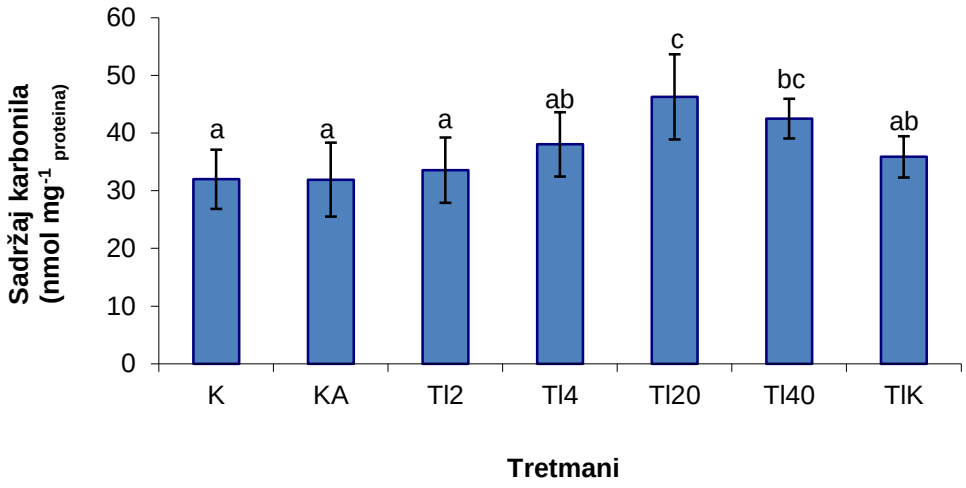
Sadržaj malondialdehida u izdancima duhana (Slika 3) nije se znatno promijenio u odnosu na kontrolu tijekom trodnevnog izlaganja biljaka tretmanu talijevim i kalijevim acetatom, kao ni kombiniranom tretmanu (talijev (I) i kalijev (I) acetat).




SLIKA 3. Sadržaj malondialdehida u izdancima duhana tijekom izlaganja od tri dana u otopinama bez talijevog (I) i kalijevog (I) acetata (K), 40 μM kalijeva (I) acetata (KA), 2 μM (Tl2), 4 μM (Tl4), 20 μM (Tl20) i 40 μM (Tl40) talijevog (I) acetata te 40 μM talijevog (I) acetata i 40 μM kalijevog (I) acetata (TlK). Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički razlikuju (P≤0,05 prema DNMRT). Na stupcima je označena standardna devijacija.

## 4.3. SADRŽAJ KARBONILA

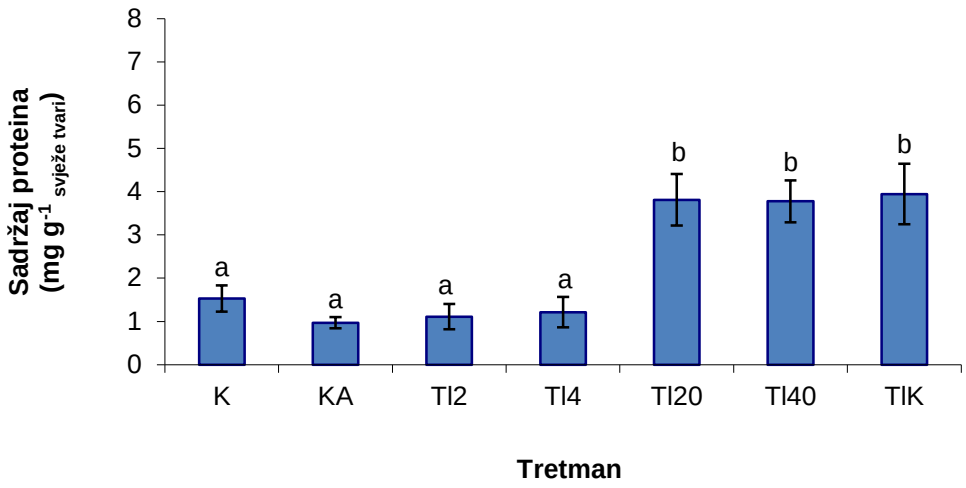
Sadržaj karbonila u izdancima duhana (Slika 4) značajno je porastao nakon trodnevnog izlaganja biljaka višim koncentracijama talijevog (I) acetata (20 i 40 μM) . Za razliku od njih, sadržaj karbonila u biljaka koje su bile na tretmanu nižim koncentracijama talijevog (I) acetata (2 i 4 μM) kao i kombiniranom tretmanu zadržale su sadržaj karbonila sličan onome zabilježenom u kontroli. Isto tako, ni u biljaka tretiranim 40 μM kalijevim acetatom nije ustanovljena promjena sadržaja karbonila u odnosu na kontrolne biljke.




SLIKA 4. Sadržaj karbonila u izdancima duhana tijekom izlaganja od tri dana u otopinama bez talijevog (I) i kalijevog (I) acetata (K), 40 μM kalijeva (I) acetata (KA), 2 μM (Tl2), 4 μM (Tl4), 20 μM (Tl20) i 40 μM (Tl40) talijevog (I) acetata te 40 μM talijevog (I) acetata i 40 μM kalijevog (I) acetata (TlK). Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički razlikuju (P≤0,05 prema DNMRT). Na stupcima je označena standardna devijacija.

## 4.4. SADRŽAJ PROTEINA

Sadržaj proteina u biljkama (Slika 5) izloženim tretmanu kalijevim (I) acetatom i talijevim (I) acetatom u nižim koncentracijama (2 μM i 4 μM) nije se značajno promijenio u odnosu na kontrolu. Uzorci izloženi talijevom (I) acetatu u višim koncentracijama (20 μM i 40 μM) kao i kombiniranom tretmanu (40 μM talij (I) acetat i 40 μM kalij (I) acetat) pokazuju statistički značajan porast sadržaja proteina u odnosu na kontrolu. Sadržaj proteina u biljkama izloženim kalijevu (I) acetatu nije se značajno promijenio u odnosu na kontrolu.

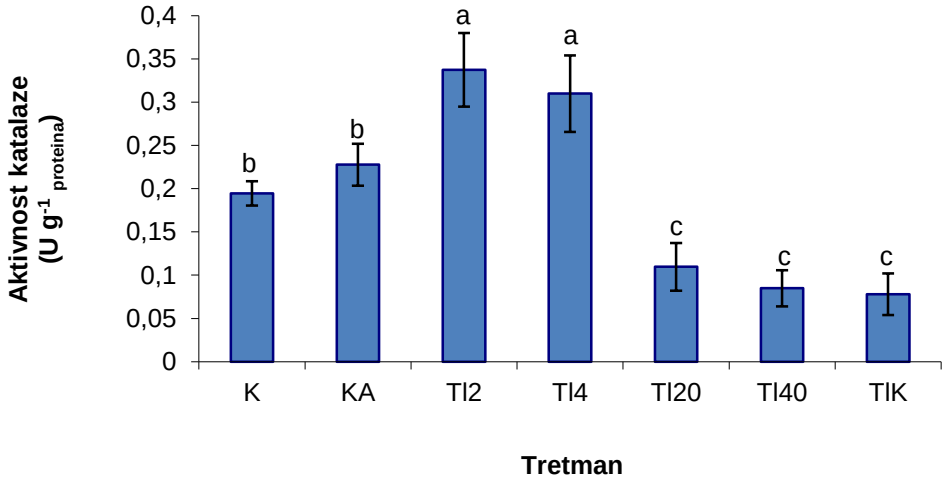



SLIKA 5. Sadržaj proteina u izdancima duhana tijekom tri dana izlaganja otopinama bez talijevog (I) i kalijevog (I) acetata (K), 40 μM kalijeva (I) acetata (KA), 2 μM (Tl2), 4 μM (Tl4), 20 μM (Tl20) i 40 μM (Tl40) talijevog (I) acetata te 40 μM talijevog (I) acetata i 40 μM kalijevog (I) acetata (TlK). Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički razlikuju (P≤0,05 prema DNMRT). Na stupcima je označena standardna devijacija.

## 4.5. AKTIVNOST PEROKSIDAZA

### 4.5.1. AKTIVNOST KATALAZE

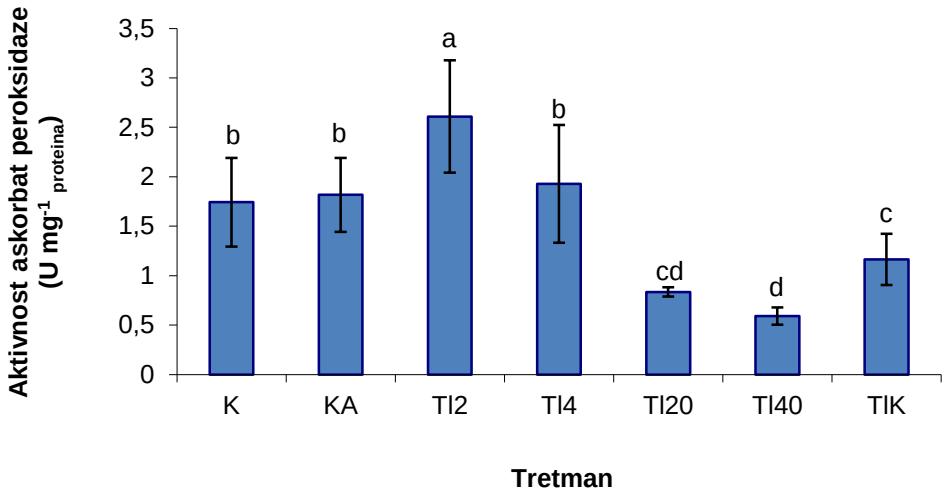
Aktivnost katalaze (Slika 6) značajno je porasla u biljkama izloženima nižim koncentracijama talijevog (I) acetata. Najveći porast aktivnosti katalaze zabilježen je u izdancima biljaka izloženima 2 μM talijevom (I) acetatu. Biljke koje su bile na tretmanima s 20 i 40 μM talijevim (I) acetatom kao i kombiniranom tretmanu (40 μM talijev (I) i kalijev (I) acetat) pokazuju statistički značajno odstupanje od kontrole u vidu pada aktivnosti katalaze.




SLIKA 6. Aktivnost katalaze u izdancima duhana tijekom izlaganja od tri dana u otopinama bez talijevog (I) i kalijevog (I) acetata (K), 40 μM kalijeva (I) acetata (KA), 2 μM (Tl2), 4 μM (Tl4), 20 μM (Tl20) i 40 μM (Tl40) talijevog (I) acetata te 40 μM talijevog (I) acetata i 40 μM kalijevog (I) acetata (TlK). Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički razlikuju (P≤0,05 prema DNMRT). Na stupcima je označena standardna devijacija.

## 4.5.2. AKTIVNOST ASKORBAT PEROKSIDAZE

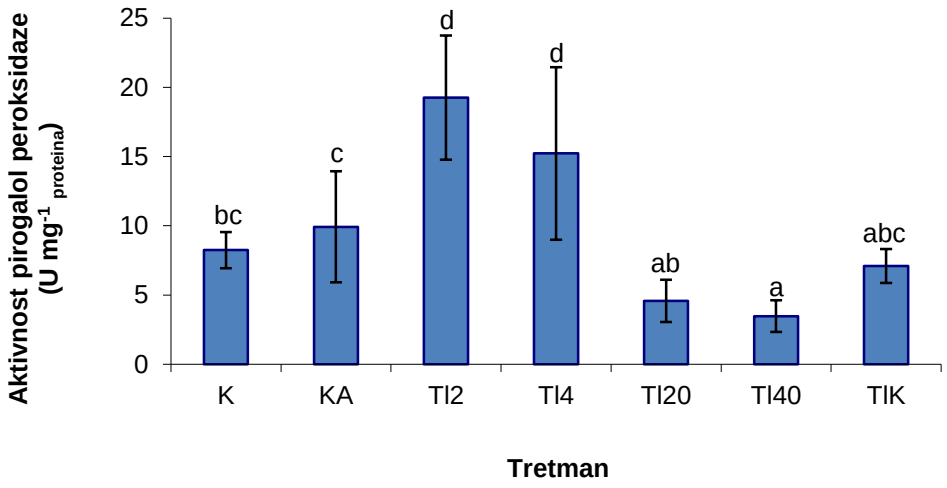
Aktivnost askorbat peroksidaze (Slika 7) nije se značajno mijenjala u biljaka izloženim kalijevom (I) acetatu dok je značajno porasla samo na tretmanu s 2 μM talijevog acetata. Na tretmanu s 4 μM talijevog acetata aktivnost se snizila i postigla vrijednost sličnu onoj koju sam izmjerila u kontrolnim biljkama. Daljnjim povišenjem koncentracije talijevog (I) acetata došlo je do značajnog pada aktivnosti askorbat peroksidaze u odnosu na kontrolu. U biljaka izloženim kombiniranom tretmanu (40 μM talijev (I) i kalijev (I) acetat) aktivnosti askorbat peroksidaze bila je viša nego u biljaka izloženih samo 40 μM talijevim acetatom, ali i dalje značajno niža nego u kontrolnih biljaka.




SLIKA 7. Aktivnost askorbat peroksidaze u izdancima duhana tijekom izlaganja od tri dana u otopinama bez talijevog (I) i kalijevog (I) acetata (K), 40 μM kalijeva (I) acetata (KA), 2 μM (Tl2), 4 μM (Tl4), 20 μM (Tl20) i 40 μM (Tl40) talijevog (I) acetata te 40 μM talijevog (I) acetata i 40 μM kalijevog (I) acetata (TlK). Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički razlikuju (P≤0,05 prema DNMRT). Na stupcima je označena standardna devijacija.

## 4.5.3. AKTIVNOST PIROGALOL PEROKSIDAZE

Aktivnost pirogalol peroksidaze (Slika 8) je u biljaka izloženim kalijevom (I) acetatu porasla u odnosu na kontrolu. Kod biljaka tretiranih s 2 μM i 4 μM talijevog (I) acetata aktivnost pirogalol peroksidaze značajno je porasla u odnosu na kontrolne biljke, a najviši porast aktivnosti enzima je zabilježen u izdancima izloženim 2 μM talijevom (I) acetatu. Biljke izložene višim koncentracijama talijeva acetata (20 i 40 μM) kao i kombiniranom tretmanu pokazale su pad aktivnosti. Statistički značajno smanjenje zabilježeno je samo u biljaka tretiranih najvišom koncentracijom talijeva acetata (40 μM).




SLIKA 8. Aktivnost pirogalol peroksidaze u izdancima duhana tijekom izlaganja od tri dana u otopinama bez talijevog (I) i kalijevog (I) acetata (K), 40 μM kalijeva (I) acetata (KA), 2 μM (Tl2), 4 μM (Tl4), 20 μM (Tl20) i 40 μM (Tl40) talijevog (I) acetata te 40 μM talijevog (I) acetata i 40 μM kalijevog (I) acetata (TlK). Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički razlikuju (P≤0,05 prema DNMRT). Na stupcima je označena standardna devijacija.

## 5. RASPRAVA

Talij se u prirodi može naći u niskim koncentracijama u Zemljinoj kori u sastavu sulfidnih ruda kao i u ugljenu. Najčešći antropogeni izvori talija su izgaranje ugljena i metalna industrija. Toksičan je i nije potreban živim organizmima ni u jednoj fazi života. Zbog zastupljenosti u vrlo niskim koncentracijama (donedavno nižim od granice detekcije uređaja kojima se mogla izmjeriti njegova količina), učinci talija na žive organizme rijetko su i slabo proučavani.

U ovom istraživanju ispitivalo se djelovanje jednovalentnog iona talija u obliku talijeva (I) acetata na antioksidacijski sustav i nastanak oksidacijskog stresa u duhanu (*Nicotiana tabacum* L.). Ionski radijusi jednovalentnog talija i kalija su slični i pokušalo se ustanoviti može li ih biljka razlikovati ili ih neselektivno uzima iz okoline. Zato je duhan bio izložen i kombiniranom tretmanu talija i kalija kako bi se utvrdilo hoće li ga biljka u tim uvjetima više apsorbirati. Kao dodatna kontrola je poslužio tretman s kalijevim (I) acetatom kako bi se ustanovilo ima li sam acetat neki utjecaj na biljku.

U istraživanju Hanzel i Verstraeten (2006) utvrđeno je da jednovalentni talijevi kationi izazivaju porast razine vodikovog peroksida u mitohondrijima adrenalnih stanica štakora te povećavaju stvaranje drugih štetnih oblika kisika prekidajući prijenos elektrona kroz dišni lanac. Porast sadržaja vodikovog peroksida uočen je u listovima i korijenu biljaka izloženih kromu, bakru, cinku, olovu, arsenu i kadmiju (Panda, 2003; Choudhury i Panda, 2004; Dixit i sur., 2001). U listovima duhana izloženim talijevom (I) acetatu također je zamijećeno nakupljanje vodikovog peroksida što je u skladu s rezultatima istraživanja učinaka talija na vodenu leću (Puškar, 2007) te izdanke (Pinturić, 2006) i korijen boba (Glavaš, 2006).

Reaktivni oblici kisika mogu uzrokovati stvaranje reaktivnih aldehida koji su nusprodukti lipidne peroksidacije te oštećenja proteina (Romero-Puertas i sur., 2002). Lipidna peroksidacija je proces kojim je zahvaćena funkcionalnost i struktura membrana te koji posljedično tome može izazvati trajno oštećenje stanice. Talijevi ioni u listovima duhana nakon tri dana pokusa nisu značajno povećali sadržaj malondialdehida, indikatora lipidne peroksidacije. Usporedbom navedenih rezultata s onima koje je Puškar (2007) dobila na vodenoj leći nakon četrnaest dana pokusa te s rezultatima istraživanja djelovanja kadmija na grašak (Dixit i sur., 2001), može se

pretpostaviti da biljka nije dovoljno dugo bila izložena stresu koji bi uzrokovao ozbiljnija oštećenja membrana.

Reaktivni oblici kisika mogu oštetiti proteine bilo izravnom oksidacijom aminokiselinskih ostataka ili neizravnim sekundarnim reakcijama s aldehidnim produktima lipidne peroksidacije. Prisutnost nastalih reaktivnih karbonilnih skupina koje su također dobar pokazatelj oksidacijskog stresa može se odrediti derivatizacijom s 2,4–dinitrofenilhidrazinom (Levine i sur., 1990).

Osim sadržaja malondialdehida, talij je u listovima duhana uzgajanih na podlozi s 20 μM talijevog acetata uzrokovao porast sadržaja karbonila koji upućuje na oksidaciju proteina. Ovakav rezultat se samo djelomično poklapa s rezultatima u izdanku i korijenu boba koje su primijetile Glavaš (2006) i Pinturić (2006) istražujući kratkotrajan stres izazvan talijevim (I) acetatom. U njihovim istraživanjima zapažen je porast sadržaja karbonila u svih biljaka uzgajanih na podlogama s različitim koncentracijama talijevog (I) acetata. Na temelju navedenog moglo bi se zaključiti da se toksično djelovanje talija u izdanku duhana očitovalo primarno na lipidnu komponentu stanice.

U ovom istraživanju talij je uzrokovao porast aktivnosti istraživanih antioksidacijskih enzima. Smatra se da bi takav porast mogao predstavljati sekundarni obrambeni mehanizam protiv oksidacijskog stresa dok bi primarni obrambeni odgovori uključivali fitohelatine i nakupljanje teških metala u vakuoli (Sanitá di Toppi i Gabbrielli, 1999).

Aktivnosti enzima koji razgrađuju vodikov peroksid u različitim staničnim odjeljcima bila je značajno povećana. Aktivnosti askorbat i pirogalol peroksidaze bile su najviše u listovima duhana izloženim najvišoj koncentraciji talija te kombiniranom tretmanu. Peroksidaze su bile povišene i u listovima graška izloženim 4 i 40 μM kadmijevog nitrata u periodu od 15 dana (Dixit i sur., 2001). U tom je istraživanju zabilježen i značajan porast aktivnosti katalaze. U mojem je istraživanju u listovima duhana prisutan porast aktivnost katalaze samo u biljaka tretiranih nižim koncentracijama talijevog(I) acetata (2 i 4 μM). Talijev(I) acetat je u koncentracijama od 20 i 40 μM smanjio aktivnosti katalaze u izdanku. Isti trend je primjećen i u korijenu i izdanku boba (Glavaš, 2006; Pinturić, 2006). Slično je zamijećeno i u odgovoru mahovine *Taxithellium nepalense* na olovo i arsen (Choudhury i Panda, 2004) te krom, bakar i cink (Panda, 2003) kao i odgovora graška na kadmij (Sandalio

i sur., 2001). Porast ili pad aktivnosti antioksidacijskih enzima ovisi ne samo o intenzitetu stresa nego i o njegovom trajanju, starosti biljke i vrsti tkiva (Benavides i sur., 2005). Spoznaja da se količina proteina te aktivnosti enzima peroksidaza i katalaze statistički značajno ne razlikuju u biljkama tretiranim s 20 μM talijevog(I) acetata od biljaka izloženih kombiniranom tretmanu (40 μM talijev(I) acetat i 40 μM kalijev(I) acetat) dovodi do pretpostavke da biljke vjerojatno ne posjeduju mehanizam za raspoznavanje talija i kalija. To potvrđuje rezultate istraživanja Glavaš (2006) i Pinturić (2006) koje su utvrdile podjednako nakupljanje talija u klijancima boba izloženih 20 μM talijevom(I) acetatu te kombiniranom tretmanu koji je sadržavao osim 20 μM talijevog(I) acetata i 40 μM kalijevog acetata. U njihovim je istraživanjima na bobu, slično kao i u mojem istraživanju u listovima duhana zamijećen sličan sadržaj vodikovog peroksida kao i u kontrolnim biljkama, što upućuje na pozitivan učinak dodatne količine kalijevih iona.Pokazatelji oksidacijskog stresa koji su praćeni u ovom istraživanju poput lipidne peroksidacije, oksidacije proteina i količine vodikovog peroksida ukazuju na postojanje oksidacijskog stresa nastalog kao posljedica izlaganja duhana talijevom(I) acetatu. Isto tako rezultati istraživanja ukazuju da su listovi duhana sposobni aktivirati antioksidacijske enzime kao što su katalaza i peroksidaze koji razgrađuju reaktivne oblike kisika te tako brane biljku od stresa.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih istraživanja može se zaključiti sljedeće:

Sadržaj proteina u izdanku duhana se pri nižim koncentracijama talijeva (I) acetata nije bitno razlikovao od kontrole. Pri višim koncentracijama (20 μM i 40 μM) kao i na kombiniranom tretmanu (40 μM talij (I) acetat i 40 μM kalij (I) acetat) biljke su pokazale porast sadržaja proteina.

Sadržaj vodikovog peroksida u izdanku duhana nije se bitno razlikovao od kontrole, osim na koncentraciji talij (I) acetata od 4, 20 i 40 μM iz čega se može zaključiti da talij izaziva oksidacijski stres u višim koncentracijama.

Sadržaj malondialdehida u izdanku duhana nije se bitno povećao se u odnosu na kontrolu što ukazuje da u periodu od tri dana talij nije značajno djelovao na lipidnu komponentu stanice.

Sadržaj karbonila u izdanku nije se znatno povećao u odnosu na kontrolu osim na koncentracijama 20 i 40 μM talijevog (I) acetata što ukazuje da talij djeluje na proteinsku komponentu stanice.

Aktivnost askorbat peroksidaze je bila najviša pri koncentraciji talijeva (I) acetata od 2 μM, a aktivnosti pirgalol peroksidaze pri koncentraciji talijeva (I) acetata od 2 i 4 μM. Porast aktivnosti peroksidaza ukazuje na povećanu razgradnju vodikovog peroksida u listovima duhana izloženim nižim koncentracijama talija (2 i 4 μM talijeva (I) acetata).

Aktivnost katalaze je bila najveća na tretmanima talijevim (I) acetatom koncentracije 2 μM i 4 μM. Više koncentracije talijeva (I) acetata kao i kombinirani tretman dovode do smanjenje aktivnosti katalaze što ukazuje na smanjenje njezine antioksidacijske zaštite.

## 7. LITERATURA


Aebi, H. (1984): Catalase in vitro. Method Enzymol 105: 121-126.

Asada, K. (1992): Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. Physiol Plant 55: 235-241.

Benavides, M. P., Gallego, S. M., Tomaro, M. L. (2005): Cadmium toxicity in plants. Braz J Plant Physiol 17: 21-34.

Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K. V. (2003): Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a rewiew. Ann Bot 91: 179-194.

Bolwell, G. P., Wojtaszek, P. (1997): Mechanisms for generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective. Physiol Molecul Plant Pathol 51: 347-366.

Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72: 248-254.

Braidot, E., Petrussa, E., Vianello, A., Macri, F. (1999): Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidising complex I of complex II substrates. FEBS Lett 451: 347-350.

Chance, B., Maehly, A. C. (1955): Assay of catalases and peroxidases. U: Colowick S. P., Kaplan N.O. (ur.) Methods in Enzymology. Academic Press, New York, str. 764-775.

Choudhury, S., Panda, S. K. (2004): Induction of oxidative stress and ultrastrucutral changes in moss *Taxithellium nepalense* (Schwaegr.). Curr Sci 87: 342-348.

Córdoba F, González-Reyes (1994) Ascorbate and plant cell growth. J Bioenerg Biomembr 26: 399-405

DellaPenna D (2005) A decade of progress in understanding vitamin E synthesis in plants. J Plant Physiol 162: 729-737

Del Rio, L. A., Sandalio, L. M., Palma, J. M., Bueno, P., Corpas, F. J. (1992): Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. Free Rad Biol Med 13: 557-580.

Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R. (2001): Differential antioxidative responses to cadmium in root and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). J Exp Bot 52: 1101-1109.

Duncan, D. B. (1955): Multiple range and multiple F tests. Biometrics 11: 1-42.

Elstner, E. F. (1982): Oxygen activation and oxygen toxicity. Ann Rev Plant Physiol 33: 73-96.

Elstner E. F. (1991): Mechanism of oxygen activation in different compartments of plant cells. U: Pell E. J. , Steffen K. L. (ur.) Active oxygen/oxydative stress and plant metabolism. Rockville, MD: American Society of plant physiologists, str. 13-25.

Farr, S. B., Kogoma, T. (1991): Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Microbiol Rev 55: 561-585.

Foyer, C. H., Halliwell, B. (1976): The presence of gluthation and gluthation reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. Planta 133: 21-25.

Galván-Arzate, S., Santamaría, A. (1998): Thallium toxicity. Toxicol Lett 99: 1-13.

Gardner, P. R., Fridovich, I. (1991): Superoxide sensitivity of *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratose. J Biol Chem 266: 1478-1483.

Giannopolitis, C. N., Ries, S. K. (1977): Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. Plant Physiol 59: 309-314.

Gichner, T., Ptáček, O., Stavreva, D. A., Wagner, E. D., Plewa, M. J. (2000): A comparison of DNA repair using the comet assay in tobacco seedlings after exposure to alkylating agents or ionizing radiation. Mut Res 470: 1-9.

Glavaš, K. (2006): Učinak talij-acetata na antioksidacijski status korijena boba (*Vicia faba* L.). Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Hanzel, C. H., Verstraeten, S. V. (2006) Thallium induces hydrogen peroxide generation by impairing mitochondrial function. Toxicol Appl Pharmacol 216: 485-492.

Heath, R. L., Packer, L. (1968): Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I-kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch Biochem Biophys 125: 189-198.

Inzé, D., Van Montagu, M. (2002): Oxidative Stress in Plants. Taylor and Francis, London and New York.

Jinmin, F., Huang, B. (2002): Involvement of antioxidants and lipid peroxidation in the adaptation of two cool-season grasses to localized drought stress. Department of Horticulture, Forestry and Recreation Resources, Kanzas State University.

Kazantzis, G. (2000): Thallium in the environment and health effects. Environ Geochem Health 22: 275– 280.

Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S., Stadtman, E. R. (1990): Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. Method Enzymol 186: 464-478.

Logan, P. G. (1985): Thallium uptake and transport in higher plants. Ph.D. thesis, Department of Biology, Liverpool, Polytechnic.

Mukherjee, S. P., Choudhouri, M. A. (1983): Implications of water stress-induced changes in the levels of endogenous ascorbic acid and hydrogen peroxide in Vigna seedlings. Physiol Plant 58: 166-170.

Munné-Bosch S (2005) The role of α-tocopherol in plant stress tolerance. J Plant Physiol 162: 743-748.

Murashige, T., Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15: 473-497.

Nakano, Y., Asada, K. (1981): Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol 22: 867-880.

Panda S. K. (2003): Heavy-metal phytotoxicity induces oxidative stress in a moss, *Taxithellium* sp. Curr Sci 84: 631-633.

Pevalek-Kozlina, B. (2003): Fiziologija bilja. Profil International, Zagreb.

Pinturić, K. (2006): Učinak talij-acetata na antioksidacijski status korijena boba (*Vicia faba* L.), Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Puškar, Lj. (2007): Pokazatelji oksidacijskog stresa u vodenoj leći (*Lemna minor* L.) izloženoj talijevom(I)-acetatu, Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

Reggiani, R., Bertani, A. (1989): Effect of decreasing oxygen concentration on polyamine metabolism in rice and wheat shoots. J Plant Physiol 135: 375-377.

Romero-Puertas, M. C., Gomez, M., Del Rio, L. A., Sandalio, L. M. (2002): Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants Plant Cell Environ 25: 677–686.

Sandalio, L. M., Dalurzo, H. C., Gómez, M., Romero-Puertas, M. C., del Río, L. A. (2001): Cadmium-induced changes in the growth and oxiative metabolism of pea plants. J Exp Bot 52: 2115-2126.

Sanitá di Toppi, L., Gabbrielli, R. (1999): Response to cadmium in higher plants. Environ Exp Bot 41: 105-130.

Scandalias, J. G. (1990): Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. Adv Genet 28: 1-41.

Schoer, J. (1984): Thallium. U: Hutzinger O., (ur.). Handbook of environmental chemistry. New York, Springer-Verlag, str. 143–214.

Siegel, B., Siegel S. M. (1975): A selective role for potassium in the phytototicity of thallium. Bioinorg Chem 4: 93-97.

Smirnoff, N. (1993): The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. New Phytol 125: 27-58.

Sohal, R. S., Agarwal, S., Dubey, A., Orr, W. C. (1993): Protein oxidative damage is associated with life expectancy of houseflies, Proc Natl Acad Sci USA 90: 7255-7259.

Stadtman, E.R. (1986) Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems: implication in protein turnover, aging and neutrophil function. Trends Biochem Sci 11: 11-12.

Stadtman, E. R. (1992): Protein oxidation and aging. Science 257: 1220-1224.

Takahama U, Oniki T (1997) A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. Physiol Plant 101: 845-852

Takahashi, M. A., Asada, K. (1983): Superoxide anion permebility of phospholipid membranes and chloroplast thylakoids. Arch Biochem Biophys 226: 558-566.