



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI
FAKULTET
DEPARTMAN ZA HEMIJU



Mr Boris Popović

**UTICAJ γ -ZRAČENJA NA ANTIOKSIDANTNI SISTEM
ODABRANIH GENOTIPOVA SOJE I POJAVA
OKSIDATIVNOG STRESA**

- Doktorska disertacija -

Novi Sad, 2006.

UMESTO PREDGOVORA

U ovoj disertaciji obradjena je tema „Uticaj γ -zračenja na antioksidantni sistem odabranih genotipova soje i pojava oksidativnog stresa“. Istraživački rad na disertaciji je obavljen u hemijskim i biohemijskim laboratorijama Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, laboratorijama organske hemije i Zavoda za tehnologiju mesa Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu. Uzorci ozračene i neozračene soje u raznim fazama razvoja dobijeni su od Nacionalne laboratorije za ispitivanje semena u Novom Sadu. Ozračivanje soje obavljeno je u radijacionoj laboratoriji Instituta za onkologiju u Sremskoj Kamenici i u laboratoriji „Gama“- radijacionoj jedinici Instituta za nuklearne nauke u Vinči.

Imam prijatnu obavezu da se prvo zahvalim članovima Komisije za ocenu podobnosti disertacije za javnu odbranu:

- prof. dr Dubravki Štajner, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, mentoru – na izboru teme i stručnoj pomoći u svim fazama izrade ovoga rada. Bez njene pomoći, svakodnevnih podsticaja i ohrabivanja bilo bi nezamislivo da u ovako kratkom roku okončam rad na disertaciji;*
- prof. dr Miri Popović, redovnom profesoru PMF-a u Novom Sadu, mentoru – na korisnim sugestijama i pomoći u pojedinim fazama istraživačkog rada i na finalnom oblikovanju disertacije;*
- prof. dr Mirjani Milošević, redovnom profesoru Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu i direktoru Nacionalne laboratorije za ispitivanje semena – na dobijenim uzorcima na kojima je vršen istraživački rad i na materijalnoj pomoći za kupovinu neophodnih hemikalija, a posebno na korisnim sugestijama u završnoj redakciji disertacije i*
- prof. dr Vukadinu Leovcu, redovnom profesoru PMF-a u Novom Sadu – na brzini u čitanju disertacije i na korisnim sugestijama tokom izrade disertacije.*

Želim takođe da se zahvalim:

- prof. dr Jasni Čanadanović-Brunet, vanrednom profesoru Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu – za ESR analizu ekstrakata semena ozračene i neozračene soje;*
- mr Anamariji Mandić, istraživaču saradniku Zavoda za tehnologiju mesa Tehnološkog fakulteta u Novom Sadu – za HPLC analizu izoflavona u semenu ozračene i neozračene soje;*
- dr Kseniji Taški, naučnom saradniku Nacionalne laboratorije za ispitivanje semena – na pripremi uzoraka ozračene i neozračene soje i korisnim stručnim razgovorima tokom izrade disertacije;*

- *gospodi Miliji Milanoviću, bivšem direktoru Instituta za nuklearne nauke u Vinči i Slobodanu Mašiću, tehničkom rukovodiocu laboratorije „Gama“ u Vinči – za ozračivanje uzoraka soje dozama do 10 kGy;*
- *Mariji Umićević, tehničkom saradniku na predmetu Biohemija na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu – za podršku i pomoć pri eksperimentalnoj izradi rada;*
- *nastavnicima, asistentima i tehničkim saradnicima na predmetu Hemija i Biohemija Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu – na podršci tokom rada na disertaciji i*
- *Ministarstvu nauke i zaštite životne sredine – za stipendiju i materijalna sredstva neophodna za izradu ove disertacije.*

U Novom Sadu, 10. 08. 2006.

Mr Boris Popović

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPŠTI DEO.....	3
2.1. Jonizujuća i nejonizujuća zračenja i njihov uticaj na biljke.....	3
2.1.1. Biološki efekti jonizujućih zračenja.....	3
2.1.2. Radijacioni hormezis.....	3
2.1.3. Biološki efekti nejonizujućih zračenja.....	5
2.2. Mehanizam delovanja γ-zračenja na žive sisteme.....	6
2.2.1. Direktni efekti γ -zračenja.....	6
2.2.2. Radioliza vode, oksidativni stres i indirektni efekti γ -zračenja.....	7
2.2.2.1. Lipidna peroksidacija.....	9
2.2.2.2. Oksidativna modifikacija proteina.....	11
2.3. Antioksidantni sistem biljaka.....	13
2.3.1. Antioksidantni enzimi.....	13
2.3.2. Neenzimski antioksidanti.....	16
2.4. Oksidativni stres, signalna transdukcija i indukcija antioksidantne aktivnosti kod biljaka.....	19
2.4.1. Uloga vodonik-peroksida u signalnoj transdukciji.....	20
2.4.2. Uloga azot-monoksida u signalnoj transdukciji.....	22
2.4.3. Radijacioni stres i signalna transdukcija.....	23
2.5. Ozračivanje hrane.....	25
2.6. Poreklo i značaj soje.....	26
2.7. Nutritivne i antinutritivne karakteristike soje.....	28
2.7.1. Antioksidantna jedinjenja soje.....	29
2.7.1.1. Izoflavoni soje.....	30
3. EKSPERIMENTALNI DEO.....	34

3.1. Materijal.....	34
3.1.1. Uslovi ozračivanja soje.....	35
3.2. Metode.....	35
3.2.1. Ekstrakcija hidroksil-radikala i antioksidantnih enzima.....	35
3.2.2. Odredjivanje količine hidroksil-radikala.....	36
3.2.3. Odredjivanje aktivnosti superoksid-dizmutaze.....	36
3.2.4. Odredjivanje aktivnosti katalaze.....	36
3.2.5. Odredjivanje aktivnosti gvajakol-peroksidaze.....	37
3.2.6. Odredjivanje aktivnosti glutacion-peroksidaze.....	37
3.2.7. Odredjivanje sadržaja rastvorljivih proteina.....	37
3.2.8. Odredjivanje ukupne antioksidantne aktivnosti FRAP metodom.....	38
3.2.9. Odredjivanje inhibicije azot-monoksida.....	38
3.2.10. Odredjivanje skevindžer aktivnosti ekstrakta DPPH metodom.....	38
3.2.11. Odredjivanje sadržaja ukupnih fenola.....	39
3.2.12. Odredjivanje sadržaja tanina.....	39
3.2.13. Odredjivanje količine redukovanog glutationa.....	39
3.2.14. Odredjivanje količine malonildialdehida.....	39
3.2.15. Odredjivanje intenziteta oksidacije proteina.....	40
3.2.16. Odredjivanje sadržaja izoflavona u semenu soje.....	40
3.2.17. ESR spektroskopsko određivanje hidroksil-radikala.....	41
3.2.18. Statistička obrada podataka.....	44
4. REZULTATI I DISKUSIJA.....	45
4.1. Uticaj niskih doza γ-zračenja na antioksidantni sistem odabranih genotipova soje.....	45
4.1.1. Uticaj niskih doza γ -zračenja na aktivnost superoksid-dizmutaze različitim fazama razvoja soje.....	45
4.1.2. Uticaj niskih doza γ -zračenja na aktivnost katalaze u različitim fazama razvoja soje.....	50
4.1.3. Uticaj niskih doza γ -zračenja na aktivnost gvajakol-peroksidaze u različitim fazama razvoja soje.....	55
4.1.4. Uticaj niskih doza γ -zračenja na aktivnost glutacion-peroksidaze u različitim fazama razvoja soje.....	60
4.1.5. Uticaj niskih doza γ -zračenja na količinu redukovanog glutationa u različitim fazama razvoja soje.....	65
4.1.6. Uticaj niskih doza γ -zračenja na sadržaj rastvorljivih proteina u različitim fazama razvoja soje.....	69
4.1.7. Uticaj niskih doza γ -zračenja na ukupnu antioksidantnu aktivnost određenu FRAP metodom u različitim fazama razvoja soje.....	74
4.1.8. Uticaj niskih doza γ -zračenja na DPPH skevindžer aktivnost u različitim fazama razvoja.....	79

4.1.9. Uticaj niskih doza γ -zračenja na inhibiciju azot-monoksida u različitim fazama razvoja.....	84
4.1.10. Uticaj niskih doza γ -zračenja na količinu hidroksil-radikala u različitim fazama razvoja soje.....	89
4.1.11. Uticaj niskih doza γ -zračenja na intenzitet lipidne peroksidacije u različitim fazama razvoja soje.....	93
4.1.12. Lipidna peroksidacija kao kriterijum osetljivosti pojedinih genotipova soje na radijacioni stres.....	98
4.1.13. ESR spektroskopsko određivanje hidroksil-radikala u prisustvu ekstrakata lista ozračene i neozračene soje.....	99
4.1.14. Indukcija antioksidantne aktivnosti odabranih genotipova soje pod uticajem radijacionog i oksidativnog stresa.....	103
4.2. Uticaj srednjih doza γ-zračenja na odabrane antioksidantne karakteristike semena soje.....	105
4.2.1. Uticaj srednjih doza γ -zračenja na intenzitet lipidne peroksidacije u semenu soje.....	105
4.2.2. Uticaj srednjih doza γ -zračenja na sadržaj rastvorljivih proteina u semenu soje.....	106
4.2.3. Uticaj srednjih doza γ -zračenja na intenzitet oksidacije proteina u semenu soje.....	106
4.2.4. Uticaj srednjih doza γ -zračenja na sadržaj ukupnih fenola i tanina u semenu soje.....	107
4.2.5. Ispitivanje uticaja srednjih doza γ -zračenja na ukupnu antioksidantnu aktivnost ekstrakata semena soje FRAP metodom.....	108
4.2.6. Uticaj srednjih doza γ -zračenja na DPPH skevindžer aktivnosti ekstrakata semena soje.....	109
4.2.7. ESR spektroskopsko ispitivanje skevindžer aktivnosti etilacetatnih ekstrakata ozračene i neozračene soje.....	110
4.2.8. Uticaj srednjih doza γ -zračenja na sadržaj izoflavona genisteina i daidzeina i njihovih glikozida u semenu soje.....	111
5. ZAKLJUČAK.....	117
6. CONCLUSION.....	120
7. LITERATURA.....	123
8. PRILOG.....	136

1. UVOD

Živi svet je, od nastanka, bio izložen različitim vrstama i dozama zračenja. Prirodni fon zračenja se menjao u maloj meri od pojave pračovaka na Zemlji, pre četiri miliona godina, pa do danas. Međutim, život na Zemlji je nastao kada je zračenje na njoj bilo oko deset puta veće nego što je sad. Prvi jednoćelijski organizmi bili su adaptirani na te doze zračenja i verovatno su koristili energiju radioaktivnog zračenja u svom radiogenom metabolizmu (Luckey, 1991). Proučavanje efekata različitih doza zračenja, većih od prirodnog nivoa, dobila su na značaju tek razvojem izvora zračenja koje je čovek stvorio. Milton Burton je prvi, 1942. godine, uveo termin „radijaciona hemija“, a Lind ju je definisao kao nauku koja izučava hemijske efekte apsorbovanog jonizujućeg zračenja u materiji (Mozumder i Hatano, 2004).

Nakon otkrića X-zračenja, 1895. godine, započeli su prvi eksperimenti u kojima je seme ozračivano malim dozama jonizujućeg zračenja kako bi se stimulirao rast i pospešili razvojni procesi. Takvi tretmani uglavnom stimulišu klijanje semena, rast mlade biljke, cvetanje i prinos (Breslavets, 1946). Ovi rezultati su delovali veoma ohrabrujuće za nova istraživanja i praktičnu primenu u agronomiji (Patskevitch, 1961).

Danas je u nauci opšte prihvaćena činjenica da niske doze γ -zračenja stimulišu ćelijske deobe, rast i razvoj (Luckey, 1991; Sagan, 1987; Planel i sar., 1987; Korystov i Narimanov, 1997). Međutim, način kojim zračenje deluje na pomenute procese još uvek nije poznat. Najnovija istraživanja ukazuju da su biljke najosetljivije na radijaciju u periodu diferencijacije tkiva. Utvrđeno je da doze od 0,5-20 Gy izazivaju morfološke i citološke promene (hromozomske aberacije, redukciju mitotičkog indeksa itd.), (Vaijapurkar i sar., 2001). Jonizujuće zračenje kao npr. γ -zračenje dovodi do nastajanja reaktivnih kiseoničnih vrsta, među kojima je najreaktivniji hidroksil-radikal koji se smatra glavnim uzrokom oksidativnog stresa. Utvrđeno je da stepen oštećenja DNK raste sa povećanjem doze γ -zračenja (Villavicencio i sar., 2004). S` obzirom na narastajući problem globalnog zagađenja i sve veću radioaktivnu kontaminaciju, neophodna su dalja ispitivanja uticaja jonizujućeg zračenja na žive sisteme.

U radovima Zaka i saradnika (2002) ispitivan je uticaj niskih doza γ -zračenja na aktivnost antioksidantnih enzima kod *Stipa capillata* (*Poaceae*) i na pojavu hromozomskih aberacija kod *Pisum sativum*. I drugi autori navode da γ -zračenje utiče na promenu aktivnosti antioksidantnih enzima kod biljaka (Crocini i sar., 1991; Singh i sar., 1993). Wada i saradnici (1998) ukazuju da biljke kod kojih je utvrđena veća aktivnost gvajakol-peroksidaze pokazuju i veću otpornost na delovanje radijacionog i oksidativnog stresa. Fan i saradnici (2004) su utvrdili da γ -zračenje utiče na povećanje ukupne antioksidantne aktivnosti i sadržaja vitamina C u poniku lucerke naklijavanom iz semena ozračenog dozama do 4 kGy. Na osnovu dosadašnjih istraživanja može se zaključiti da niske doze γ -zračenja deluju na mnoge biohemijske i fiziološke procese biljaka. Rezultati tih ispitivanja variraju u zavisnosti od ispitivane vrste kao i doze primenjenog zračenja.

Na osobini jonizujućeg zračenja da uništava mikroorganizme zasnovana je i njegova primena u prehrambenoj industriji za konzerviranje i čuvanje prehrambenih proizvoda (Josimović, 1990). Međunarodna agencija za atomsku energiju je 1980. godine ukazala da su prehrambeni proizvodi ozračeni dozama do 10 kGy bezbedni i

da ne moraju da se podvrgavaju daljim toksikološkim analizama. Nekoliko autora je do sad ispitivalo uticaj γ -zračenja na lipide i proteine soje. Doze gama zračenja veće od 10 kGy dovode do povećanja sadržaja vodorastvornih komponenti, slobodnih aminokiselina, šećera i minerala proporcionalno primenjenoj dozi zračenja (Byun i sar., 1996). Byun i saradnici (1995) su takođe utvrdili da doze γ -zračenja do 10 kGy ne izazivaju signifikantne promene sadržaja ukupnih lipida, sastava viših masnih kiselina, peroksidnog i kiselinskog broja u semenu soje. Variyar i saradnici (2004) su utvrdili da doze γ -zračenja do 5 kGy dovode do povećanja DPPH skevindžer aktivnosti butanolnih ekstrakata semena soje. Pored pomenutog rada, u literaturi gotovo da nema podataka o delovanju niskih i srednjih doza γ -zračenja na antioksidantni sistem soje.

Zbog navedenog, u ovom radu postavljeni su sledeći ciljevi istraživanja:

- ispitivanje uticaja niskih doza γ -zračenja (do 200 Gy) na antioksidantne osobine i parametre oksidativnog stresa u različitim fazama razvoja soje;
- odabir sorti soje najotpornijih na delovanje radijacionog i oksidativnog stresa na osnovu analize antioksidantnog statusa soje u različitim fazama razvoja i
- ispitivanje uticaja srednjih doza γ -zračenja (1-10 kGy) na neke antioksidantne osobine semena soje.

Polazeći od postavljenih ciljeva istraživanja, postavljena je sledeća hipoteza:

- radijacioni i oksidativni stres izazvani delovanjem niskih i srednjih doza γ -zračenja na seme soje, dovode do stimulacije pojedinih komponenti antioksidantnog sistema soje.

Ukoliko se dokaže da niske i srednje doze γ -zračenja dovode do akumulacije pojedinih antioksidanata otvorili bi se prostori za nova istraživanja. Antioksidanti soje nastali radijacionom stimulacijom mogli bi dovesti do poboljšanja nutritivnih i farmakoloških osobine soje, a pojedine genotipove bi učinili otpornijim na delovanje radijacionog i oksidativnog stresa.

U okviru istraživanja postavljeni su sledeći radni zadaci:

- određivanje aktivnosti antioksidantnih enzima (SOD, CAT, GPx, GSH-Px);
- određivanje količine hidroksil radikala i malonildialdehida;
- određivanje količine GSH i sadržaja rastvorljivih proteina;
- određivanje intenziteta oksidacije proteina;
- određivanje ukupne antioksidantne aktivnosti FRAP metodom;
- određivanje DPPH-skevindžer aktivnosti;
- određivanje inhibicije NO radikala;
- ESR spektroskopsko određivanje hidroksil-radikala;
- određivanje sadržaja ukupnih fenola i tanina i
- određivanje izoflavona u semenu soje pomoću HPLC analize.

2. OPŠTI DEO

2.1. Jonizujuća i nejonizujuća zračenja i njihov uticaj na biljke

Zračenje predstavlja prostiranje naelektrisanih čestica ili fotona kroz prostor. Postoje dva osnovna tipa zračenja, a to su korpuskularno zračenje i elektromagnetno zračenje. Na osnovu hemijskih efekata, zračenje se deli na jonizujuće i nejonizujuće. Osnovna karakteristika jonizujućih zračenja je da vrše jonizaciju sredine kroz koju prolaze. Nejonizujuća zračenja ne poseduju dovoljnu energiju za jonizaciju materije kroz koju prolaze. U grupu jonizujućih zračenja spadaju: elektromagnetno X- i γ -zračenje kao i korpuskularno zračenje (elektronsko, protonsko, neutronska, radioaktivno α - i β -zračenje i fisioni fragmenti), (Mozomder, 2004). U grupu nejonizujućih zračenja spadaju: ultraljubičasto (UV), vidljiva svetlost, infracrveno zračenje (IC) i elektromagnetna polja krajnje niskih frekvencija (Extremely low Frequency-ELF).

2.1.1. Biološki efekti jonizujućih zračenja

Najznačajnije biološke posledice delovanja jonizujućih zračenja su tačkaste mutacije, hromozomske aberacije, ćelijska smrt i onkogeno transformacija. Reparacija struktura oštećenih zračenjem je najvažniji mehanizam zaštite od jonizujućeg zračenja (Gao i sar., 2003). Veliki broj gena i signalnih molekula uključen je u proces regeneracije oštećenih struktura. Biološki efekti, koje izazivaju pojedini tipovi zračenja razlikuju se u zavisnosti od njihove energije i načina interakcije sa okolinom. Oni mogu biti direktni i indirektni. Direktni efekti zračenja su jonizacija i cepanje hemijskih veza energijom zračenja dok su indirektni efekti rezultat nastajanja visokoreaktivnih hemijskih vrsta nastalih delovanjem zračenja na vodu (radioliza vode), (Bernhard i Close, 2004). Osnovna veličina koja opisuje interakciju jonizujućeg zračenja sa materijom je LET (Linear Energy Transfer). LET predstavlja energiju lokalno predata medijumu od strane čestice u liniji skretanja. Najkrupnije biološke posledice pokazuju jonska zračenja koja karakterišu visoke vrednosti LET. Niske vrednosti LET imaju γ -, X- i elektronsko zračenje (Blakely, 1992). Ispitivanje uticaja jonizujućeg zračenja na izazivanje mutacija uglavnom je vršeno na model-biljkama kao što su *Arabidopsis thaliana* L., hrizantema, duvan, pšenica i sl.

Interesovanja istraživača su na početku bila uglavnom vezana za delovanje visokih akutnih doza na mortalitet, somatske i genetske posledice delovanja zračenja. Razvojem radijacione hemije sve veća pažnja se posvećuje hroničnom delovanju niskih doza zračenja, nešto većim od prirodnog fona (Kljajić, 2002). Uticaj niskih doza jonizujuće radijacione (radijacioni hormezis) i uticaj γ -zračenja na biološke sisteme biće predmet narednih poglavlja.

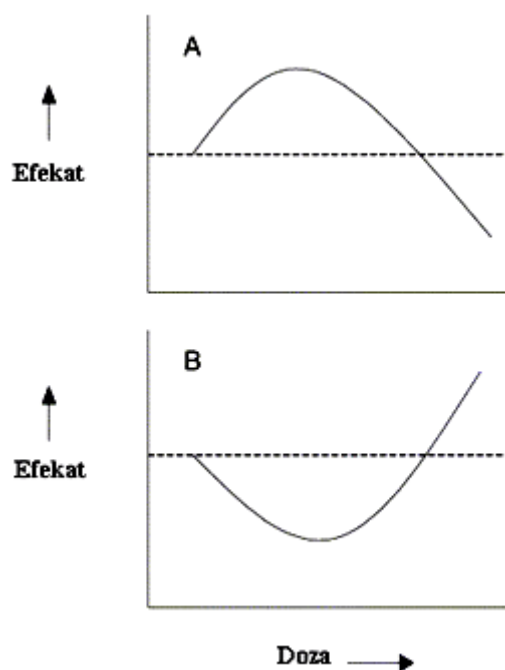
2.1.2. Radijacioni hormezis

Schulz je još 1888. godine uočio da mnoga hemijska sredstva primenjena u malim dozama stimulatивно deluju na rast kvasaca (*Ascomyceta*), dok u velikim dozama deluju inhibitorno. Koncept o podsticajnom dejstvu niskih doza, a

inhibitorom dejstvu visokih doza postao je poznat kao Arndt-Schulz-ov zakon (Luckey, 2003). Međutim Arndt-Schulz-ov zakon je samo „moderna verzija“ zakonitosti koju je još u 16. veku uočio Paracelzus, da male doze toksičnih supstanci mogu imati korisne efekte. Hormezis je opšti biološki fenomen jer je uočen kod svih grupa živih organizama.

Hormezis je fiziološka adaptivna reakcija organizma na nisku dozu nekog stresogenog uticaja tokom ograničenog vremenskog perioda i predstavlja reakciju na poremećaj homeostaze (Calabrese i Baldwin, 2001). Termin hormezis potiče od grčke reči „hormaein“ što znači „stimulisati“. U skorije vreme Calabrese i Baldwin (2001) su klasifikovali ogroman broj podataka iz toksikološke literature vezanih za pojavu hormezisa uvodeći objektivne i moderne kriterijume u analizi ove pojave. Prema Calabrese i Baldwin (1998) oko 25% relevantnih publikacija o hormezisu predstavljaju radovi o radijacionom hormezisu dok se većina ostalih radova odnosi na hormezis izazvan različitim hemijskim sredstvima. Radijacioni hormezis predstavlja posebnu vrstu hormezisa gde je adaptivna reakcija organizma prouzrokovana dejstvom niskih doza jonizujućeg zračenja.

Opšti oblik hormetičke zavisnosti, doza-efekat, nije linearan i ima najčešće dva oblika, tzv. β - i U-zavisnosti (Slika 1). Adaptivna reakcija se može uočiti na početnom delu krive, a njen maksimum odgovara 30-60% vrednosti kontrole (Calabrese, 2005).



Slika 1. Oblici zavisnosti doza-efekat kod hormezisa (Calabrese, 2005)

(A) β -kriva predstavlja najčešći oblik hormetičke zavisnosti i opisuje porast vrednosti parametra (npr. karakteristike rasta i razvoja organizma) kod niskih doza (B) U-kriva opisuje smanjenje vrednosti ispitivanog parametra (npr. indikator procesa mutageneze i kancerogeneze) kod niskih doza, a povećanje kod visokih doza

Prema Macklis-u (1991), hormezis se vezuje za zračenje sa niskom vrednošću LET i za doze od 1-50 cGy. Luckey je bio jedan od prvih istraživača koji se bavio problematikom radijacionog hormezisa još 1950-ih godina. Luckey je 1980. godine izdao prvu monografiju o radijacionom hormezisu gde su sumirani rezultati oko 1200 radova iz ove oblasti, a 1991. godine izdato je prošireno izdanje pod nazivom „Radiation hormesis“. U knjizi su izneti brojni dokazi o stimulativnom delovanju

niskih doza jonizujućeg zračenja na brojne fiziološke pokazatelje kod živih organizama. Neki od efekata hormetičkih doza jonizujućeg zračenja su ubrzanje rasta i razvojnih procesa, stimulacija različitih enzima, imunog i reproduktivnog sistema, smanjenje smrtnosti uključujući i smrtnost od kancera.

Do danas nije postignut konsenzus među naučnicima o delovanju niskih doza jonizujućeg zračenja na žive sisteme jer još uvek nije poznat precizan mehanizam njegovog delovanja. Stav UNSCEAR (United Nation Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation) iz 1993. godine o radijacionom hormezisu je da je to interesantan fenomen koji se javlja kod nekih bioloških sistema u određenim fazama razvoja ali da je od malog značaja za zaštitu od jonizujućeg zračenja (UNSCEAR, 1993).

2.1.3. Biološki efekti nejonizujućih zračenja

Biološki efekti nejonizujućih zračenja variraju u zavisnosti od frekvencije i intenziteta zračenja, načina emitovanja i ekspozicije organizma, kao i od bioloških osobina ozračivanog organizma.

Ljudi su oduvek znali da vidljiva svetlost ima presudan uticaj na rast i razvoj biljaka. Od 1842. godine, kada je nemački fiziolog Robert Majer zaključio da biljke vrše konverziju svetlosne energije u hemijsku, proces kasnije nazvan fotosinteza postao je jedan od najviše proučavanih biohemijskih procesa kod biljaka. Živi organizmi na Zemlji su iznenada, pojavom „ozonske rupe“ postali izloženi većim dozama UV-B zračenja (280-315 nm). Utvrđeno da UV-B zračenje vrši negativan uticaj na fotosintezu, oštećuje DNK, proteine, membranske sisteme, dovodi do pojave oksidativnog stresa itd. tako da kod senzitivnijih genotipova dovodi do smanjenja prinosa (Strid i sar., 1994).

Mnogobrojna istraživanja uticaja elektromagnetnih polja krajnje niskih frekvencija (ELF) na biljke ukazivala su na podsticajno dejstvo ovog zračenja na mnoge fiziološke procese u biljkama, ali taj fenomen još uvek nije na zadovoljavajući način objašnjen. Metoda rezonantno impulsne elektromagnetne stimulacije (RIES) zasnovana je na uticaju ELF polja određenih frekvencija na biljke. Ispitivanjem uticaja ELF polja na biljke utvrđeno je da:

- ELF polja utiču na različite fiziološke procese, rast i razviće biljaka, ćelijsku diferencijaciju, jonsku izmenu, sintezu DNK, RNK i proteina (WHO, 1989),
- elektromagnetna stimulacija semena utiče na aktiviranje određenih enzima i enzimskih kompleksa kao i na strukturu slobodnih molekula vode (Petrović i sar., 2002),
- primena metode RIES u biljnoj proizvodnji povećava količinu i kvalitet prinosa gajenih biljaka (Marinković i sar., 1997).

Za razliku od zračenja elektronima koje ima jonizujuće dejstvo na materiju (Mijatović, 2002) tzv. e-tretiranje (elektronsko tretiranje) ne pokazuje jonizujuće dejstvo i apsolutno je bezbedno za tretiranje semena radi zaštite od patogena. Elektronsko tretiranje podrazumeva primenu nisko-energetskih elektrona. S' obzirom da se većina patogena nastanjuje u semenjači, energija elektrona je tako definisana da prodire samo u omotač semena, ali ne dublje. To dovodi do uništavanja mikroorganizama bez mogućnosti pojave rezistencije i kontaminacije životne sredine, a embrion zrna ostaje netaknut tako da ne dolazi do fitotoksičnog i genotoksičnog

dejstva (Röder i sar., 2002). Međutim, za konzervaciju hrane uglavnom se koriste jonizujuća zračenja, a najčešće γ -zračenje (v. poglavlje „Ozračivanje hrane“).

2.2. Mehanizam delovanja γ -zračenja na žive sisteme

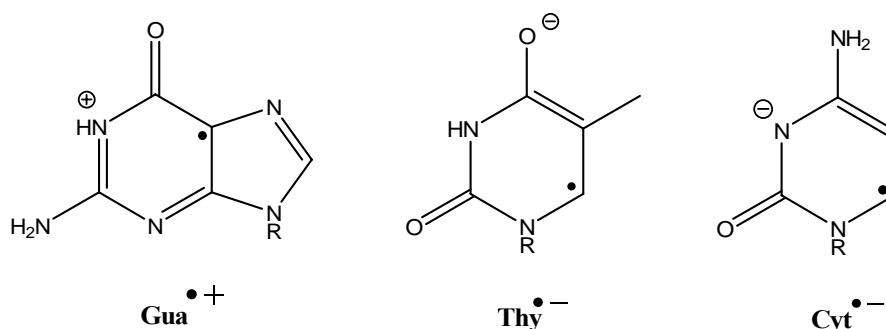
Gama zračenje obuhvata oblast najvećih energija u elektromagnetnom spektru, počevši od energije od 100 keV, odnosno talasne dužine manje od $1 \cdot 10^{-11}$ nm. Gama zračenje, zajedno sa α - i β -zračenjem nastaje pri radioaktivnom raspadu. Za razliku od α - i β -zračenja, γ -zračenje je prodornije ali je slabije jonizujuće tako da ima nisku vrednost LET. Akutne letalne doze variraju u zavisnosti od biološke vrste. Primitivniji organizmi su daleko tolerantniji na delovanje jonizujućih zračenja od organizama na višem evolutivnom stupnju. Doze γ -zračenja veće od 3 Gy su letalne za čoveka (Luckey, 1991). Više biljke u zavisnosti od vrste mogu da podnesu akutne doze u rasponu od 10 do par stotina Gy (Kljajić, 2002).

Oštećenja strukture DNK određuju najvažnije biološke posledice delovanja γ -zračenja. Biološki efekti γ -zračenja se mogu podeliti na dve grupe, direktne i indirektne. Direktne efekti zračenja nastaju direktnom jonizacijom DNK dok su indirektni efekti rezultat nastajanja visokoreaktivnih hemijskih vrsta nastalih radiolizom vode (Bernhard i Close, 2004). Von Sonntag (1987) je ustanovio da direktne efekti izazivaju oko 40%, a proizvodi radiolize vode oko 60% promena u strukturi DNK.

Hidratacioni omotač DNK sadrži u proseku 20-22 molekula vode po nukleotidu od kojih je 15-17 molekula vode asosovano sa nukleozidom, a 5 molekula sa fosfatnom grupom (Wang i sar., 1994) tako da često nije moguće jasno razdvojiti proizvode koji nastaju direktnom jonizacijom DNK i one koji su nastali jonizujućim dejstvom proizvoda radiolize vode kojom je molekul DNK hidratisan (LaVere, 1996).

2.2.1. Direktne efekti γ -zračenja

Direktni uticaj γ -zračenja na molekul DNK dovodi do njegove jonizacije i nastajanja različitih radikal-katjona i radikal-anjona. Pomoću ESR spektroskopije utvrđeno je da radikali nisu ravnomerno raspoređeni u molekul DNK već da su skoncentrisani na azotnim bazama. Ustanovljeno je da na niskim temperaturama elektrone u većoj meri vezuje citozin, a u manjoj timin. Na višim temperaturama elektrone uglavnom vezuje timin. Radikal-katjoni se gotovo isključivo nalaze na guaninu. Na slici 2. predstavljeni su neki od slobodnih radikala koji se formiraju u molekul DNK prilikom ozračivanja.



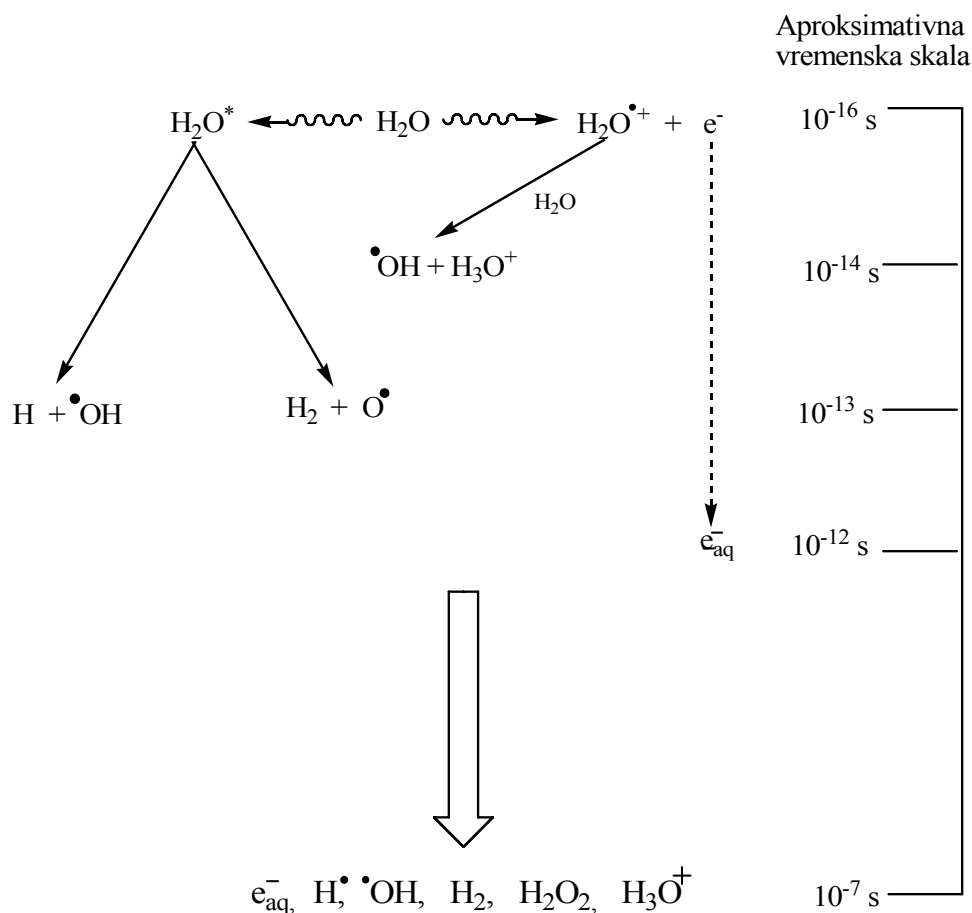
Slika 2. Strukture slobodnih radikala izvedenih iz guanina (Gua^{•+}), timina (Thy^{•-}) citozina (Cyt^{•-}), (Bernhard i Close, 2004).

Sevilla i saradnici (1991) su pomoću ESR spektroskopije ustanovili da na 77 K DNK molekul sadrži kao radikal-anjone $\text{Cyt}^{\bullet-}$ (77%) i $\text{Thy}^{\bullet-}$ (23%), a više od 90% radikal-katjona predstavlja $\text{Gua}^{\bullet+}$.

Naelektrisanja nastala na DNK vezivanjem elektrona ili „šupljina“ za pojedine komponente molekula mogu da migriraju duž lanca. Na taj način omogućena je rekombinacija naelektrisanja. Od „provodljivosti“ DNK zavisi u kojoj će meri doći do rekombinacije naelektrisanja. Prema Goodhead (1990) nagomilavanje naelektrisanja na pojedinim delovima DNK (u vidu radikal katjona i anjona) dovodi do krupnih oštećenja na molekulu DNK kao što su jednostrani ili obostrani prekidi lanca.

2.2.2. Radioliza vode, oksidativni stres i indirektni efekti γ -zračenja

Radioliza vode predstavlja proces razlaganja vode pod uticajem jonizujućeg zračenja. Indirektni efekti jonizujućeg zračenja su rezultat reakcija u kojima učestvuju visokoreaktivni intermedijeri radiolize vode.



Slika 3. Šematski prikaz radiolize vode i aproksimativne vremenske skale procesa koji se pri radiolizi odigravaju (Buxton, 2004)

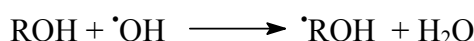
Jonizacija molekula vode izazvana fotonom visoke energije dovodi do izbijanja elektrona i do nastajanja radikal-katjona vode ($\text{H}_2\text{O}^{\bullet+}$). Radikal-katjon vode je jaka kiselina koja nakon deprotonacije daje HO^\bullet . Oslobođeni elektron gubi svoju kinetičku energiju izazivajući nove jonizacije i ekscitacije sve dok se ne hidriše (e_{aq}^-). U toku radiolize vode, pored HO^\bullet i e_{aq}^- , nastaju takođe i manje količine H-atoma, H_2O_2 i H_2 . Primarni proizvodi radiolize nastaju u vremenskom intervalu od

10^{-16} - 10^{-12} s (Slika 3). Oni zatim podležu difuziji iz regiona gde su primarno nastali (10^{-7} s) i dovode do sekundarnih reakcija (Von Sonntag, 1987).

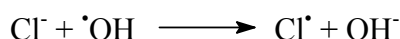
Hidroksil-radikal je moćan oksidans, sa redoks potencijalom od 2,7 V u kiseloj sredini pa se stoga smatra najreaktivnijim slobodnim radikalom u biološkim sistemeima i najznačajnijim uzročnikom oksidativnog stresa (Halliwell, 1984). Stanje oksidativnog stresa nastaje u uslovima pojačanog stvaranja HO^\bullet i ostalih kiseoničnih radikala kada antioksidantni sistem više nije u stanju da zaštiti ćeliju od prooksidativnih procesa (Sies, 1986). Poluživot HO^\bullet je izuzetno kratak (10^{-9} s). Hidroksil-radikal može reagovati praktično sa svim strukturama u živoj ćeliji (šećeri, amino-kiseline, fosfolipidi, purinske i pirimidinske baze i organske kiseline) u radijusu od svega nekoliko nanometara od mesta nastajanja (Đorđević i sar., 2000).

Hidroksil-radikal sa različitim molekulima može da reaguje na tri načina:

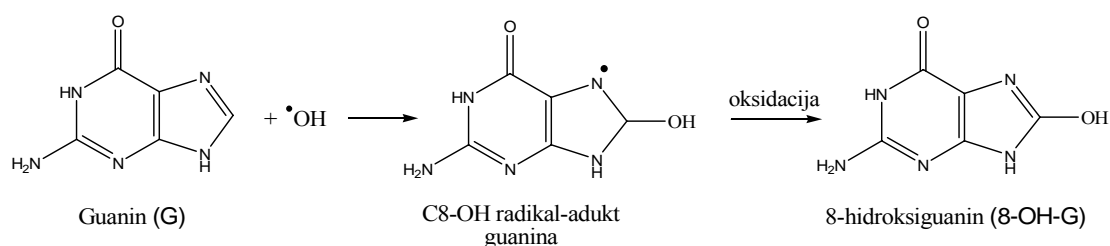
- Primanjem vodonika, npr. od molekula alkohola:



- Primanjem elektrona od nekog organskog ili neorganskog molekula ili jona:

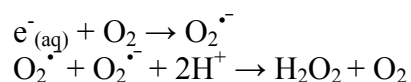


- Adicijom $\text{}^\bullet\text{OH}$ na molekul i građenjem hidroksil radikal-adukta (Slika 4).

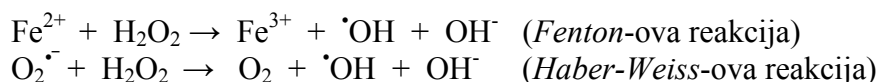


Slika 4. Reakcija hidroksil radikala sa guaninom kada nastaje 8-hidroksiguanin

Kao sekundarni proizvod radiolize vode, moguće je građenje superoksid-radikala ($\text{O}_2^{\bullet-}$), (Buxton, 2004) koji nije naročito postojan zbog reakcije dismutacije:



Do oksidativnih oštećenja biomolekula izloženih reaktivnim kiseoničnim vrstama kao što su $\text{O}_2^{\bullet-}$ i H_2O_2 dolazi usled njihovog prevodjenja u mnogo reaktivniji $\text{}^\bullet\text{OH}$ (Halliwell i Gutteridge, 1989):

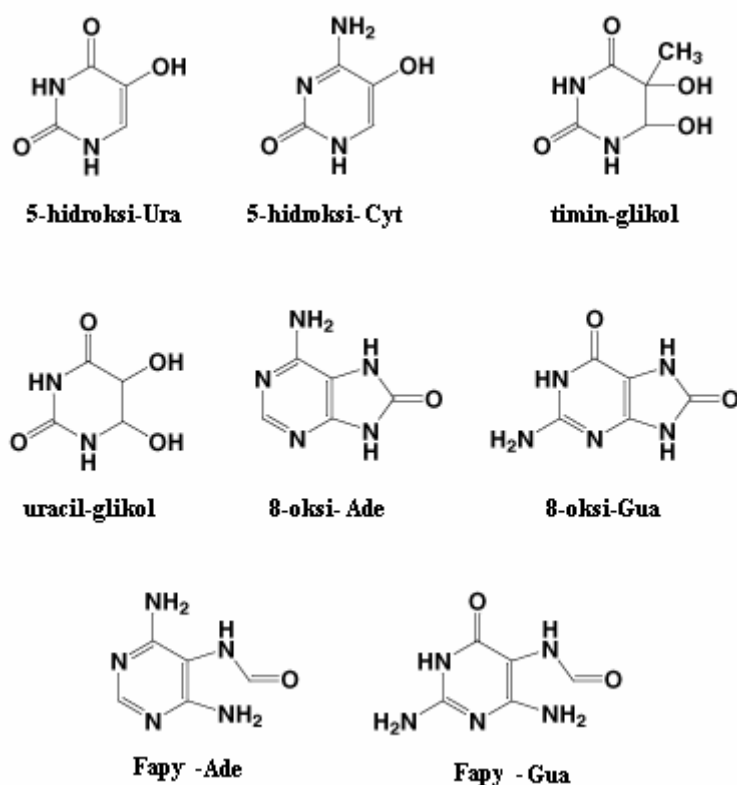


Najčešći tipovi prooksidativnih oštećenja strukture DNK su sledeći:

- prekid lanca DNK (jednostrani ili obostrani),
- interakcija baza unutar jedne ili između dve različite DNK spirale,
- izmena, gubitak ili modifikacija baze,
- stvaranje pirimidin-dimera,

- stvaranje masovnih prepreka unutar DNK lanca,
- interakcija sa proteinima,
- interakcija sa lipidnim peroksidima (MDA),
- interakcija sa proizvodima glukooksidacije i
- oksidativna modifikacija dezoksiriboze.

Na slici 5. predstavljene su strukture najčešćih proizvoda oksidacije purinskih i pirimidinskih baza u uslovima oksidativnog stresa.



Slika 5. Strukture najvažnijih proizvoda oksidacije purinskih i pirimidinskih baza u uslovima oksidativnog stresa

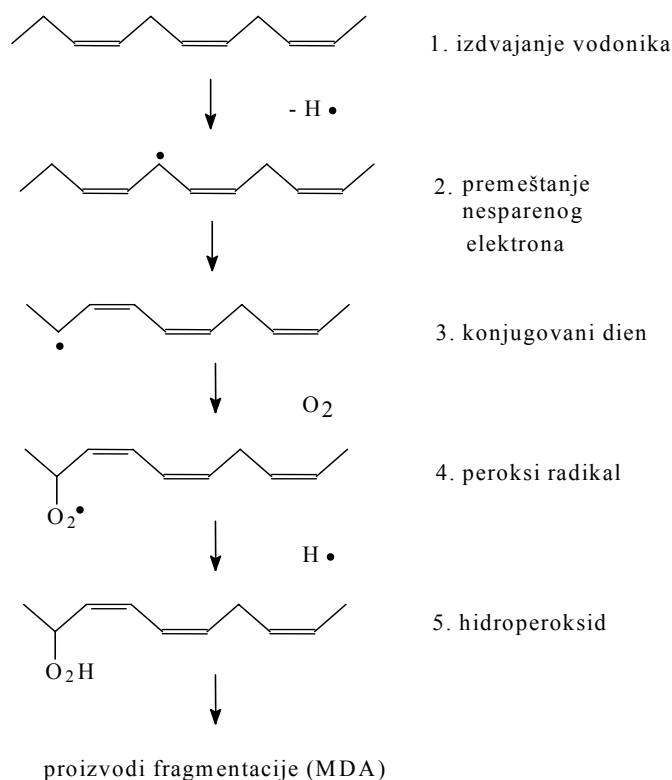
Iako je DNK biološki najvažnija meta za delovanje kiseoničnih radikala, u uslovima oksidativnog stresa značajnu štetu trpe takodje lipidi i proteini.

2.2.2.1. Lipidna peroksidacija

Lipidna peroksidacija je oksidativno oštećenje koje zahvata ćelijske membrane, lipoproteine i druge molekule koji sadrže lipide u uslovima postojanja oksidativnog stresa. Jednom započeta reakcija lipidne peroksidacije se nastavlja autokatalitički, ima progresivni tok i dovodi do strukturno-funkcionalnih promena supstrata.

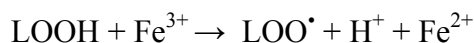
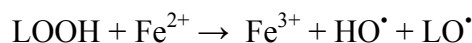
Ozračivanjem lipida *in vitro*, prvo dolazi do jonizacije i ekscitacije, a zatim i do različitih tipova reakcija kao što su dimerizacija, disocijacija, dekarboksilacija, izomerizacija itd. Poznato je da ozračivanje lipida u prisustvo kiseonika ubrzava oksidaciju lipida. Reaktivne kiseonične vrste nastale *in situ* mogu reagovati sa nezasićenim masnim kiselinama izazivajući peroksidaciju membranskih lipida.

Lipidi ćelijske membrane (fosfolipidi, glikolipidi i holesterol) predstavljaju najčešće supstrate u procesu lipidne peroksidacije. Peroksidativna oštećenja plazmaleme dovode do povećanja propustljivosti ćelije (engl. „leakage“), brze desikacije i smrti ćelije (Scandalios, 1993). Halliwell (1984) navodi da su bočni nizovi masnih kiselina skloni lipidnoj peroksidaciji, gde O_2 reaguje sa konjugovanim dienima. Rezultat ove reakcije je nastanak lipidnih peroksida (LOO^\bullet) koji mogu oduzeti vodonikov atom sa drugog lanca masne kiseline, čime lančana reakcija ulazi u fazu propagacije (slika 6).



Slika 6. Mehanizam peroksidacije polinezasićenih masnih kiselina membranskih lipida (Halliwell, 1984)

Lipidni hidroperoksidi ($LOOH$) koji nastaju u reakciji razlažu se potom do aldehida (najčešće malonildialdehida) i isparljivih ugljovodonika (etan, pentan), ali takođe predstavljaju i potencijalne izvore za stvaranje visokoreaktivnog HO^\bullet kao i LO^\bullet (alkoksi-) i LOO^\bullet (peroksi-) radikala u prisustvu jona Fe^{2+} i Fe^{3+} :



Alkoksi radikal je reaktivniji od peroksi radikala, međutim oba radikala su odgovorni za dalju propagaciju procesa lipidne peroksidacije. Daljom kompleksnom razgradnjom alkoksi i peroksi radikala nastaju sekundarni proizvodi lipidne peroksidacije. Peroksidi i njihovi degradacioni proizvodi izazivaju velika oštećenja enzima i membrana čime smanjuju njihovu električnu otpornost, fluidnost i integritet (Halliwell, 1984). Aldehidi, a naročito MDA, mogu da reaguju sa amino-grupama

proteina gradeći intra- i inter-molekulske unakrsne veze menjajući na taj način strukturno-funkcionalna svojstva proteina.

2.2.2.2. Oksidativna modifikacija proteina

Davno je ustanovljeno da jonizujuće zračenje dovodi do kidanja peptidnih veza i do modifikacije strukture proteina. Najvažnije *in vitro* reakcije ozračenih aminokiselina su dekarboksilacija i oksidativna (u prisustvu kiseonika) ili reduktivna (u slučaju anoksije) dezaminacija (Diehl, 1995). Aminokiseline koje sadrže sumpor (cistein, cistin i metionin) mogu reagovati kao skevindžeri slobodnih radikala i na taj način protektivno delovati na ostale komponente hrane.

Reakcije modifikacije strukture proteina pod dejstvom slobodnih radikala odvijaju se u *in vivo* uslovima i odgovorne su za fiziološki proces starenja kao i za degradaciju i obnavljanje proteina. Oksidativna modifikacija proteina u uslovima oksidativnog stresa je brza i linearna pa je stoga senzitivniji indikator oksidativnog stresa od lipidne peroksidacije (Stadtman, 1990).

Usled oksidativne modifikacije proteina menja se njihova struktura što dovodi i do izmene njihove aktivnosti i funkcije. Prema Stadtman (1990) postoje sledeći tipovi oksidativnih oštećenja proteina i enzima:

- gubitak katalitičke funkcije,
- modifikacija amino-kiselina,
- građenje karbonilnih grupa,
- povećanje aciditeta,
- konverzija metionina u metionin sulfoksid,
- smanjenje termičke stabilnosti,
- promena viskoznosti,
- promena fluorescencije,
- fragmentacija,
- agregacija (građenje međuproteinskih veza),
- građenje S-S mostova i
- povećanje proteolitičke osetljivosti.

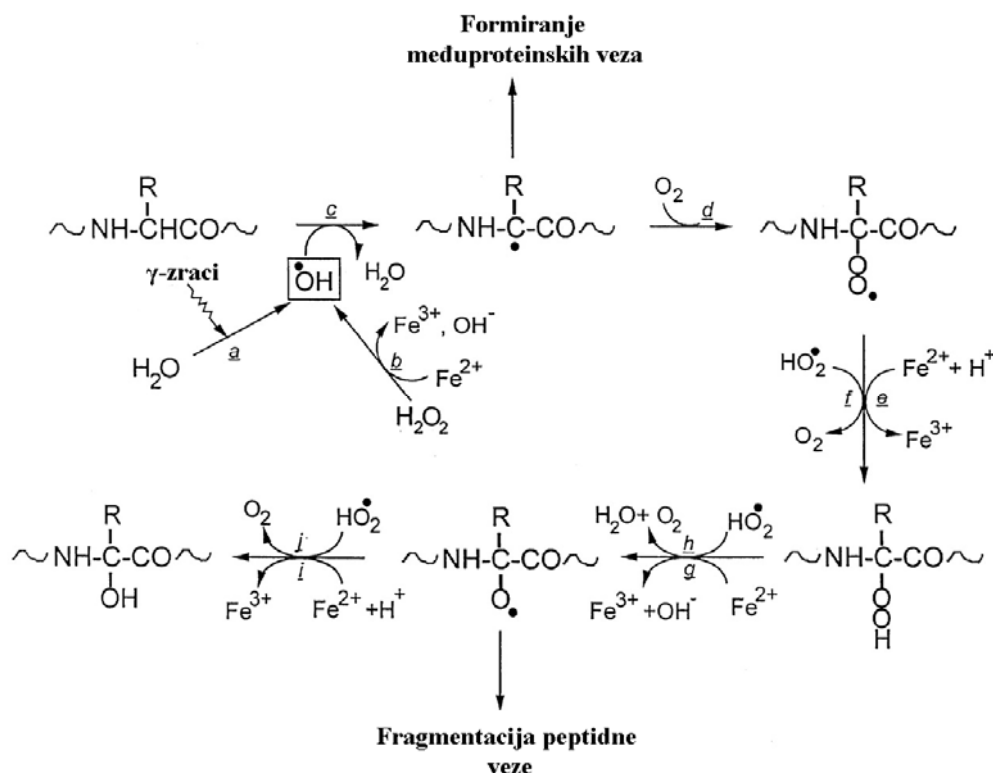
U tabeli 1. prikazane su najčešće oksidativne modifikacije nekih od aminokiselina koje su veoma podložne oksidaciji prema Đorđević i saradnicima (2000):

Tabela 1. Oksidativne modifikacije nekih aminokiselinskih ostataka

Aminokiselinski ostatak	Oksidativno modifikovan aminokiselinski ostatak
Arginil	Glutamilsemialdehid
Prolil	Glutamilsemialdehid Piroglutamil/Glutamil Cis/Trans-4-hidroksiprolil
Lizil	α -Amino adipilsemialdehid
Histidil	Asparaginil/Aspartil
Cisteinil	Disulfidne veze (-S-S-)
Metionil	Metionilsulfoksid
Tirozil	Tirozil-Tirozil interakcija

U uslovima delovanja pojačanog γ -zračenja sve amino-kiseline podležu modifikacijama, a najviše, aromatične amino-kiseline (tirozin, fenil-alanin, triptofan i histidin) kao i metionin i cistein (Stadtman, 1990).

Na slici 7. prikazane su reakcije koje dovode do oksidacije peptidne veze pod uticajem kiseoniknih slobodnih radikala.



Slika 7. Oksidacija proteina pod uticajem kiseonikovih slobodnih radikala (Berlett i Stadtman, 1997)

Kao što se vidi na slici 7. oksidacija peptidne veze započinje napadom $\cdot\text{OH}$ radikala na α -C atom peptidne veze kada nastaje C-centrirani organski radikal (Reakcija c). Hidroksil radikal koji inicira razgradnju peptidne veze može nastati radiolizom vode ili Fenton-ovom reakcijom (Reakcije a i b). C-centrirani radikal brzo podleže reakciji sa molekulskim kiseonikom kada nastaje peroksi radikal (Reakcija d). U prisustvu hidroperoksi radikala ($\text{HO}_2\cdot$), peroksi radikal preko intermedijera alkilperoksida (Reakcija f) i alkoksi radikala (Reakcija h) daje hidroksil-protein derivat kao konačni proizvod. Pored $\text{HO}_2\cdot$, katalitičko prisustvo Fe^{2+} može da dovede do istog proizvoda (Reakcije e, g i j), hidroksi derivata proteina. C-centrirani radikali koji nastaju u prvom koraku (Reakcija c) mogu da reaguju među sobom što dovodi do nastajanja međuproteinskih veza i kasnije agregacije proteina. Međuproizvodi u reakciji su podložni, takođe i fragmentaciji koja dovodi do nastajanja karbonilnih derivata.

Reaktivni aldehidi koji su proizvod lipidne peroksidacije kao što su malonildialdehid, glioksal, 4-hidroksinonenal, mogu da reaguju sa amino-grupama proteina. Najčešće toj reakciji podleže ϵ -amino grupa lizina (Cooper, 1985). Jedan od značajnijih tipova oksidativne modifikacije proteina jeste i tzv. karbonilni stres (Lyons i Jenkins, 1997) kada sa proteinima reaguje glukoza ili njeni karbonilni

derivati uz učešće kiseoničnih radikala. Posledica oksidativne modifikacije proteina je da oni postaju podložniji proteolitičkoj razgradnji.

2.3. Antioksidantni sistem biljaka

Reaktivne kiseonične vrste (ROS), kao što su superoksid-radikal ($O_2^{\cdot-}$), vodonik-peroksid (H_2O_2), hidroksil-radikal ($\cdot OH$) i singlet kiseonik (1O_2), kontinuirano nastaju u ćelijama izloženim aerobnom okruženju, a pojačano se stvaraju u uslovima oksidativnog stresa. Pojava ovih toksičnih vrsta kod biljaka uslovljava poremećaje u rastu i razviću, dovodi do oštećenja pojedinih ćelijskih komponenti i peroksidacije membranskih lipida.

Da bi se zaštitile od oksidativnih oštećenja izazvanih reaktivnim kiseoničnim vrstama, biljke su tokom evolucije razvile antioksidantni sistem zaštite koji obuhvata antioksidantne enzime i neenzimske antioksidante. Od enzima koji učestvuju u antioksidantnoj zaštiti do danas su u biljkama najviše proučeni superoksid-dizmutaza, katalaza, peroksidaza, askorbat-peroksidaza, glutathion-reduktaza itd. Enzimi predstavljaju tzv. prvu liniju antioksidantne zaštite. Neenzimski antioksidanti su niskomolekularna organska jedinjenja iz grupe sekundarnih biomolekula. To su sulfhidrilna jedinjenja kao npr. tripeptid glutathion (GSH), različite fenolne strukture, tokoferoli, karotenoidi, L-askorbinska kiselina, terpeni i njihovi glikozidi i neki drugi sekundarni biomolekuli. Navedena jedinjenja čine antioksidantni sistem koji održava reaktivne kiseonične vrste u niskoj koncentraciji u ćelijama i tkivima i time sprečava nastanak oksidativnog stresa.

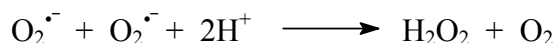
Prema rastvorljivosti u lipidima neenzimski antioksidanti se dele na lipo- i hidrosolubilne. Ova osobina određuje mesto njihovog delovanja. Liposolubilni deluju u lipidnoj fazi ćelijske membrane i membrana subcelularnih organela. Hidrosolubilni deluju u vodenoj fazi, ostvarujući interakciju sa liposolubilnim antioksidantima na graničnoj površini membrana.

Sistem antioksidantne zaštite, takođe, obuhvata enzimске antioksidante koji učestvuju u reparaciji nastalih oksidativnih oštećenja lipida, proteina, ugljenih hidrata i nukleinskih kiselina.

2.3.1. Antioksidantni enzimi

Antioksidantni enzimi imaju ključnu ulogu u antioksidantnoj zaštiti. U ovom radu biće razmatrana četiri enzima: superoksid-dizmutaza, peroksidaza, katalaza i glutathion-peroksidaza.

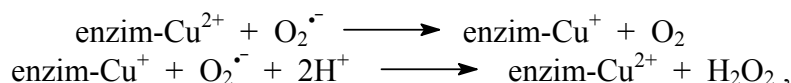
Superoksid-dizmutaza (SOD; EC 1.15.1.1). Mann i Kellin su 1938. godine izolovali protein sa bakrom i nazvali ga hemokuprein. McCord i Fridovich su trideset godina kasnije (1969), utvrdili da ovaj protein ima enzimsku aktivnost i da katalizuje reakciju dismutacije $O_2^{\cdot-}$ na sledeći način:



U fiziološkim uslovima ova reakcija se odvija i bez enzimске katalize veoma brzo, dok je SOD ubrzava do $2 \cdot 10^9$ mol s^{-1} . Superoksid-dizmutaze su prisutne u svim aerobnim organizmima (Larson, 1988).

Svi SOD enzimi su metaloproteini koji u aktivnom centru sadrže različite metalne jone. U zavisnosti od prisutnog metalnog jona dele se na: Cu, Zn-SOD, Mn-SOD i Fe-SOD.

Cu, Zn-SOD je dimerni protein sastavljen iz dve identične subjediniče gde svaka u aktivnom centru sadrži jedan jon Cu^{2+} i jedan jon Zn^{2+} . Cu^{2+} menja valentno stanje između +2 i +1, katalizujući reakciju dismutacije $\text{O}_2^{\cdot-}$:

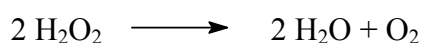


dok Zn^{2+} utiče na stabilnost proteina. Relativna molekulska masa Cu, Zn-SOD je 32 kD. Nalazi se većinom u citosolu i hloroplastima eukariotskih ćelija. Enzim se ireverzibilno inhibira sa H_2O_2 , a reverzibilno cijanidom (Scandalios, 1993). Aktivan je u opsegu pH vrednosti 5,3-10,5 (Štajner, 1990).

Mn-SOD je dimerni protein u prokariotskim ćelijama, a tetrameran protein u mitohondrijama i izvesnim termofilnim bakterijama. Molekulska masa iznosi 40 kD a optimalna pH vrednost 7,8-10 (Jovanović, 1993).

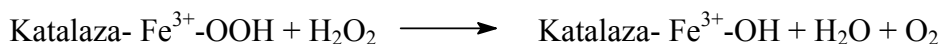
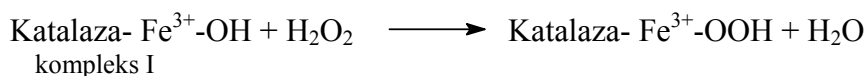
Fe-SOD je protein sa jednim jonom Fe^{3+} u aktivnom mestu. Sadrže ga prokarioti i u manjoj meri više biljke. Javlja se kao dimerni i tetramerni protein molekulske mase 38-48 kD. Optimalne pH za njegovu aktivnost su između 7,8-9 (Štajner, 1990; Almansa i sar., 1994).

Katalaza (CAT; EC 1.11.1.6). Thernard je 1918. god. izolovao enzim katalazu iz goveđe jetre i dokazao da on katalizuje reakciju:



Aktivnost katalaze je dokazana u humanim, biljnim i animalnim tkivima (Matkovics i sar., 1977; Simon i sar., 1974). Veliki broj biljnih vrsta kao što su pšenica, kukuruz, spanać, mrkva, paradajz, šećerna repa itd. sadrži katalazu, dominantno lociranu u peroksizomima. Kod životinja, katalaza je prisutna u svim organima i telesnim tečnostima, a naročito u jetri i eritrocitima.

Mehanizam katalitičkog razlaganja H_2O_2 dejstvom katalaze je:

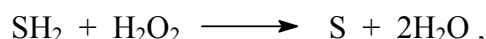


Pored katalazne aktivnosti, dokazano je da kompleks I poseduje i peroksidazna svojstva. Tako, na primer, može da oksiduje nitrite i nitrate (Jones, 1982). Katalaza je aktivna u intervalu pH vrednosti 5,0-10,0, a može se inhibirati dejstvom azida, cijanida i aminotriazola.

Po strukturi, katalaza pripada hemoproteidima. Sastoji se iz četiri identične subjediniče, ukupne molekulske mase od 282,4 kDa. Katalaza se sastoji iz više izoenzima koji su razdvojeni elektroforezom i izoelektričnim fokusiranjem (Goth, H., 1988).

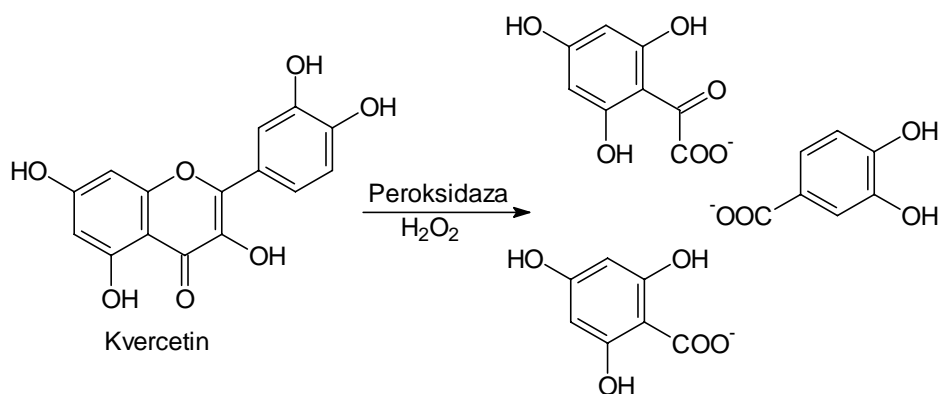
Peroksidaza (Px; EC 1.11.1.7). Px je enzim iz grupe oksido-reduktaza koji katalizuje oksidaciju širokog spektra supstrata (SH_2) u prisustvu peroksida.

Peroksidaze su prisutne u velikom broju izoenzima u različitim tkivima i ćelijskim organelama. Supstratna specifičnost peroksidaza je relativno niska, suprotno njihovoj visokoj specifičnosti za H_2O_2 :



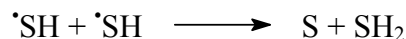
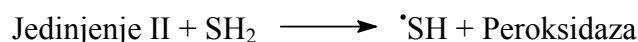
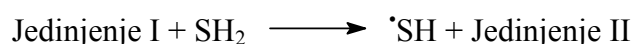
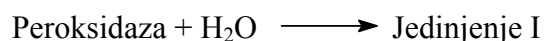
Supstrati peroksidaza mogu biti različita fenolna jedinjenja (Eltner, 1994), mravlja i askorbinska kiselina, citohrom c, NADH itd. (Štajner, 1990). Px je monomerni protein molekulske mase 40 kD (Salin, 1988) sa protoporfirinom IX kao prostetičnom grupom i Fe^{3+} u aktivnom centru. Aktivan je u intervalu pH vrednosti 4-10, lokalizovan u organelama gde je povećana produkcija kiseoničnih radikala (peroksizomi, glioksizomi).

Smatra se da je Px vezana za ćelijske zidove gde stvara fenoksi jedinjenja iz cimetine kiseline koja zatim polimerizuju u procesu lignifikacije. Destrukcija flavonoida izazvana aktivnošću Px je proces koji dovodi do gradjenja hidroksibenzoata i hidroksicinamata, nastalih iz prstena A i B molekula flavonoida (slika 20.).



Slika 20. Oksidativna degradacija flavonoida katalizovana Px

U zavisnosti od vrste supstrata postoje različite peroksidaze: glutation-peroksidaza, citohrom-c-peroksidaza, NADH-peroksidaza, „nespecifične“ peroksidaze itd. „Nespecifične“ peroksidaze su rasprostranjene u tkivima mnogih biljaka i gljiva, a nisu bitnije zastupljene u tkivima životinjama (Demerevska-Kepova i sar., 1986). Nespecifične peroksidaze su dokazane u mnogim vrstama biljaka, kikiriki, spanać, ječam, pšenica itd. Najbolje ispitana „nespecifična“ peroksidaza je peroksidaza rena koja katalizuje oksidaciju supstrata prema sledećem mehanizmu:

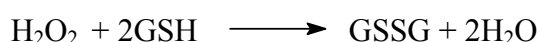


Mehanizam delovanja ovog enzima pretpostavlja dvoelektronsku oksidaciju peroksidaze vodonik-peroksidom pri čemu u prvoj fazi nastaje jedinjenje I. U sledeća

dva koraka dolazi do jednoelektronske oksidacije po jednog molekula supstrata (SH₂) kojom nastaju supstrat radikali (•SH). Jedinjenje II je intermedijerno stanje enzima. Supstrat radikali na kraju podležu reakciji disproporcionisanja.

Glutation-peroksidaza (GSH-Px, EC 1.11.1.9.). GSH-Px je enzim otkriven u animalnim tkivima 1957. god. Ovaj enzim nije prisutan u višim biljkama, ali je izolovan iz nekih algi i gljiva. Za glutacion-peroksidaznu aktivnost kod biljaka su odgovorne nespecifične peroksidaze koje kao supstrat mogu da koriste glutacion (Navari-Izzo i sar., 1997). Glutacion je tiolno jedinjenje, peptidne strukture.

Glutacion-peroksidaza katalizuje reakciju oksidacije glutaciona u oksidovani oblik (GSSG) u prisustvu vodonik-peroksida:



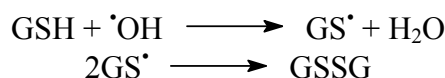
Veći deo glutaciona u živoj ćeliji je prisutan u redukovanom obliku, kao GSH, a manji u oksidovanom obliku kao GSSG. Jedan deo glutaciona nalazi se u obliku mešanih disulfida sa drugim jedinjenjima koja sadrže sulfhidrilnu grupu.

Glutacion-peroksidaza je tetramerni enzim, a svaka subjedinica u aktivnom centru sadrži po jedan jon Se u obliku selenocisteina.

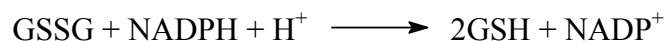
2.3.2. Neenzimski antioksidanti

Od neenzimskih antioksidanata, u daljem tekstu će biti razmatrana sledeća jedinjenja: redukovani glutacion, fenolna jedinjenja, vitamini C i E.

Redukovani glutacion (GSH). Tripeptid glutacion (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicin) je najzastupljenije tiolno jedinjenje kod većine biljnih vrste. GSH je donor elektrona i njegova funkcija se ogleda u dve vrste reakcija u kojima učestvuje. S jedne strane, GSH može da kompleksira toksične jone teških metala i skladišti ih u vakuolama, dok druga vrsta reakcija podrazumeva aktivnost GSH u uklanjanju reaktivnih kiseoničnih vrsta pri čemu se prevodi u oksidovanu formu, glutacion disulfid, GSSG. Glutacion veoma brzo reaguje sa hidrosil- radikalima dajući GS• radikale, manje reaktivne od hidrosil-radikalala, ali takodje nepoželjne u biološkim sistemima:



GSSG se može redukovati nazad do GSH dejstvom glutacion-reduktaze (GR, EC 1.6.4.2.), koja je NADPH zavisni enzim:

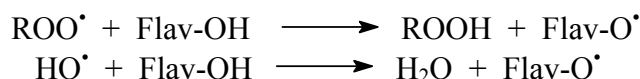


Ovaj enzim je izuzetno značajan u sistemu antioksidantne odbrane ćelije zato što obezbeđuje potrebnu količinu GSH za delovanje glutacion-peroksidaze i glutacion S-transferaze.

Glutacion S-transferaza (GST, EC 2.5.1.18.). GST je grupa detoksikacionih enzima, identifikovanih 1961. godine, koji zbog svojih mnogostrukih funkcija pripadaju sistemu antioksidantne zaštite. Ovi enzimi štite ćeliju od alkilujućih elektrofilnih jedinjenja, katalizujući njihovu ireverzibilnu konjugaciju sa GSH.

GSH štiti -SH grupe enzima, ima ulogu u indukciji odbrambenih gena i uključen je u zaštitu biljaka od fotooksidativnog stresa tokom zime, tj. učestvuje u povećanju otpornosti biljaka na niske temperature (Miladinović, 2000).

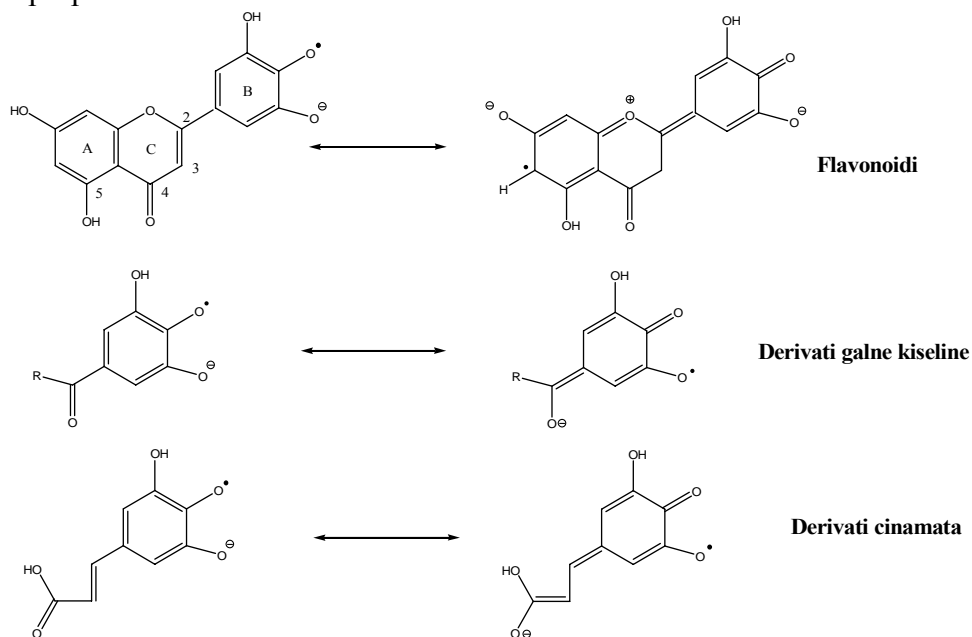
Fenolna jedinjenja. Jedinjenja klase biljnih fenola su prirodni proizvodi antioksidantnih svojstava, široko rasprostranjeni u biljnom svetu. Najvažniji predstavnici su flavonoidi, fenil-propanoidi i fenolne kiseline. Flavonoidi su izgrađeni iz dva hidroksilovana i/ili metoksilovana aromatična prstena (slika 10), što im daje sposobnost „hvatanja“ (engl. scavenge) slobodnih peroksi- i hidroksil-radikala:



Ovaj efekat se vezuje za prisustvo 3',4'-hidroksilnih grupa u prstenu B, kao i dvostruke veze u prstenu C u strukturi mnogih flavonoida. Hidroksilne grupe su mesto vezivanja radikala, dok je dvostruka veza u konjugaciji sa C-4 karbonilnom funkcijom u prstenu C odgovorna za delokalizaciju elektrona prstena B.

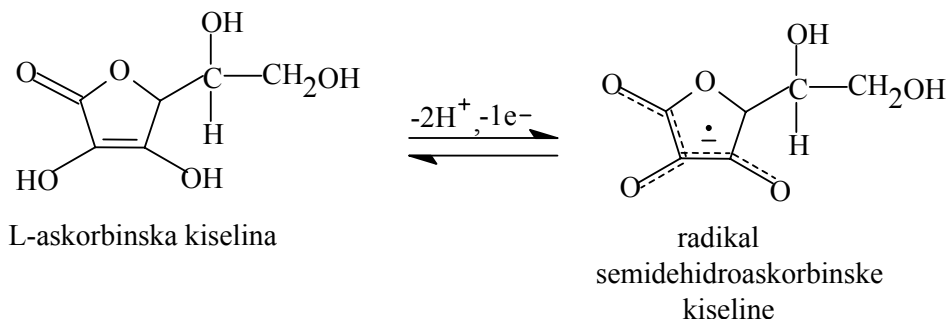
Sa druge strane, flavonoidi su metal-helatirajući agensi koji mogu vezivati jone Fe, čime suzbijaju *Fenton*-ovu reakciju koja se smatra najvažnijim putem nastanka toksičnih kiseoničnih radikala.

Pored ovoga, flavonoidi mogu delovati i kao snažni „hvatači“ $\text{O}_2^{\bullet-}$ i „gasioci“ $^1\text{O}_2$. Zbog sličnih strukturnih karakteristika mnogi fenil-propanoidi se također smatraju aktivnim antioksidantima biljaka. Istraživanja brojnih autora su pokazala da kafena, hlorogenska i cimetna kiselina snažno inhibiraju nastanak peroksida, pri čemu je kafena kiselina pokazala veću antioksidantnu aktivnost od sintetičkog antioksidanta BHT. Smatra se da je ovo posledica prisustva 3',4'-hidroksilnih grupa vezanih za aromatični prsten u molekulu. Na slici 8. su predstavljeni načini stabilizacije ariloksi radikala nastalih antioksidantnim delovanjem flavonoida i derivata galne i cinamata kiseline.

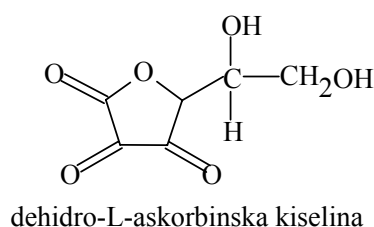


Slika 8. Rezonancijski hibridi pojedinih ariloksi-radikala

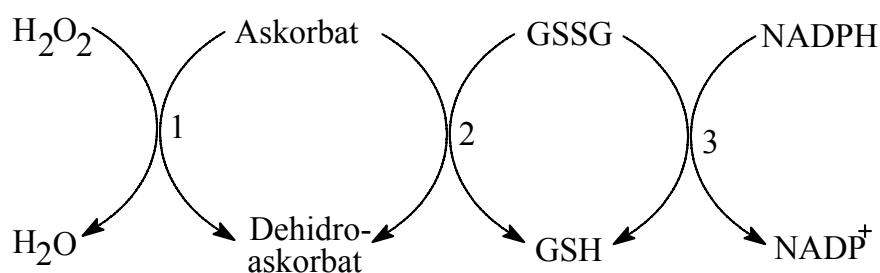
Vitamin C (askorbinska kiselina). Askorbinska kiselina je prisutna u hloroplastima, citoplazmi, vakuolama i apoplastičnom prostoru ćelija listova u visokim koncentracijama. Smatra se najvažnijim hidrofilnim antioksidantom biljaka zbog sposobnosti da reaguje brzo sa većinom kiseoničnih radikala pri čemu nastaje semidehidroaskorbat radikal koji je slabo reaktivan:



Krajnji proizvod oksidacije vitamina C je dehidroaskorbinska kiselina:



Regeneraciju askorbinske kiseline iz oksidovanih formi vrše NADH-semidehidroaskorbat-reduktaza i dehidroaskorbat-reduktaza u prisustvu redukovanog glutationa. Opisani ciklus poznat je kao askorbat-glutation ciklus (Halliwell-Asada put) i odvija se u hloroplastima biljaka. Šema ovog ciklusa predstavljena je na slici 9:

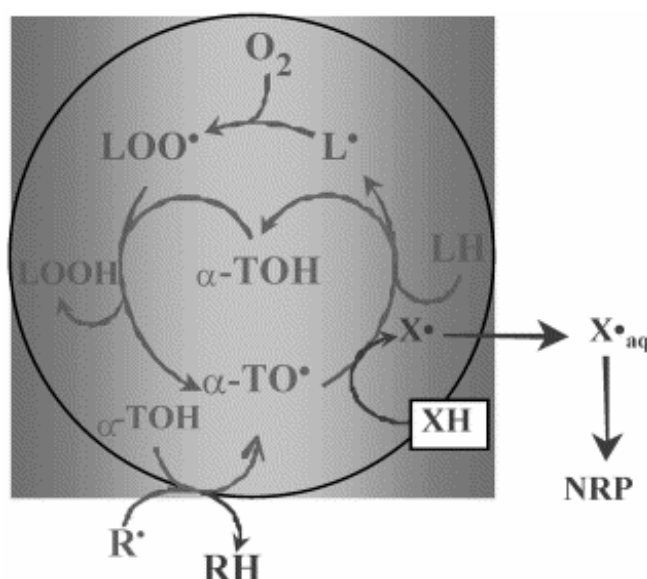


Slika 9. Šema askorbat-glutation ciklusa u hloroplastima (1-askorbat-peroksidaza, 2-dehidroaskorbat-reduktaza, 3-glutation-reduktaza)

U prisustvu jona prelaznih metala, askorbinska kiselina može da deluje prooksidativno (Fukuzava i sar., 1993), međutim, ipak u normalnim uslovima prevladjuje njeno antioksidativno dejstvo. Usled sprege (sinergizma) sa vitaminom E dolazi do povećanja antioksidantnog delovanja askorbinske kiseline.

Vitamin E. Vitamin E je neenzimski lipofilni antioksidant, široko rasprostranjen u prirodi, kako u biljnom tako i u životinjskom svetu. U ćelijama je prisutan u membranama, a naročito u membranama mitohondrija. α , β , γ i δ -tokoferol su strukturni izomeri i predstavljaju različite oblike vitamina E, pri čemu, α -tokoferol poseduje najveću biološku aktivnost. Krajnji proizvod oksidacije tokoferola je α -tokoferil-hinon.

Antioksidantno delovanje α -tokoferola ostvaruje se inhibiranjem peroksidacije lipida i eliminacijom peroksilnog radikala (LOO^\bullet) ili alkil-radikala (L^\bullet) iz lančane reakcije (Slika 10). α -tokoferil-radikal ($\alpha\text{-TO}^\bullet$), koji nastaje univalentnom redukcijom α -tokoferola, redukuje se u prisustvu donora vodonika kao što su askorbinska kiselina (HX) ili redukovani GSH. Radikal semidehidroaskorbinske kiseline (X^\bullet) se dalje metabolizuje u neradikalne proizvode (NRP).



Slika 10. Redoks ciklus α -tokoferola

L^\bullet (alkil-radikal), LOO^\bullet (peroksi-radikal), $\alpha\text{-TO}^\bullet$ (α -tokoferil-radikal), $\alpha\text{-TOH}$ (α -tokoferol), HX (askorbinska kiselina), X^\bullet (radikal semidehidroaskorbinske kiseline), NRP (neradikalni proizvodi)

α -Tokoferol takodje poseduje sposobnost da reaguje sa singletnim oblikom kiseonika i protonovanim oblikom superoksida (HO_2^\bullet) čime u manjoj meri doprinosi suzbijanju lipidne peroksidacije u ćelijskim membranama.

2.4. Oksidativni stres, signalna transdukcija i indukcija antioksidantne aktivnosti kod biljaka

Rast i razviće biljaka su pod uticajem mnogih činilaca spoljašnje sredine koji se i sami neprestano menjaju. Na slici 11. predstavljeni su najvažniji abiotički i biotički uticaji koje su biljke sposobne da prepoznaju na osnovu odgovarajućih signala. S obzirom da biljke nemaju krvotok, svi biljni organi, a često i svaka ćelija ponaosob može da prepozna signale iz spoljašnje sredine i da reaguje na njih. Percepcija signala i biološki odgovor na njih povezani su putevima signalne transdukcije („prenosa signala“) na celularnom i sistemskom (intercelularnom) nivou kao i između različitih organizama (Scheel i Wasternack, 2002).

Činioci spoljašnje sredine:

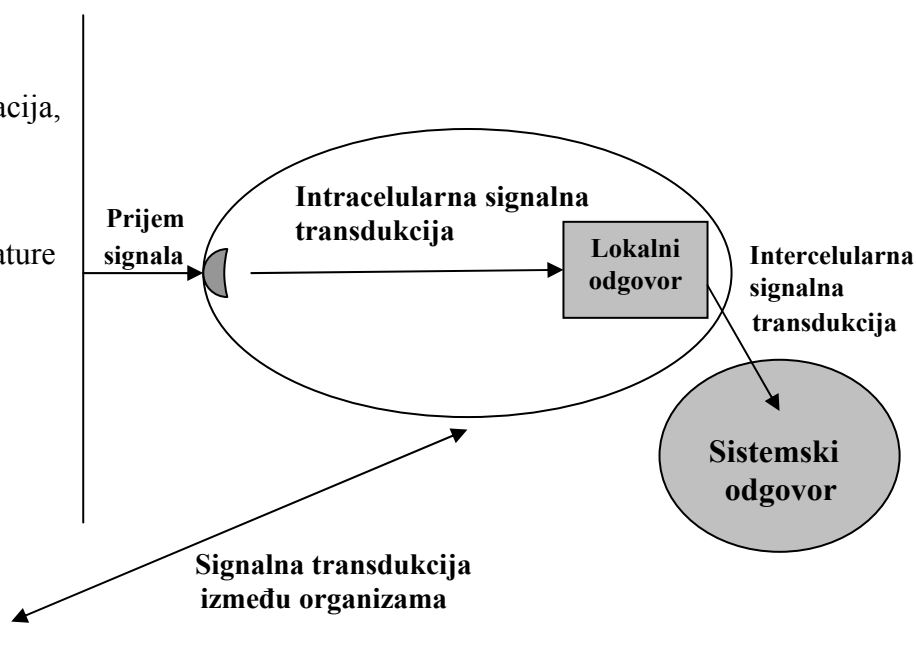
Abiotički:

svetlost/radijacija,
toplota
soli
suša
niske temperature
teški metali
ozon
vetar

Biotički:

patogeni

simbioti
insekti



Slika 11. Šema mehanizma signalne transdukcije

Abiotičke i biotičke signale iz spoljašnje sredine specifično prepoznaju biljne ćelije nakon čega dolazi do signalne transdukcije na intracelularnom i intercelularnom nivou kao i između različitih jedinki što dovodi do specifičnih bioloških reakcija, (Scheel i Wasternack, 2002).

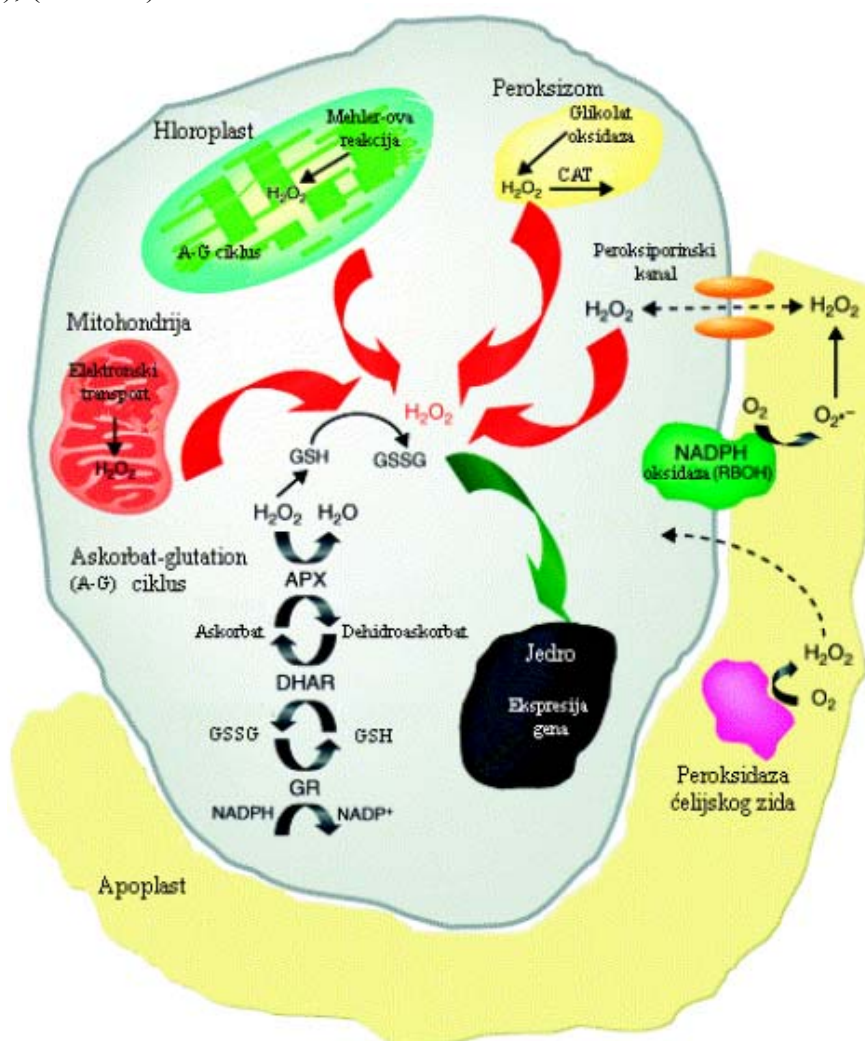
Utvrđeno je da su osnovni putevi prijema i prenosa signala kao i molekuli koji učestvuju u procesu signalne transdukcije zajednički za većinu eukariota. Signalna transdukcija podrazumeva koordinisanu akciju sledećih struktura: receptora, G-proteina, jonskih kanala, jona Ca^{2+} , inozitol-fosfata, fosfatidne kiseline, različitih kinaza, fosfataza, hormona, peptida i brojnih transkripcionih faktora. Zajednička aktivnost svih pomenutih signalnih molekula dovodi do specifične promene ekspresije genetske informacije što predstavlja osnovu adaptivne i odbrambene reakcije organizma u uslovima različitih oblika stresa.

Pored citotoksičnosti, ROS imaju važnu ulogu u reakciji biljne ćelije na različite oblike stresa igrajući ulogu signalnih molekula, a biohemijski odgovor na stres zavisi pre svega od koncentracije ROS. Male koncentracije ROS su stres signali za indukciju „odbrambenih gena“ i za adaptivnu reakciju, dok su velike koncentracije ROS inicijatori programirane ćelijske smrti (Vranová i sar., 2002; Breusegem i sar., 2001). Do sada je uglavnom izučavana signalna uloga H_2O_2 i $\text{O}_2^{\cdot-}$, tako da se o ulozi ostalih ROS u stres signalizaciji malo zna.

2.4.1. Uloga vodonik-peroksida u signalnoj transdukciji

Najbolje je izučena signalna uloga H_2O_2 i u biljnoj kao i u životinjskoj ćeliji. Relativno dug poluživot H_2O_2 od oko 1 ms i umerena reaktivnost omogućuje difuziju ovog signalnog molekula kroz ćelijske membrane, ekstracelularni prenos signala i odgovarajuće aktivnosti van ćelije gde je primarno nastao (Dat i sar., 2000). Signalna aktivnost H_2O_2 omogućena je strogom kontrolom sinteze, specifičnim interakcijama sa ostalim signalnim molekulima i razgradnjom nakon obavljenog prenosa signala (Neill i sar., 2002). Na slici 12. prikazani su najvažniji metabolički putevi sinteze i

razgradnje H_2O_2 u biljnoj ćeliji. U fiziološkim uslovima u biljnoj ćeliji H_2O_2 nastaje kao sporedni proizvod u Mehler-ovoj reakciji u hloroplastima, elektronskom transportu u mitohondrijama i pri fotorespiraciji u peroksizomima. U uslovima biotičkog i abiotičkog stresa H_2O_2 nastaje ekstracelularno u vanćelijskom prostoru aktivnošću enzima NADPH-oksidaze (RBOH), (Sagi i Flihr, 2001) ili peroksidaze ćelijskog zida (Bolwell i sar, 2002), a preko peroksporinskih kanala lako prodire u unutrašnjost ćelije. Unutarćelijska koncentracija H_2O_2 određena je brzinom njegovog nastajanja i razlaganja putem enzima CAT i enzima glutation-askorbat ciklusa (APx, DHAR i GR), (Slika 12).



Slika 12. Metabolizam H_2O_2 u biljnoj ćeliji (Neill i sar., 2002)

CAT (katalaza), APx (askorbat-peroksidaza), DHAR (dehidroaskorbat-reduktaza), GR (glutacion-reduktaza), GSH (redukovani glutation), GSSG (oksidovani glutation), A-G (askorbat-glutacion ciklus)

Prema Vranová i saradnicima (2002), najvažniji biološki procesi u kojima je H_2O_2 uključen kao signalni molekul su: odbrambena reakcija u uslovima biotičkog i abiotičkog stresa, programirana ćelijska smrt (apoptoza), rast i razvojni procesi kao i redoks-regulacija ekspresije gena.

Subletalne količine ROS zahvaljujući uticaju na ekspresiju velikog broja gena (Laloi i sar., 2004; Delanau i sar., 2000) dovode do sinteze mnogih enzima i sekundarnih biomolekula koji sinergički doprinose adaptivnoj reakciji. Utvrđeno je da se u uslovima oksidativnog stresa, preko H_2O_2 , kao signalnog molekula, aktiviraju i

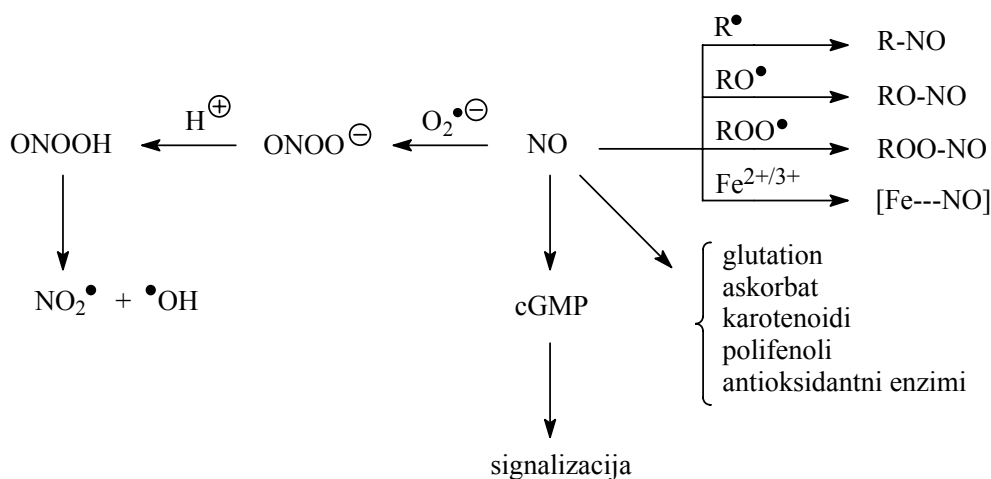
geni koji kodiraju sintezu antioksidantnih enzima (Baxter-Burrell i sar., 2002; Neill i sar., 2002). Veliki uticaj H_2O_2 i ostalih ROS na kompletan metabolizam, rast i razvoj može se objasniti povezanošću ROS sa ostalim regulacionim i signalnim mehanizmima. Vodonik-peroksid u uslovima stresa indukuje akumulaciju različitih hormona ali je i sam sekundarni mesendžer u mnogim hormonskim regulacionim mehanizmima (Chen i sar., 1993).

2.4.2. Uloga azot-monoksida u signalnoj transdukciji

Od 1987. godine, kada je dokazano da azot-monoksid ustvari predstavlja EDRF (*Endothelium Derived Relaxing Factor*), (Palmer i sar., 1987), do danas, intenzivno je izučavana fiziološka uloga NO. Paralelna istraživanja NO kod kičmenjaka, beskičmenjaka, a zatim i kod protozoa, pokazala su da je NO prisutan u celom životinjskom carstvu i da je njegova uloga slična, bez obzira o kojoj grupi životinja se radi. Prisustvo NO u biljkama dokazano je 1996. god. (Leshem, 1996). Pretpostavlja se da postoje tri glavna puta sinteze NO u biljkama:

- pomoću enzima nitrat reduktaze (NR) i nitrit reduktaze (NiR),
- pomoću enzima azot-monoksid-sintaze (NOS) i
- neenzimatski, iz NO_2^- , u prisustvu karotenoida i svetlosti ili odvijanjem nekih hemijskih reakcija u kiseljoj sredini (Torreilles, 2001).

Slično kao kod životinja, tako i kod biljaka hemijske reakcije NO mogu da daju citotoksičan ili citoprotektivan efekat. NO je toksičan kada je prisutan u velikim koncentracijama (većim od $1 \mu\text{mol}/\text{dm}^3$). U tom slučaju NO reaguje i sa malim količinama superoksid-radikala (O_2^{\ominus}) dajući izuzetno toksični peroksinitrit. Smatra se da je za oksidativni stres izazvan azot-monoksidom uglavnom odgovorna peroksinitritna kiselina (ONOOH). Poluživot ONOOH od 1,9 s omogućuje joj difuziju od nekoliko ćelijskih dijametara. ONOOH može lako da difunduje kroz ćelijske membrane, a $ONOO^-$ kroz anjonske kanale u ekstracelularnu sredinu. Time je posrednim putem omogućena i migracija $\cdot OH$ koji nastaje razlaganjem ONOOH. Ovim mehanizmom je ONOOH uključena u niz prooksidativnih reakcija kao npr. lipidnu peroksidaciju, oksidativnu modifikaciju nekih aminokiselina, oksidaciju riboze i dr. S druge strane, NO može da reaguje sa reaktivnim intermedijerima lipidne peroksidacije kao što su alkil (R^\bullet), alkoksi (RO^\bullet) i peroksi (ROO^\bullet) radikali i da tako zaustavi propagaciju ove lančane reakcije, (Beligni i Lammatina, 1999), (Slika 13).



Slika 13. Hemijske reakcije NO u biljkama

Kao što se vidi na slici 13, potencijalna meta NO su enzimi koji kao kofaktor sadrže Fe²⁺ ili Fe³⁺ jon (guanilat-ciklaza, peroksidaze i sl.), sulfhidrilna jedinjenja i određene grupe sekundarnih biomolekula. Ulogu signalnog molekula NO ostvaruje aktivacijom guanilat-ciklaze što dovodi do porasta nivoa sekundarnog mesendžera, cikličnog-guanozinmonofosfata (cGMP) koji dalje utiče na brojne ćelijske funkcije. Na sličan način objašnjava se uticaj NO na aktivnost peroksidaza koje učestvuju u procesu lignifikacije (Ferrer i Ros Barcelo, 1999). Azot monoksid može direktno da modulira aktivnost različitih komponenti antioksidantnog sistema (Slika 13).

O biološkim funkcijama NO u biljkama danas se ne zna mnogo, međutim, istraživanja koja su aktuelna poslednjih godina ukazuju na širok spektar potencijalnih funkcija koje bi ovaj molekul mogao da ima. U daljem tekstu navedene su najznačajnije fiziološke funkcije NO u biljkama:

- regulacija rasta biljaka (Leshem, 1996),
- regulacija određenih razvojnih procesa (Leshem, 1996), kao npr. u sadejstvu sa etilenom regulacija procesa sazrevanja i starenja,
- u sadejstvu sa kiseoničnim radikalima i salicilnom kiselinom aktiviranje odbrambenih sistema biljke koja je inficirana nekim patogenom (Durner i Klessig, 1999; Delledone, 2005).

Učešće NO u odbrambenoj reakciji biljke pri infekciji podrazumeva:

- indukciju akumulacije fitoaleksina (Noritake i sar., 1996; Delledone, 2005),
- izolaciju inficiranog mesta ćelijama koje okružuju napadnuto tkivo (hipersenzitivna reakcija), (Hammond-Kosack i Jones, 1996),
- sinergizam sa kiseoničnim radikalima što dovodi do programirane destrukcije patogena (Durner i Klessig, 1999) i
- aktivaciju ili represiju signalnih puteva koji utiču na ekspresiju genetske informacije (Durner i Klessig, 1999). Ovi signalni putevi, takođe, omogućuju da biljka postane rezistentna.

2.4.3. Radijacioni stres i signalna transdukcija

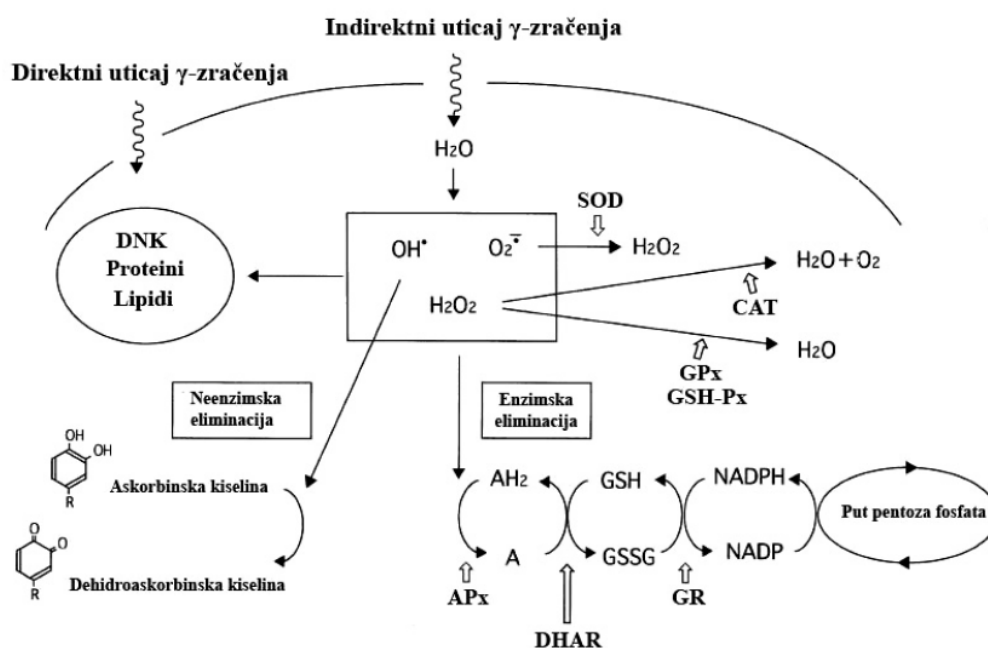
U zadnjih desetak godina napravljen je veliki napredak u razumevanju molekularnih mehanizama reakcije ćelije na genotoksični stres kao što je npr. radijacioni stres. Ranije se verovalo da ćelije sisara pokazuju slabu indukovanu reakciju na oštećenja molekula DNK (Angel i sar., 1986). Danas je kod sisara poznato stotine gena koji su uključeni u različite biohemijske mehanizme koji se odigravaju u ozračenim ćelijama.

U slučaju slabijeg oksidativnog i radijacionog stresa signalni mehanizmi aktiviraju reparaciju oštećenih biomolekula, indukuju antioksidantnu aktivnost, a inhibiraju apoptozu-programiranu ćelijsku smrt. U slučaju jačeg radijacionog i oksidativnog stresa aktivira se apoptoza.

Mehanizam zaštite ćelije od radijacionog stresa obuhvata prevenciju odigravanja prooksidativnih oštećenja i reparaciju oštećenih struktura. Utvrđeno je da postoje tri nivoa zaštite ćelije od reaktivnih kiseoničnih vrsta koje nastaju delovanjem jonizujućeg zračenja:

- prva linija zaštite su antioksidantni enzimi (SOD, CAT, GPx, GSH-Px, APx i GR) koji preveniraju oksidaciju vitalnih ćelijskih struktura,
- druga linija zaštite su hidrolaze oksidovanih nukleotida koji preveniraju ugradnju modifikovanih baza u DNK, a
- treća linija zaštite je sistem za reparaciju DNK (Slupphaug, 2003).

Reaktivne kiseonične vrste (H_2O_2 , $O_2^{\cdot -}$ i HO^{\cdot}) koje nastaju pri radiolizi vode dovode do prooksidativnih oštećenja biomolekula, a isto tako predstavljaju signalne molekule koji su znak za aktiviranje mehanizma za zaštitu ćelije od genotoksičnog stresa (Wells i sar., 2005). Pojedini enzimski i neenzimski antioksidanti svojom sinergičkom aktivnošću doprinose uklanjanju pojedinih ROS pa su na taj način, indirektno, i sami uključeni u signalnu transdukciju (Slika 14).



Slika 14. Uloga pojedinih komponenti antioksidantnog sistema u uklanjanju reaktivnih kiseoničnih vrsta nastalih u ozračenim ćelijama (Wada i sar., 1998)

SOD (superoksid-dizmutaza), CAT (katalaza), GPx (gvajakol-peroksidaza), GSH-Px (glutacion-peroksidaza), APx (askorbat-peroksidaza), DHAR (dehidroaskorbat-reduktaza), GR (glutacion-reduktaza)

U uslovima snažnog radijacionog i oksidativnog stresa u ćelijama biljaka aktiviraju se svi nivoi zaštite od genotoksičnosti uključujući antioksidantne enzime i neenzimske antioksidante (Crocini i sar., 1991; Singh i sar., 1993; Wada i sar., 1998; Beak i sar., 2003). Zaka i saradnici (2002) takođe ukazuju da γ -zračenje može izazvati povećanje aktivnosti antioksidantnih enzima i da oni mogu doprineti razvoju radiorezistentnosti kod nekih biljaka. Male količine ROS, nastale pri niskim dozama radijacije, dovode do indukcije „odbrambenih gena“ i pojedinih enzima kao i do adaptivne reakcije biljaka na delovanje radijacionog stresa. Međutim, još uvek se ne zna dovoljno o molekularnim mehanizmima adaptacije i signalne transdukcije kod biljaka za vreme radijacionog stresa.

2.5. Ozračivanje hrane

Osobina jonizujućeg zračenja da produžava vek čuvanja prehrambenih proizvoda otkrivena je još početkom 20. veka od strane francuskih istraživača. Izvanredne mogućnosti koje u ovoj oblasti pruža zračenje uslovile su pojavu velikog broja radova koji su posvećeni ovom problemu. Do danas je objavljeno na stotine radova o bezbednosti upotrebe ozračene hrane u ljudskoj ishrani.

Rezultati dobijeni dugogodišnjim ispitivanjem ozračene hrane nisu ni u jednom slučaju pokazali da je ozračena hrana štetna po ljudsko zdravlje. WHO (World Health Organisation), IAIE (International Atomic Energy Agency) i FAO (Food and Agriculture Organisation), 1971. godine osnovale su međunarodni projekat o zajedničkim istraživanjima na problemima ozračivanja hrane. Na osnovu tih zajedničkih istraživanja Komisija eksperata koja radi u okviru IAEA, 1980. godine dala je preporuku da prehrambeni proizvodi ozračeni dozama do 10 kGy ne moraju više da se podvrgavaju toksikološkim ispitivanjima (WHO, 1981). Prema podacima IAEA, danas je u više od 50 zemalja sveta uključujući Sjedinjene Američke Države, Kanadu, Veliku Britaniju, Francusku, Nemačku, Holandiju, Argentinu, Brazil, Kinu, Indiju i Rusiju dozvoljena upotreba zračenja određenih vrsta prehrambenih proizvoda.

Prema FDA (Food and Drug Administration), ozračena hrana bi trebala da bude deklarirana etiketom na kojoj je označeno da je tretirana jonizujućim zračenjem i logom „Radura“ (GAO, 2000), (Slika 15).



Slika 15. Logo „Radura“ (preuzeto sa www.cfsan.fda.gov/~dms/opa-fdir.html)

Jonizujuće zračenje može da ima široku primenu u prehrambenoj industriji za konzerviranje i čuvanje prehrambenih proizvoda, sprečavanje klijanja krompira i luka, uništavanje insekata kod žita, za sterilizaciju začina itd. (Farkas, 2004). Za ozračivanje hrane koriste se X , γ i elektronsko zračenje, ali najveću komercijalnu primenu ima γ -zračenje. U zavisnosti od doze zračenja, korisni efekti dejstva zračenja i mogućnost njegove primene mogu biti različiti.

Doze γ -zračenja koje se primenjuju mogu se podeliti u tri grupe (Josimović, 1990):

- **niske doze (do 1 kGy)** se upotrebljavaju za uništavanje insekata koji napadaju žita i voće, eliminišu parazite iz mesnih proizvoda, sprečavaju klijanje krompira i luka, usporavaju sazrevanje južnog voća itd;
- **srednje doze (1-10 kGy)** se primenjuju sa ciljem da se smanji broj bakterija koje su uzročnici kvarenja hrane ili izazivači bolesti. Na ovaj način se tretiraju proizvodi kao što su žita i leguminoze, meso, jaja, voće, povrće, začini itd.

- i visoke doze (>10 kGy) dovode do potpunog uništavanja mikroorganizama koji izazivaju kvarenje hrane. Na ovaj način se mogu treirati meso i mesni proizvodi koji se, ovako konzervisani, mogu čuvati veoma dugo na sobnoj temperaturi. Ova kategorija zračenja još nema široku komercijalnu primenu, a primenjena je u pripremi hrane za astronaute (Wierbicki, 1980).

Prema Zakonu o korišćenju zračenja u prehrambenoj industriji, iz 1984. godine, u našoj zemlji je dozvoljeno ozračivanje sledećih proizvoda dozama do 10 kGy: žita i leguminoze, crni i beli luk, krompir, dehidrirano voće i povrće, jaja u prahu, biljni čajevi, ekstrakti čajeva, začini i sveže živinsko meso.

Izvestan broj autora je, do danas, ispitivao uticaj različitih doza γ -zračenja na nutritivne i antinutritivne karakteristike soje. Prema Byun i saradnicima (1995; 1996) doze γ -zračenja do 10 kGy ne izazivaju značajne promene u sadržaju ukupnih lipida i proteina. Diaa El-Din i saradnici (1998) su ispitivali uticaj doza γ -zračenja do 60 kGy na pojedine nutritivne i antinutritivne karakteristike soje. Utvrđeno je da visoke doze γ -zračenja (do 60 kGy) dovode do deaktivacija pojedinih antinutritivnih karakteristika (aktivnosti tripsin inhibitora, ureaze i hemaglutinina). Variyar i saradnici (2004) su utvrdili da doze γ -zračenja do 5 kGy dovode do povećanja DPPH skevindžer aktivnosti butanolnih ekstrakata semena soje, a utiču, takođe, i na sadržaj pojedinih izoflavona. Jedan od ciljeva ovog rada je i da se ispita uticaj doza γ -zračenja do 10 kGy na određene antioksidantne karakteristike semena soje.

2.6. Poreklo i značaj soje

Soja (*Glycine max* L. Merrill, rod *Glycine*, familija *Leguminosae*) je jedna od najekonomičnijih i najiskoristljivijih poljoprivrednih biljnih vrsta zbog svojih agroekonomskih svojstava i jedinstvenog hemijskog sastava. Zbog hemijskog sastava zrna (preko 60% proteina i ulja), soja je značajan izvor hrane stalno rastućem broju stanovnika u svetu.

Izgled biljke soje predstavljen je na slici 16. To je uspravna jednogodišnja biljka sa stablom obraslim dlačicama koje u zavisnosti od uslova uspeva da dostigne visinu od 30 do 130 cm. Za korenov sistem soje karakteristične su korenske kvržice koje nastaju kao rezultat simbiotskog odnosa sa bakterijama azotofiksatorima iz roda *Bradyrhizobium*. Soja ima trojno složen list, cvet je dvopolan, ljubičaste ili bele boje, a plod je mahuna koja sadrži 1 do 5 zrna.

Soja vodi poreklo iz Azije gde je korišćena kao hrana mnogo pre nego što su se pojavili prvi zapisi o njoj. Prvi pisani podaci o biljci nalaze se u knjizi „Materia medica“ cara Šeng Nunga iz 2838. godine p.n.e. (Morse i sar., 1949). U knjizi se navodi da je soja bila jedna od svetih useva u Kini i smatrala se neophodnom za opstanak kineske rase. Oko 450. godine nove ere u Kini je preporučena upotreba soje kao leka. Smatralo se da soja ima blagotvorno dejstvo na funkcije srca, jetre, želuca, pluća itd.

Razvojem pomorskog saobraćaja, koji je omogućio bolje komunikacije među udaljenim delovima sveta, ova biljna vrsta se tek u XVIII pojavljuje u botaničkim baštama Evrope i Amerike. Razvoj industrije za preradu soje u SAD bio je mnogo više uslovljen nestašicom ulja nego potrebom za proteinima. U prvoj polovini prošlog veka, sojino ulje se najviše koristilo za proizvodnju sapuna, boja i lakova. Sojino brašno je počelo da se koristi u ishrani životinja, naročito, posle II svetskog rata kada

je u svetu došlo do nestašice proteinskih hraniva. Danas, u razvijenim zemljama sveta, soja i njeni proizvodi su značajne komponente u ishrani čoveka. Najveći proizvođač u svetu su SAD gde se soja gaji na oko 50% ukupne svetske površine zasejane ovom biljnom vrstom. Soja je u našoj zemlji kao biljna vrsta poznata odavno, međutim tek u poslednje tri decenije svrstava se u vodeće ratarske biljke (Hrustić i sar., 1998).



Slika 16. Izgled soje (*Glycine max* L. Merrill)

(preuzeto sa www.fortunecity.com/greenfield/macdonalds/296/mas/fondo/soja.jpg)

Sojini proizvodi se koriste u humanoj ishrani za razne namene: za proizvodnju hrane za dijabetičare i decu, zatim za proizvodnju mesne hrane, biskvita, hleba, mleka, margarina, sireva, začina, a za ishranu se može koristiti kao prženo ili kuvano zrno. Sojini proizvodi u ljudskoj ishrani mogu biti funkcionalna zamena za mleko i jaja. Pri proizvodnji hranljivih medicinskih preparata u farmaceutskoj industriji koriste se sojini lecitini jer je poznato da ulaze u sastav svih organa, a naročito nervnog tkiva i jetre. Osim toga, soja je značajan izvor antioksidanata kao što su tokoferoli i izoflavoni koji predstavljaju fitoestrogene (Žilić, 2004).

Jedna od najznačajnijih agronomskih karakteristika soje je sposobnost fiksacije atmosferskog azota. Fiksacija azota od strane biljke obogaćuje i zemljište ovim elementom. Od zelene mase biljke priprema se stočna hrana zbog visokog sadržaja proteina.

2.7. Nutritivne i antinutritivne karakteristike soje

Zrelo zrno soje obično sadrži oko 40% proteina, 20% ulja, 17% celuloze i hemiceluloze, 7% šećera, 5% čvrstih vlakana i oko 6% pepela na bazi suve mase (Rubel i sar., 1972). Najveću nutritivnu vrednost imaju proteini i ulje iz sojinog zrna.

Proteini soje sadrže gotovo sve esencijalne aminokiseline i najbliži su proteinima životinjskog porekla. Glutaminska kiselina je najzastupljenija aminokiselina u sojinim proteinima (Zarkades, 1993), a najmanje zastupljene su metionin i cistein, aminokiseline koje sadrže sumpor. Metabolički proteini (enzimi) čine oko 10%, a rezervni proteini oko 90% od ukupnih proteina zrna soje. Proteini soje spadaju pretežno u grupu lako rastvorljivih proteina, globulina (85%).

Sojino zrno je veoma bogat izvor lizina, čiji je sadržaj u semenu oko 3% (Božović, 1988). U toku termičke obrade sojinog zrna jedan deo lizina ostaje neiskoristljiv što znatno smanjuje nutritivnu vrednost proteina soje. Smatra se da je glavni uzrok smanjene iskoristljivosti lizina tzv. Maillard-ova reakcija u kojoj dolazi do reakcije lizina (ϵ -amino grupe) sa aldehidnom grupom redukujućih šećera u toku termičkih tretmana.

Soja je značajan izvor polinezasićenih esencijalnih masnih kiselina, linolne koja pripada ω -6 seriji i linoleinske koja pripada ω -3 seriji. U sojinom ulju nalazi se oko 55% linolne, 20% oleinske, 10% palmitinske, 7-8% linoleinske i 3% stearinske kiseline (Swern, 1972). Sojino ulje sadrži u manjem procentu i arahidonsku (0,3%), behensku (0,1%), palmitoleinsku (0,1%) i miristinsku kiselinu (0,1%). Pored triglicerida koji su dominantna komponenta sojinog ulja, ono u manjim količinama sadrži i fosfolipide (2%), neosapunjive materije (tokoferoli, fitosteroli i hidrogenkarbonati) kao i slobodne masne kiseline (0,5%). Zbog visokog sadržaja polinezasićenih masnih kiselina i antinutritivnog faktora-lipoksigenaze sojino ulje nema visoku oksidacionu stabilnost.

Visoku hranljivu vrednost sojinog zrna smanjuje prisustvo antinutritivnih materija što uslovljava obaveznu termičku obradu. Inhibitorne materije (antinutritivni faktori) negativno utiču na apetit, apsorpciju hrane i metabolizam životinja. U antinutritivne faktore u semenu soje ubrajaju se: tripsin inhibitor, enzimi lipoksigenaza i ureaza kao i različita jedinjenja, hemaglutinini (lektini), saponini, fitinska kiselina, tanini i dr.

Tripsin inhibitor je najzastupljenija od svih antinutritivnih materija u sirovom semenu soje i predstavlja oko 6% ukupnih proteina. Prema Temler i saradnicima (1984), tripsin inhibitor gradi sa tripsinom/himotripsinom inaktivni kompleks što smanjuje iskoristljivost proteina. Inhibicija proteolitičkih enzima dovodi do hipertrofije pankreasa kod životinja. Prema Hartl i saradnicima (1986) inhibitori proteinaza imaju zaštitnu ulogu koja se sastoji u inaktivaciji digestivnih enzima mikroorganizama, insekata i biljojeda kao i u regulaciji endogenih proteaza.

Lipoksigenazu su prvi put izolovali iz sojinog zrna i opisali Andre i Hou 1932. godine (Žilić, 2004). Prema Hildebrand (1989) ovi enzimi u sojinom zrnu čine oko 2% ukupnih proteina. Enzim lipoksigenaza (EC 1.13.11.12.) pripada klasi dioksigenaza i katalizuje peroksidaciju cis,cis-1,4-pentadien struktura u masnim kiselinama stvarajući hidroperokside. Glavni supstrati delovanja lipoksigenaza su linolna i linoleinska kiselina (Wang i Hildebrand, 1988). Hidroperoksidi nastali kao proizvod peroksidacije lipida, brojnim reakcijama prelaze u isparljive komponente karakterističnog mirisa, sumporna jedinjenja, estre, aldehide, ketone itd. (Gardner, 1975). Različite aldehidne komponente koje nastaju kao sekundarni proizvodi lipidne peroksidacije mogu da reaguju sa terminalnim grupama aminokiselina u proteinima

smanjujući njihovu iskoristljivost (Murthy i Sun, 2000). Aktivnost lipoksigenaze dovodi i do umrežavanja lipida i proteina i akumulaciju toksičnih supstanci u semenu. Fiziološka uloga lipoksigenaza nije dovoljno ispitana. Pretpostavlja se da ima ulogu u procesu rasta i razvika kao i u otpornosti na štetočine (Hildebrand, 1989).

2.7.1. Antioksidantna jedinjenja soje

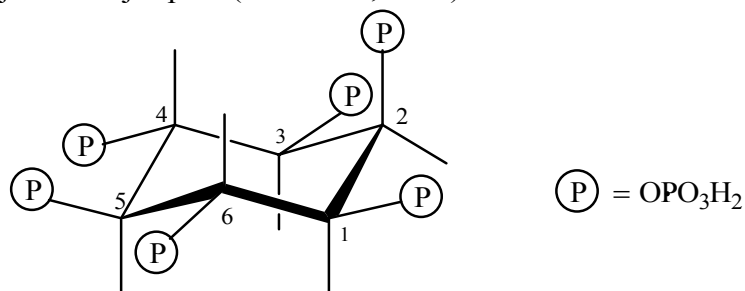
Seme soje sadrži mnogobrojne lipo- i hidrosolubilne antioksidante koji doprinose nutritivnoj vrednosti proizvoda od soje, a takođe doprinose povećanju oksidacione stabilnosti punomasnih proizvoda od zrna soje.

Vitamin E je najvažniji liposolubilni antioksidant koji obezbeđuje oksidativnu stabilnost sojinog ulja (Chow i Drapper, 1974). Pored vitamina E, u antioksidativnoj zaštiti sojinog ulja učestvuju vitamini A i C, karotenoidi i polifenoli soje (Sakač, 2000).

Pratt (1980) navodi da se u antioksidantne materije soje ubrajaju i fenolne kiseline, pre svega kafena, hlorogenska i ferulna, ali da su dominantni antioksidanti soje izoflavoni.

Lecitin iz soje takođe pokazuje antioksidantni efekat jer deluje u sinergizmu sa tokoferolima (Reblova i sar., 1991). Prema Totani i saradnicima (1997), primarna amino grupa fosfatidil-etanolamina služi kao donor H-atoma tokoferil-radikalima, regenerišući vitamin E.

Prema Wu i saradnicima (1994) fitinska kiselina takođe deluje kao antioksidant. Fitinska kiselina je mioinozitol heksafosfat i predstavlja skladišni oblik fosfora i energije (Cosgrove, 1980). Ubraja se u antinutritivne faktore zbog izrazite sklonosti ka građenju kompleksa sa mnogim metalima (cink, gvožđe, kalcijum, magnezijum, bakar i drugi), (Szkudelski, 1997). Osobina fitinske kiseline da kompleksira prelazne metale, uključujući Fe^{2+} , objašnjava njenu antioksidativnu ulogu pri katalitičkoj oksidaciji lipida (Graf i sar., 1984).



Slika 17. Struktura fitinske kiseline

Proizvodi Maillardove reakcije takođe pokazuju antioksidantnu aktivnost. Prema Yoshimura i saradnicima (1997) antioksidantni karakter proizvoda Maillardove reakcije pripisuje se sposobnosti ovih jedinjenjada kompleksiraju Fe^{2+} jone.

Sojino seme sadrži još jednu antinutritivnu komponentu sa antioksidantnim dejstvom, a to su tanini. Tanini imaju svojstvo da talože proteine čime se smanjuje njihova iskoristljivost (Salunkhe, 1990; Carbonaro i sar., 1996). Prema Carbonaro i saradnicima (1996), antioksidantna aktivnost tanina ekstrahovanih iz semena leguminoze *Vicia faba* ostvaruje se uglavnom vezivanjem HO^\bullet radikala, a manje inhibicijom Fentonove reakcije usled kompleksiranja jona Fe^{2+} .

Ho i saradnici (2002) su prvi autori koji su sprovedli komparativno ispitivanje flavonoida u semenu i listu soje. Utvrđeno je da, za razliku od semena, list soje sadrži

samo tragove izoflavona malonil-genistina i genistina. Pomenuti autori su izolovali i identifikovali iz lista soje šest novih jedinjenja za koje je utvrđeno da predstavljaju glikozide kempferola. Prema Villano i saradnicima (2006) sam kempferol je dobar antioksidant i skevindžer DPPH radikala, međutim, antioksidantna aktivnost njegovih glikozida iz soje još uvek nije ispitivana.

2.7.1.1. Izoflavoni soje

Izoflavoni su sekundarni biomolekuli čija je distribucija u biljnom svetu uglavnom ograničena na podfamiliju leguminoza, *Papilionoideae* (Dixon i Ferreira, 2002). Najznačajniji izvori izoflavona u ljudskoj ishrani su proizvodi od soje.

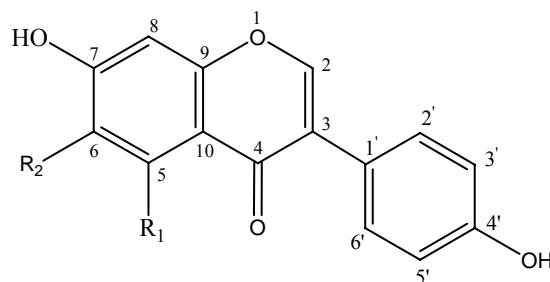
Najvažniji izoflavoni soje, genistein i daidzein i njihovi glikozidi, genistin i daidzin, izolovani su iz sojinog brašna 1941. godine (Walter i sar., 1941), a trideset godina kasnije (Naim i sar., 1973) izolovan je i glicitein i njegov glikozid glicitin koji su identifikovani samo u nekim vrstama soje. Dalja istraživanja sojinih izoflavona dovela su do otkrića 6"-O-acetildaidzina (Ohta i sar., 1979) i 6"-O-acetilgenistina (Kudou i sar., 1991), a zatim i malonil-glikozida 6"-O-malonildaidzina, 6"-O-malonilgenistina i 6"-O-malonilglicitina (Park i sar., 1992).

Dominantni izoflavoni u sirovom zrnu soje su 6"-O-malonil-glikozidi. Prema Wang i Murphy (1994;1996), zrno soje u najvećoj meri sadrži 6"-O-malonilgenistin koji čini 25-42% od ukupnih izoflavona. Malonil-derivati, međutim, nisu termički stabilni. U procesu termičke obrade sojinog zrna veći deo malonil-derivata se razgrađuje usled dekarboksilacije i prevodi u odgovarajuće acetyl-derivate (Wang i Murphy, 1996). Variyar i saradnici (2004) navode da ozračivanje soje γ -zračenjem takođe utiče na relativni odnos pojedinih izoflavona u zrnu soje. Na slici 18. prikazane su strukture izoflavona sojinog zrna.

Na slici 19. prikazane su strukture izoflavona koji su retko prisutni u zrnu soje ili proizvodima od soje. Gliceolin I je pterokarpanski izoflavonoid (fitoaleksin) koji se može identifikovati u zrnu nakon mikrobiološke infekcije (Paxton, 1995). Kumestrol, biohanin A i formononetin su veoma retko prisutni u zrnu soje ili proizvodima od soje (Wang i sar., 1990; Sakač, 2000).

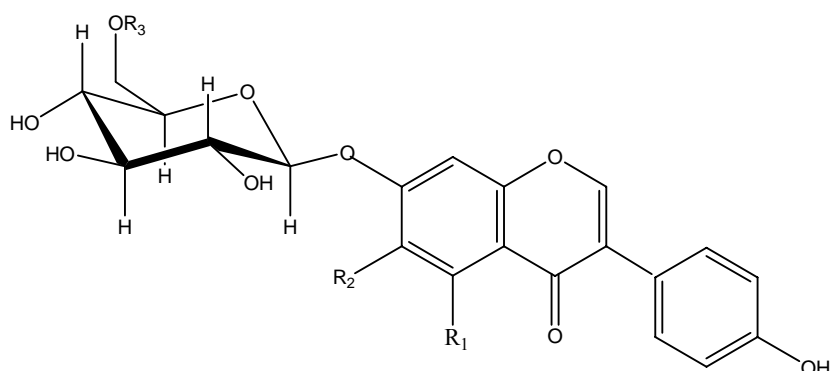
Mnogi izoflavoni pokazuju širok spektar antimikrobne aktivnosti pa se veruje da učestvuju u otpornosti biljaka na infekcije izazvane različitim mikroorganizmima (Dixon i Ferreira, 2002). Smatra se, takođe, da posdiču isključivanje korena soje (Spaink i sar., 1995) i da su prekursori pterokarpanskih fitoaleksina (gliceolina I-III), (Ebel i Grisebach, 1988).

IZOFLAVONSKI AGLIKONI:



Daidzein ($R_1=H$; $R_2=H$); Genistein ($R_1=OH$; $R_2=H$); Glicitein ($R_1=H$; $R_2=OCH_3$).

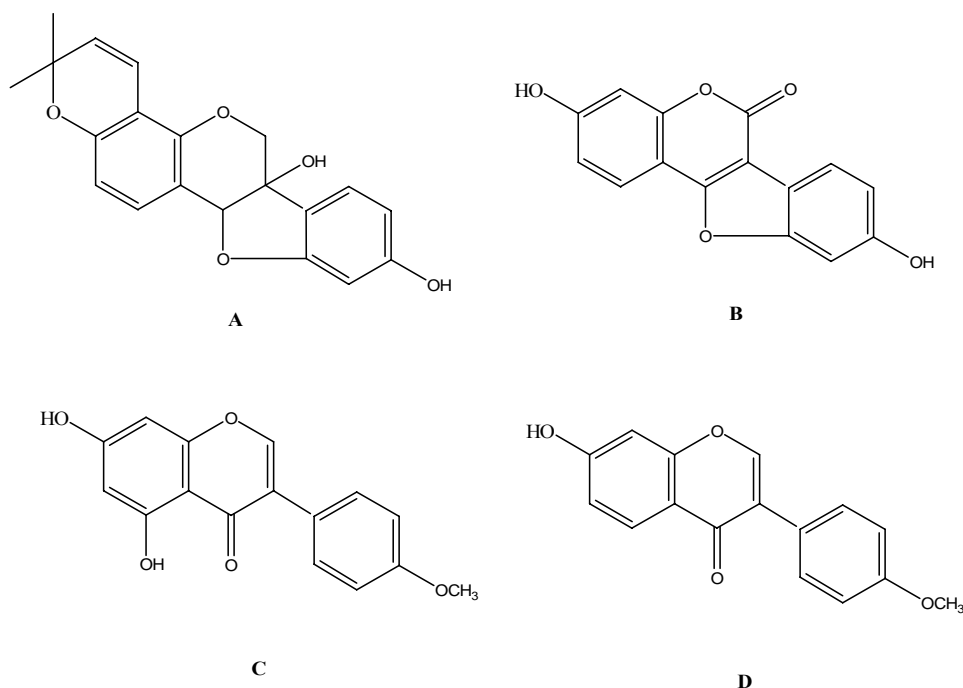
IZOFLAVONSKI GLIKOZIDI:



Daidzin ($R_1=H$; $R_2=H$; $R_3=H$); Genistin ($R_1=OH$; $R_2=H$; $R_3=H$); Glicitin ($R_1=H$; $R_2=OCH_3$; $R_3=H$); 6''-O-acetilglikozid ($R_3=COCH_3$); 6''-O-malonilglikozid ($R_3=COCH_2COOH$).

Slika 18. Strukture izoflavona sojinog zrna

Najveće koncentracije izoflavona nalaze se u hipokotilu, dok ih u ljusci semena soje gotovo i nema (Eldridge i Kwolek, 1983). Sadržaj ukupnih izoflavona u sojinom zrnju varira od 1000-4000 mg/kg (Sakač, 2000; Eldridge i Kwolek, 1983; Wang i Murphy, 1994a) i zavisi od genetske predispozicije, klimatskih uticaja, količine padavina itd.



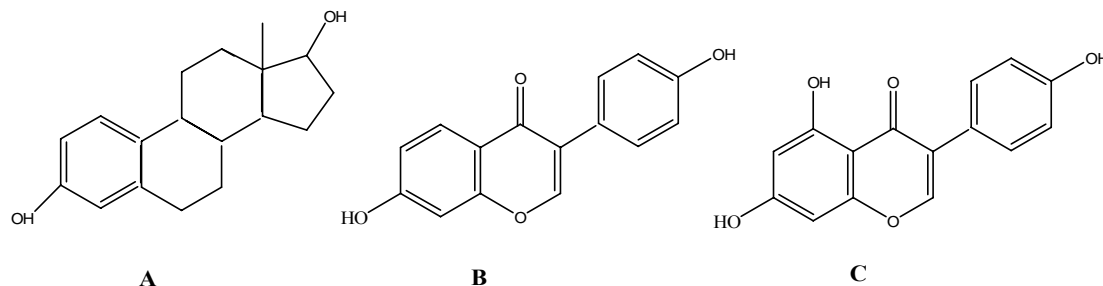
A (Glicolin D); B(Kumestrol); C (Biochanin A); D (Formononetin)

Slika 19. Strukture manje zastupljenih izoflavona iz zrna soje

Izoflavonski glikozidi se u crevima, dejstvom intestinalnih bakterija pretvaraju u aglikone koji se zatim direktno apsorbuju ili dalje metabolizuju do različitih metabolita (Tham i sar., 1998; Wu i sar., 2003). Izoflavonski aglikoni i njihovi metaboliti dospevaju u krv uglavnom kao glukuronidi ili sulfati i tako se transportuju do jetre (Wu i sar., 2004).

Za izoflavone je utvrđeno da u ljudskom organizmu izazivaju efekte karakteristične za delovanje estrogenih hormona, pa su stoga nazvani fitoestrogeni.

Njihova biološka aktivnost je dovedena u vezu sa strukturom izoflavonskog sistema koji je stereochemijski analogan sa steroidnim skeletom estrogenih hormona. Fitoestrogeni tako imaju sposobnost da se vezuju za estrogene receptore. Na slici 20. prikazane su strukture estrogenog hormona 17- β -estrodiole, genisteina i daidzeina između kojih postoji uočljiva izosterna analogija.



Slika 20. Strukturna analogija izoflavonskih aglikona daidzeina (B) i genisteina (C) sa estrogenim hormonom 17- β -estrodiole (A)

U organizmu, izoflavoni pokazuju sledeće biološke aktivnosti:

- estrogena ili antiestrogena,
- povećevanje čvrstine kostiju,
- prevencija pojave srčanih oboljenja i
- antikancerogeno delovanje.

Izoflavoni pokazuju fitoestrogenu aktivnost kod žena u postmenstrualnom periodu kada redukuju simptome menopauze (Murkies i sar., 1995), dok antiestrogenu aktivnost pokazuju pred menopauzom kada se konkurentno vezuju za estrogene receptore (Cassidy i sar., 1994). Fitoestrogena aktivnost izoflavona manifestuje se i uticajem na povećanje čvrstine kostiju pa se mogu upotrebljavati u lečenju osteoporoze (Arjmandi i sar., 1996). Protektivno delovanje izoflavona na kardiovaskularni sistem može se objasniti supresijom oksidacije LDL (Tikkanen i sar., 1998) kao i uticajem na smanjenje agregacije trombocita.

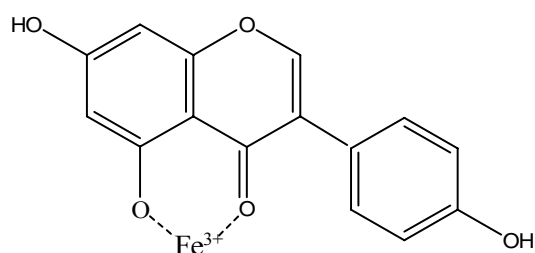
Utvrđeno je da stanovništvo Azije znatno manje podleže kancerogenim oboljenjima od ljudi iz Amerike (Coward i sar., 1993) što je dovedeno u vezu sa ishranom ljudi iz Azije u kojoj dominiraju proizvodi od soje. Konzumiranje hrane na bazi soje može da suzbije neke tumore, a naročito dojke i prostate (Choi i sar., 1996). Matsukawa i saradnici (1999) navode da genistein deluje antiproliferativno na ćelije kancera želuca.

Antikancerogeno delovanje soje može se objasniti antiestrogenom i antioksidantnom aktivnošću kao i inhibicijom aktivnosti niza enzima vezanih za rast i proliferaciju ćelija raka. Prema Talalay (1989), mehanizam antikancerogenog delovanja izoflavonoida može se dovesti u vezu i sa njihovim uticajem na neke detoksifikacione enzime kao npr. GST. Glutathion-S-transferaza katalizuje konjugaciju mnogih karcinogenih elektrofila sa GSH (Chasseaud, 1979). Utvrđeno je, takođe da kempferol, dominantni flavonoid lista soje, inhibira mutageno dejstvo aromatičnih amina, inhibicijom citohroma P-450 (Kanazawa i sar., 1998).

Berghofer i saradnici (1998) navode da su izoflavoni, pored tokoferola, najvažnije antioksidantne materije zrna soje. Utvrđeno je da proizvodi dobijeni fermentacijom, koji uglavnom sadrže izoflavonske aglikone, pokazuju najveću antioksidantnu aktivnost. Glikozilacija hidroksilne grupe u položaju C₇ i esterifikacija

hidroksilne grupe u položaju C₆, dovode do sternih smetnji, smanjuju mogućnost interakcije sa lipidnim peroksi-radikalima i doprinose opadanju antioksidantnog potencijala izoflavona soje (Hopia i Heinonen, 1999). Prema Record i saradnicima (1995), genistein inhibira peroksidaciju linolne kiseline i može se svrstati u antioksidante srednje jačine.

Mitchell i saradnici (1998) su ustanovili da genistein ima izvesnu sposobnost da kompleksira jone Fe³⁺, ali znatno slabije od kvercetina i kempferola (Slika 21).



Slika 21. Kompleks genistein-Fe³⁺ jon (Sakač, 2000)

Lee i saradnici (2005) su ispitivali uticaj pojedinih izoflavona na oksidaciju humanog LDL, DPPH antiradikalnu aktivnost i ukupnu antioksidantnu aktivnost određenu FRAP metodom. Izoflavonski aglikoni su se pokazali znatno efikasnijim od glikozida u inhibiciji oksidacije humanog LDL. Međutim, antioksidantne aktivnosti određene DPPH i FRAP metodama se nisu znatno razlikovale za pojedine izoflavone. Veća vrednost FRAP uočena kod genistina u odnosu na genistein verovatno se može pripisati sklonosti genisteina da gradi komplekse sa Fe³⁺ jonima što negativno utiče na vrednost ovog parametra.

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. Materijal

U našim istraživanjima korišćeno je nakvašeno seme, ponik i list sledećih genotipova ozračene i neozračene soje (*Glycine max* L. Merrill): Venera, Meli, Ana i Novosađanka.

Sa ciljem da se ispita uticaj niskih doza γ -zračenja na rast i razvoj soje, seme pomenutih genotipova ozračivano je niskim dozama zračenja (100-200 Gy). Ozračene i neozračene biljke su praćene kroz dve generacije, G1 i G2. U prvoj generaciji (G1), ispitivane su antioksidantne karakteristike nakvašenog semena (starog 48h), ponika (starog 7 dana) i lista (u fazi cvetanja soje). U drugoj generaciji (G2) ispitivane su antioksidantne karakteristike lista u fazi cvetanja soje. Neozračeni genotipovi soje korišćeni su kao kontrole.

Nakvašeno seme. U kutiju za naklijavanje semena postavljeno je po 40 semena za svaki uzorak na dvostruki sloj filter hartije koji je navlažen destilovanom vodom. Preko semena stavljen je još jedan sloj navlažene filter hartije. Seme je naklijavano na temperaturi od 24 °C u mraku, 48 sati.

Ponik. Pripremljen pesak (2 kg peska navlažen sa 100 cm³ destilovane vode) stavljen je u kutiju za naklijavanje u debljini oko 1 cm. Na podlogu je ravnomerno raspoređeno po 20 semena za svaki uzorak tako da se ne dodiruju i prekriveno slojem peska debljine od oko 1 cm. Kutije su stavljene u komoru za naklijavanje na 25 °C, 7 dana (Slika 22).



Slika 22. Ponik genotipa Novosađanka čije je seme bilo ozračeno sa 100, 120, 140 i 200 Gy i kontrola (neozračeni uzorak)

List G1. U polje je sejano po 6 biljaka 2004. godine. Listovi G1 generacije uzimani su sa svih biljaka u fazi cvetanja za dobijanje prosečnog uzorka.

List G2. Seme G1 generacije je sakupljeno sledeće godine (2005) i sejano je po 10 biljaka. Uzeti su listovi G2 generacije sa svih biljaka u fazi cvetanja za dobijanje prosečnog uzorka.

Seme genotipa Ana ozračivano je i srednjim dozama zračenja (1-10 kGy) kako bi se ispitalo uticaj ovih doza na antioksidantne i nutritivne karakteristike semena soje. Neozračeno seme genotipa Ana korišćeno je kao kontrola.

3.1.1. Uslovi ozračivanja soje

Niskim dozama zračenja (100, 120, 140 i 200 Gy) ozračivano je seme genotipova Venera, Meli, Ana i Novosađanka, 2004. godine, u radijacionoj laboratoriji Instituta za onkologiju u Sremskoj Kamenici. Izvor γ -zračenja bio je ^{60}Co (TCT Gammatron S 65-K). Brzina doze je iznosila 0,919 Gy/min (Slika 23).



Slika 23. Izvor γ -zračenja (TCT Gammatron S 65-K) kojim je ozračivano seme odabranih genotipova soje niskim dozama zračenja

Seme genotipa Ana ozračivano je i srednjim dozama zračenja (1, 2, 4, 6, 8 i 10 kGy) u laboratoriji „Gama“- radijacionoj jedinici Instituta za nuklearne nauke u Vinči. Izvor γ -zračenja bio je ^{60}Co (^{60}Co radiation unit, Franch type). Aktivnost izvora iznosila je 150 kCi, a brzina doze 228 Gy/min.

3.2. Metode

3.2.1. Ekstrakcija hidroksil-radikala i antioksidantnih enzima

Hidroksil-radikal ($\cdot\text{OH}$) i antioksidantni enzimi ekstrahovani su iz 1 g biljnog materijala, homogenizovanog u 10 cm^3 pufera u prethodno ohlađenom porcelanskom avanu u toku 2 – 3 minuta.

Za ekstrakciju je korišćen fosfatni pufer pH=7,0 koncentracije $0,1\text{ mol dm}^{-3}$ (Quy Hai i sar., 1975).

Homogenat je centrifugiran 10 minuta na 10 000 g. Dobijeni supernatant je korišćen za određivanje količine hidroksil radikala, aktivnosti antioksidantnih enzima kao i sadržaja rastvorljivih proteina, ukupne antioksidantne aktivnosti FRAP metodom, DPPH-skevindžer aktivnosti i inhibicije NO.

3.2.2. Određivanje količine hidroksil-radikala

Količina $\cdot\text{OH}$ određena je po metodi Cheesman-a i saradnika (1988) na osnovu reakcije inhibicije degradacije dezoksiriboze.

U reakcioni medijum sačinjen iz $0,25\text{ cm}^3\text{ H}_2\text{O}_2$ ($0,01\text{ cm}^3\text{ H}_2\text{O}_2$ u 100 cm^3 $12\text{ mmol dm}^{-3}\text{ KH}_2\text{PO}_4$, $\text{pH}=7,4$), $0,25\text{ cm}^3\text{ FeSO}_4$ ($0,1\text{ mmol dm}^{-3}\text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) i $0,25\text{ cm}^3$ 2-dezoksiriboze (10 mmol dm^{-3}) dodato je $0,5\text{ cm}^3$ supernatanta. U slepu probu je umesto supernatanta dodato $0,5\text{ cm}^3$ $0,1\text{ mol dm}^{-3}$ fosfatnog pufera, $\text{pH}=7,0$. Inkubacija je vršena 30 min u vodenom kupatilu na 37°C . Zatim je u $0,5\text{ cm}^3$ radne i slepe probe dodato je $4,5\text{ cm}^3$ reagensa (10% HClO_4 zasićene na hladno sa tiobarbiturnom kiselinom – TBA i 20% trihlorsirćetne kiseline – TCA u odnosu 1:3). Inkubacija je vršena 20 minuta u vodenom kupatilu na 99°C . Količina hidroksil-radikala je izračunata na osnovu promene absorbancije (532 nm) u odnosu na slepu probu.

3.2.3. Određivanje aktivnosti superoksid-dizmutaze

Ukupna aktivnost superoksid-dizmutaze (SOD) određena je na osnovu inhibicije fotohemijske redukcije nitroblutetrazolijuma (NBT) u kojoj nastaje formazan, plavi proizvod redukcije NBT sa $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Dhindsa i sar., 1981). Reakcioni medijum je dobijen mešanjem $2,6\text{ cm}^3$ 50 mmol/dm^3 fosfatnog pufera ($\text{pH}=7,8$); $100\text{ }\mu\text{l}$ 13 mmol/dm^3 metionina; $100\text{ }\mu\text{l}$ $75\text{ }\mu\text{mol/dm}^3$ NBT; $100\text{ }\mu\text{l}$ $0,1\text{ mmol/dm}^3$ EDTA i $50\text{ }\mu\text{l}$ $2\text{ }\mu\text{mol/dm}^3$ riboflavina. Radna proba je dobijena dodatkom enzimskog ekstrakta ($10\text{-}50\text{ }\mu\text{l}$) u reakcioni medijum. Slepa proba je dobijena tako što je u reakcioni medijum umesto enzimskog ekstrakta dodata ista zapremina fosfatnog pufera ($\text{pH}=7,8$). Rastvor u epruvetama se dobro promeša i epruvete postave ispred svetlosnog izvora, 10 minuta. Jedinica aktivnosti SOD je ona količina enzima koja inhibira redukciju NBT za 50% na 25°C i 560 nm (Auclair i Voisin, 1985).

3.2.4. Određivanje aktivnosti katalaze

Aktivnost katalaze (CAT) je određena metodom Simona i saradnika (1974) na osnovu opadanja absorbancije $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$ u toku 5 minuta.

Slepa proba je dobijena mešanjem $0,05\text{ cm}^3$ ekstrakta enzima i $3,0\text{ cm}^3$ rastvora fosfatnog pufera $\text{pH}=7$, koncentracije $0,05\text{ mol/dm}^3$ kao reakcionog medijuma. Radna proba je dobijena mešanjem $2,0\text{ cm}^3$ rastvora $0,05\text{ mol/dm}^3$ fosfatnog pufera $\text{pH}=7$, $0,05\text{ cm}^3$ ekstrakta enzima i $1,0\text{ cm}^3$ sveže napravljenog rastvora H_2O_2 .

Rastvor H_2O_2 se dobija rastvaranjem $0,17\text{ cm}^3$ 30% H_2O_2 u 50 cm^3 $0,05\text{ mol/dm}^3$ fosfatnog pufera $\text{pH}=7$ i dodaje neposredno pred merenje.

Aktivnost katalaze se određuje na osnovu smanjenja absorbancije H_2O_2 u prisustvu ekstrakta enzima na 240 nm . Jedinica aktivnosti katalaze (U/mg proteina) je ona količina enzima koja izaziva razgradnju $1\text{ }\mu\text{mol}$ H_2O_2 u periodu od 1 min na 25°C , izraženo po miligramu proteina (specifična aktivnost).

3.2.5. Određivanje aktivnosti gvajakol-peroksidaze

Aktivnost gvajakol-peroksidaze (GPx) određena je na osnovu transformacije gvajakola u tetragvajakol u toku 1 minuta (Simon i sar., 1974). Promena absorbancije merena je spektrofotometrijski na 436 nm. Zapremina od 0,1 cm³ supernatanta dodata je u reakcionu medijum koji je sadržavao 3,0 cm³ 0,1 mol dm⁻³ fosfatnog pufera pH=7,0; 0,05 cm³ rastvora gvajakola (0,22 cm³ gvajakola do 100 cm³ destilovane vode) i 0,03 cm³ 12,3 mmol dm⁻³ rastvora H₂O₂. U slepu probu nije dodat ekstrakt enzima.

Aktivnost GPx izražena je brojem U ("unit") po miligramu proteina. Jedinica aktivnosti GPx je ona količina enzima koja izaziva transformaciju 1 μmol gvajakola u toku 1 minuta na 25°C.

3.2.6. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze

Glutation-peroksidazna aktivnost (GSH-Px) je određena pomoću kumen-hidroperoksida i GSH kao supstrata (Matkovic i sar., 1984).

Slepa i radna proba su dobijene mešanjem 0,1 cm³ supernatanta i 0,7 cm³ TRIS-pufera, pH=7,6 (3,0285 g TRIS + 0,1860 g EDTA u 500 cm³ destilovane vode, podešen sa HCl). Posle 5 minuta inkubacije u slepu probu se doda 0,1 cm³ GSH (6,0 mg GSH u 10 cm³ TRIS-pufera pH=7,6), a u radnu probu se doda 0,1 cm³ GSH i 0,1 cm³ kumen-hidroperoksida (0,005 cm³ kumen-hidroperoksida u 10 cm³ TRIS-pufera pH=7,6). Nakon inkubacije od 10 minuta u slepu i radnu probu se doda 1,0 cm³ 20% trihlorsirćetne kiseline, dok se samo u slepu probu doda 0,1 cm³ rastvora kumen-hidroperoksida. Zatim se centrifugira 15 minuta na 5000 o/min na 4°C. Nakon toga se iz slepe i radne probe odmeri po 1,0 cm³ i pomeša sa 2,0 cm³ TRIS-pufera pH=8,9 i 0,1 cm³ DTNB. Tris-pufer pH=8,9 se dobija rastvaranjem 24,23 g TRIS u 500 cm³ destilovane vode i podešava sa HCl. Rastvor DTNB se pravi rastvaranjem 19,8 mg 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoeva kiseline 5 cm³ metanola. Aktivnost GSH-Px se određuje merenjem promene absorbancije na 412 nm i izražava kao U/mg proteina. Jedinica aktivnosti GSH-Px je ona količina enzima koja izaziva oksidaciju 1 μmol GSH u toku 1 minuta na 25°C.

3.2.7. Određivanje sadržaja rastvorljivih proteina

Sadržaj rastvorljivih proteina određen je na osnovu reakcije tirozinskih i cisteinskih ostataka proteina sa Folin-Ciocalteu reagensom. Absorbancija nastalog kompleksa merena je spektrofotometrijski na 500 nm (Lowry i sar., 1951). Sadržaj rastvorljivih proteina određen je u radnim probama u odnosu na slepu probu.

U 1 cm³ reagensu (1 cm³ 0,5% CuSO₄ • 5H₂O u 1% NaKC₄H₄O₆ pomeša se sa 50 cm³ 2% Na₂CO₃ u 0,1 mol dm⁻³ NaOH) dodat je 0,1 cm³ uzorka, a zatim 0,1 cm³ Folin-Ciocalteu reagensu (razblažen pre upotrebe destilovanom vodom u odnosu 1:2). Nakon 30 minuta, probe su razblažene sa po 2 cm³ destilovane vode i merena je absorbancija. U slepu probu, umesto ekstrakta proteina dodat je 0,1 cm³ 0,1 mol dm⁻³ fosfatnog pufera pH=7,0.

Sadržaj rastvorljivih proteina izražen je brojem mg proteina po gramu sveže materije.

3.2.8. Određivanje ukupne antioksidantne aktivnosti FRAP metodom

U cilju dobijanja potpunije informacije o antioksidantnim svojstvima ispitivanih korova, u radu je testirana i ukupna antioksidantna aktivnost metodom FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power Assay), (Benzie i sar.,1999). Ovo je spektrofotometrijska metoda zasnovana na reakciji redukcije Fe^{3+} u Fe^{2+} , pod uticajem biljnog ekstrakta.

FRAP reagens je dobijen mešanjem tri rastvora, A, B i C u odnosu 10:1:1. Rastvor A je predstavljao 300 mmol/dm^3 acetatni pufer $\text{pH}=3,6$; rastvor B, 10 mmol/dm^3 TPTZ u 40 mmol/dm^3 HCl i rastvor C, 20 mmol/dm^3 FeCl_3 . U FRAP reagens je dodato $100 \mu\text{l}$ uzorka (rastvora fosfatno-puferskog ekstrakta proteina ili 70% EtOH ekstrakta iz suvog semena pripremljenog za određivanje fenola). Svi antioksidanti prisutni u ekstraktu koji imaju dovoljno nizak redoks potencijal redukuju Fe^{3+} . Ferro-joni, nastali na ovaj način, grade sa prisutnim ligandom plavo obojeni kompleks, Fe^{2+} -TPTZ (gvožđe-tripiridiltriazin).

Razvijanje plave boje, prati se 4 minuta na 593 nm u odnosu na destilovanu vodu. Rezultat se izražava kao koncentracija Fe^{2+} -jona, ($\mu\text{mol/dm}^3$), nastalih u reakcionom sistemu pri opisanim uslovima ili u FRAP jedinicama (1 FRAP-jedinica odgovara $100 \mu\text{mol/dm}^3$ FeCl_2).

3.2.9. Određivanje inhibicije azot-monoksida

Inhibicija azot-monoksida je određena spektrofotometrijskim merenjem stvaranja nitritnih jona (Harald i sar.,1996., sa modifikacijama). Azot-monoksid, nastao iz natrijum-nitroprusida (SNP) u vodenom rastvoru pri fiziološkim pH, reaguje sa kiseonikom dajući nitritne jone koji se određuju pomoću Griess-ove reakcije.

Izvor azot-monoksida bio je SNP ($0,1490 \text{ SNP}$ u 50 ml fosfatnog pufera, $\text{pH}=7$). Griso v reagens predstavlja smešu 1% SA (sulfanilamida) i 0,1% NEDA (N-(1-naftil)-etilen-diamindihlorida). Rastvaranjem $0,5000 \text{ g}$ SA u $2,95 \text{ ml}$ 85% H_3PO_4 i dopunjavanjem do 50 ml destilovanom vodom dobijen je 1% SA, a rastvaranjem $0,05 \text{ g}$ NEDA u 50 ml destilovane vode dobijen je 0,1% NEDA.

Radna proba je pripremljena mešanjem $0,5 \text{ ml}$ SNP (natrijum-nitroprusid), $100 \mu\text{l}$ rastvora uzorka i $0,40 \text{ ml}$ fosfatnog pufera. Slepa proba je dobijena mešanjem $0,5 \text{ ml}$ SNP i $0,5 \text{ ml}$ fosfatnog pufera. Radna i slepa proba su zatim inkubirane 10 minuta na svetlosti istog intenziteta. Nakon inkubacije dodat je Griso v reagens, po 1 cm^3 , u slepu i radnu probu. Oba rastvora su razblažena sa po 4 ml destilovane vode. Absorbancije radne i slepe probe su merene u odnosu na destilovanu vodu na 546 nm . Inhibicija NO se izražava procentualno u odnosu na slepu probu.

3.2.10. Određivanje skevindžer aktivnosti ekstrakata DPPH-metodom

Skevindžer aktivnost ekstrakta određena je DPPH metodom spektrofotometrijski tako što je praćen nestanak ljubičaste boje na 515 nm (Soler-Rivas i sar., 2000, sa modifikacijama). Ovom metodom utvrđuje se kapacitet hvatanja 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikala (DPPH), (RSC-Radical Scavanger Capacity).

Iz fosfatno-puferskih ekstrakata su prethodno istaloženi proteini dodatkom 20% TCA. U kivetu je pomešano $200 \mu\text{l}$ rastvora fosfatno-puferskog ekstrakta (ili $500 \mu\text{l}$ 70% EtOH ekstrakta iz suvog semena pripremljenog za određivanje fenola), 1 ml etanolnog rastvora DPPH ($0,1 \text{ mmol/dm}^3$) i dopunjeno 96% EtOH do 5 ml . Slepa

proba je sadržavala sve rastvore sem rastvora uzorka umesto koga je dodat 96% EtOH. Absorbancije dobijenih rastvora očitavane su nakon 30 minuta. Skevindžer aktivnost ekstrakta (RSC) proporcionalna je promeni absorbancije, a izražena je u procentima u odnosu na slepu probu.

3.2.11. Određivanje sadržaja ukupnih fenola

Ekstrakti za određivanje ukupnih fenola dobijeni su iz 1 g suvog semena soje (prethodno obezmašćenog sa n-heksanom) ekstrakcijom sa 25 ml 70% EtOH (0,1 mol/dm³ HCl) ekstrakcijom na ultrazvučnom kupatilu, 30 minuta, na 25 °C.

Ukupni fenoli u ekstraktima iz suvog semena soje su određeni na bazi reakcije fenola sa Folin-Ciocalteu-ovim reagensom (Rechner, 2000). Tada se razvija boja koja nastaje kao posledica redukcije kompleksa fosformolibdenove i fosforvolframove kiseline kada nastaju hromogeni u kojima metali imaju nižu valencu. U 4,1 ml destilovane vode je dodato 150 μl uzorka i 250 μl folinovog reagensa. Reakcioni medijum je dobro promešan (vortex), ostavljena da stoji 5 minuta i u nju je dodat 1 cm³ zasićenog rastvora Na₂CO₃. Nakon 60 minuta je izmerena absorbancija na 720 nm. Izračunavanje je izvršeno na osnovu standardne krive (+)-katehina, a rezultati izraženi kao mg katehina/g suvog semena.

3.2.12. Određivanje sadržaja ukupnih tanina

Odmereno je 0,1 g polivinil-polipirolidona (PVPP) i dodato 1 ml destilovane vode i 1 ml uzorka. Dobijena smeša je dobro promešana (vortex) i epruvete su ostavljene na 4 °C, 15 minuta, a zatim opet dobro promešane. Nakon centrifugiranja, 10 minuta, na 3000^o min⁻¹, odliven je supernatant u kome su sadržani netaninski fenoli. Tanini su ostali vezani za PVPP. Sadržaj ukupnih netaninskih fenola u supernatantu je određen po prethodnoj metodi (Makkar i sar., 1993). Sadržaj tanina u uzorku je dobijen iz razlike sadržaja ukupnih fenola i sadržaja netaninskih fenola i izražen kao mg katehina/g suvog semena na osnovu standardne krive (+)-katehina.

3.2.13. Određivanje količine redukovano glutationa

Količina GSH merena je na osnovu bojene reakcije neproteinskih tiolnih (-SH) grupa, u prisustvu DTNB (5,5-ditiobis[2-nitrobenzoeva kiselina]) (Sedlak i Lindsay, 1968). Absorbancija nastalog obojenog proizvoda je očitana nakon 5 minuta spektrofotometrijski na 412 nm. Količina GSH određena je u radnim probama u odnosu na slepu probu.

Svež biljni materijal (0,5 g) homogenizovan je sa 4 cm³ 5% rastvora trihlorsirćetne kiseline (TCA) i centrifugiran 10 minuta na 3500^o min⁻¹. Supernatant (0,1 cm³) je dodat u reakcioni medijum koji je sadržavao 2,0 cm³ 0,4 mol dm⁻³ TRIS-HCl pufera pH 8,9 (24,23 g do 500 cm³ vode), 0,9 cm³ H₂O i 0,1 cm³ 6 mmol dm⁻³ DTNB (0,0198 g u 5 cm³ MeOH).

Količina GSH izražen je brojem μmol GSH/mg proteina.

3.2.14. Određivanje količine malonildialdehida

Intenzitet LP određuje se na osnovu količine malonildialdehida (MDA) ekstrahovanog iz svežeg biljnog materijala pomoću smeše tiobarbiturne (TBA) i trihlorsirćetne (TCA) kiseline (Placer i sar., 1966).

Svež biljni materijal (0,5 g) homogenizovan je sa 4,5 cm³ rastvora za ekstrakciju MDA (10 cm³ 10% perhlorne kiseline (HClO₄) zasiti se na hladno sa TBA i doda se 30 cm³ 20% TCA). Homogenat je zagrevan 20 minuta na 95°C, ohlađen i centrifugiran 10 minuta na 3500 min⁻¹. Količina MDA u dobijenom supernatantu očitana je spektrofotometrijski na 532 nm. Količina MDA se računa na osnovu promene absorbancije u odnosu na slepu probu. Intenzitet LP izražen je brojem nmol MDA/mg proteina.

3.2.15. Određivanje intenziteta oksidacije proteina

Ukupna količina karbonil-grupa u oksidativno modifikovanim proteinima je određena na osnovu reakcije karbonilnih grupa sa 2,4-dinitrofenilhidrazinom kada nastaje žuto obojeni kondenzacioni proizvod sa maksimumom apsorpcije na 370 nm (Levine i sar., 1990).

Oksidativno modifikovani proteini su ekstrahovani iz 0,1 g samlevenog suvog semena soje sa 5 ml fosfatnog pufera (pH=7) na ultrazvučnom kupatilu (10 minuta, 25 °C). Supernatant je odvojen od nerastvornog ostatka centrifugiranjem 10 minuta na 3500 min⁻¹. Na 900 µl uzorka dodato je 100 µl strptomycin-sulfata (10% u 50 mmol/dm³ HEPES, pH=7,2). Reakciona smeša je držana u frižideru 15 minuta, a zatim je talog odvojen centrifugiranjem (11 000 g, 15 minuta). Uzeto je 950 µl supernatanta i na njega je dodato 900 µl 20% TCA. Nakon centrifugiranja (11 000 g, 5 minuta), odbačen je supernatant, a na talog je dodan 1 ml 2,4-dinitrofenilhidrazina (10 mmol/dm³ u 2 mol/dm³ HCl). Reakciona smeša je držana 60 minuta na sobnoj temperaturi, a svakih 5 minuta energično promešana (vortex). Nakon toga je u reakcionu medijum dodato još 900 µl 20% TCA a zatim je talog odvojen centrifugiranjem (11 000 g, 5 minuta). Supernatant je bačen, a talog ispran 3 puta sa 1 ml (EtOH-EtOAc, 1:1). Nakon svakog ispiranja talog je odvojen centrifugiranjem od rastvora. Na talog je na kraju dodato 1200 µl gvanidina (6 mol/dm³ u 20 mmol/dm³ KH₂PO₄, pH=2,3), i ostavljen je da se rastvori na vodenom kupatilu (15 min, 37 °C). Posle centrifugiranja (1 minut), supernatant je razblažen sa 1,5 ml fosfatnog pufera (pH=2,3), a absorbancija očitana na 370 nm. Ukupna količina karbonil-grupa izražena je u nmol/mg proteina.

3.2.16. Određivanje sadržaja izoflavona u semenu soje

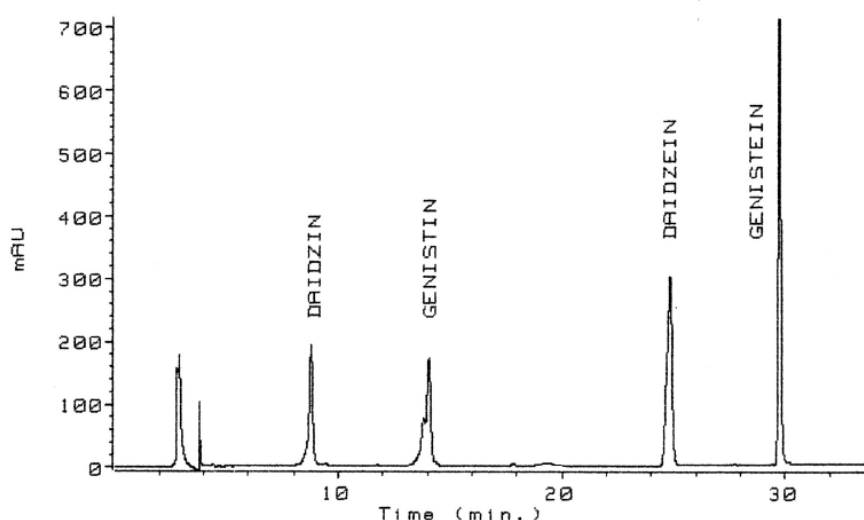
Određivanje sadržaja izoflavona (genisteina, daidzeina, genistina i daidzina) u zrnu soje vršeno je po metodi Wanga i Murphy (1994) uz neke aparativne i proceduralne razlike.

Izmereno je 2 g samlavenog uzorka soje na analitičkoj vagi, a potom obezmašćeno sa n-heksanom (3×5 ml n-heksana na ultrazvučnom kupatilu na 25 °C) i osušeno na vazduhu. Izoflavoni su ekstrahovani iz obezmašćenog uzorka sa 3×5 ml rastvora za ekstrakciju (acetonitril : 0,1 mol/dm³ HCl=5:1), 30 minuta na ultrazvučnom kupatilu na 25 °C. Ekstrakt je odvojen filtriranjem kroz kvalitativni filter papir (Whatman No 41) i uparen na rotacionom vakuum uparivaču na temperaturi nižoj od 30 °C. Suvi ostatak je rastvoren u 80% MeOH (HPLC stepena čistoće) u vodi korišćenjem ultrazvučnog kupatila i kvantitativno prenet u odmerni sud od 10 cm³, pa dopunjen navedenim rastvaračem do marke.

Detekcija i kvantifikacija izoflavona izvršena je na HPLC aparatu Hewlett-Packard 1090 pri sledećim radnim karakteristikama:

- detektor: DAD (Diode Array Detector)
talasna dužina 254/10 nm ref. 550/100 nm
 - kolona: ZORBAX SB-C18, 3,0×250 mm, 5 μm
 - mobilna faza: Rastvor A: 0,1% rastvor glacijalne sirćetne kiseline u vodi
Rastvor B: 0,1% rastvor glacijalne sirćetne kiseline u acetonitrilu
- Linearni gradijent: početak-85% rastvora A i 15% rastvora B
Udeo rastvora B tokom prvih 20 minuta analize raste od 15% do 25%, do 30. minuta do 50%, do 35. minuta do 55%, a narednih 15 minuta opada do 15%.
- injekciona zapremina: 10 μl
 - protok: 0,400 ml/min
 - vreme: 50 min
 - temperatura kolone: 40 °C.

Za pripremu serije standarda korišćeni su komercijalni HPLC standardi (Fluka). Odmerene količine standarda su rastvorene u 80% metanolu, a koncentracije su iznosile 0,050; 0,025 i 0,010 mg/cm³. Na slici 24. prikazan je HPLC hromatogram standardnog rastvora smeše daidzina, genistina, daidzeina i genisteina.



Slika 24. HPLC hromatogram standardnog rastvora smeše daidzina, genistina, daidzeina i genisteina.

Nakon hromatografisanja standardnih rastvora konstruisana je kalibraciona kriva. Pod istim hromatografskim uslovima propušteni su i pripremljeni uzorci. Poređenjem retencionog vremena i spektra standarda sa retencionim vremenom i spektrom uzorka izvršena je detekcija izoflavona u uzorcima. Koncentracija izoflavona u uzorcima određena je na osnovu integracije površine pikova ovih izoflavona na hromatogramima prikazanim na slikama 38-42.

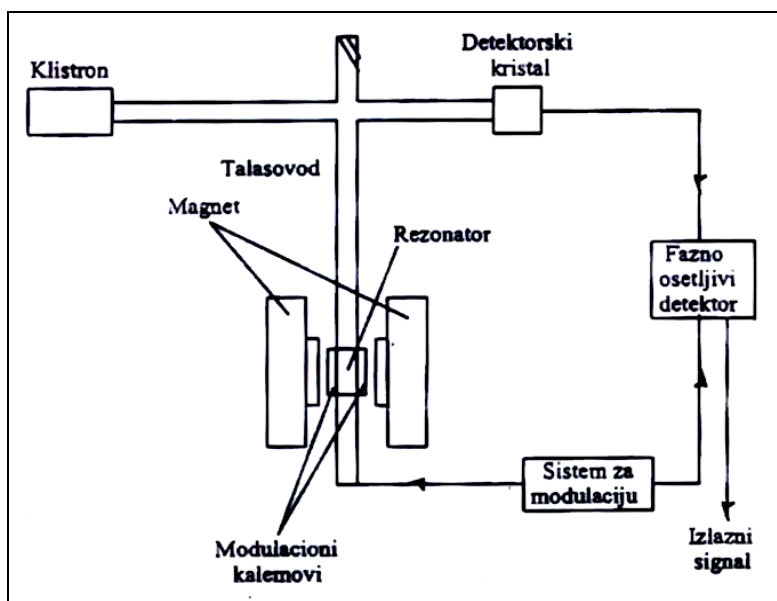
3.2.17. ESR spektroskopsko određivanje hidroksil-radikala

Elektron-spin rezonancija (ESR) je spektroskopska metoda koja se zasniva na rezonantnoj apsorpciji elektromagnetnog zračenja od strane nesparenih elektrona u homogenom magnetnom polju. Ova metoda se naziva još i elektron-paramagnetna rezonanca (EPR), jer se njome mogu ispitivati paramagnetične supstance, supstance koje sadrže čestice sa nesparenim elektronima.

Metoda ESR omogućuje da se odredi prisustvo i broj nesparenih elektrona u molekulu. To je najsavremenija, nerazorna i veoma osetljiva metoda za detekciju slobodnih radikala. ESR je je najvažnija eksperimentalna metoda za ispitivanje mehanizama reakcija slobodnih radikala u organskoj hemiji i biohemiji.

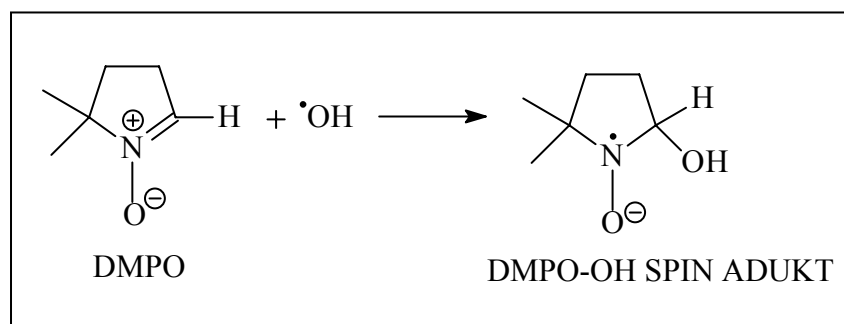
ESR spektroskopijom se mogu detektovati koncentracije slobodnih radikala niže od 10^{-10} mol/dm³, pod uslovom da su radikali stabilni u ispitivanom sistemu onoliko vremena koliko je potrebno da se detektuju.

Homogeno magnetno polje promenljive jačine se proizvodi elektromagnetom sa precizno izrađenim polovima. Blok šema ESR spektrometra prikazana je na slici 25.



Slika 25. Blok šema ESR spektrometra

Za analizu nestabilnih hidroksil-, alkoksi- i peroksi- radikala najčešće se primenjuje metoda hvatanja radikala, tzv. "spin-trapping" metoda. Hidroksil-radikali, nastali u ispitivanim reakcionim sistemima, su kratkog vremena života ($\ll 1$ ms) i male koncentracije ($< 10^{-7}$ M). U sistemu sa reaktivnim radikalima dodaju se jedinjenja poznata kao "spin-trap"-ovi (hvatači) radikala. Na taj način nastaju relativno stabilni "spin-adukti", pogodni za detekciju ESR spektroskopijom. U ovom radu korišćen je 5,5-dimetil-1-pirolin-N-oksid (DMPO) u funkciji "spin-trap-a". Stabilni nitroksil-radikali (DMPO-OH spin-adukti) nastaju sledećom reakcijom DMPO i $\cdot\text{OH}$:



Slika 26. Reakcija nastajanja DMPO-OH spin adukta

Hiperfina struktura spektra predstavljena je sa četiri linije, relativnog odnosa intenziteta 1:2:2:1 i istih konstanti cepanja za jedan ^{14}N -atom ($I=1$) $a_{\text{N}}=14,9$ G, i jedan ^1H -atom ($I=1/2$) $a_{\text{H}}^{\beta}=14,9$ G.

ESR ispitivanje ekstrakata soje vršeno je u Fentonovom model sistemu. U našem radu, Fentonov model sistem je dobijen mešanjem $0,5\text{ cm}^3$ 10 mmol/dm^3 FeCl_2 + $0,5\text{ cm}^3$ 10 mmol/dm^3 H_2O_2 + $0,5\text{ cm}^3$ $0,3\text{ mol/dm}^3$ DMPO. Radna proba je dobijena tako što je u Fentonov model sistem dodato $0,1\text{ cm}^3$ uzorka. Snimanje spektara vršeno je 5 minuta nakon dobijanja smeše.

Za ESR analizu korišćeni su fosfatno-puferski ekstrakti lista G1 ozračene (200 Gy) i neozračene soje. Fosfatno puferski ekstrakti lista dobijeni su ekstrakcijom 1g svežeg lista pomoću 10 cm^3 $0,1\text{ mol/dm}^3$ fosfatnog pufera pH=7. Relativni intenziteti (RI) signala ozračene soje upoređeni su sa neozračenom koja je korišćena kao kontrola.

$$\text{Promena RI } (\pm\%) = 100 \cdot (\text{RI}_{\text{ozračene soje}} - \text{RI}_{\text{kontrola}}) / \text{RI}_{\text{kontrola}}$$

Za ESR analizu korišćeni su takođe i etil-acetatni ekstrakti semena ozračene i neozračene soje. U Fentonov model sistem ($0,5\text{ cm}^3$ 10 mmol/dm^3 FeCl_2 + $0,5\text{ cm}^3$ 10 mmol/dm^3 H_2O_2 + $0,5\text{ cm}^3$ $0,3\text{ mol/dm}^3$ DMPO) pojedinačno je dodavano po $0,1\text{ cm}^3$ etil-acetatnih ekstrakata semena soje. Fentonov model sistem u prisustvu $0,1\text{ cm}^3$ čistog etil-acetata predstavljao je slepu probu.

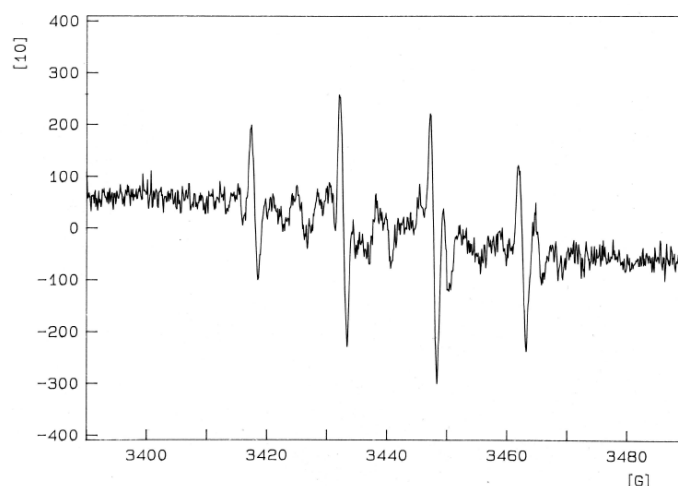
Etil-acetatni ekstrakti semena soje dobijeni su uparavanjem 70% EtOH ekstrakata (dobijenih kod ekstrakcije ukupnih fenola) na rotavaporu i rastvaranjem suvih ostataka u etil acetatu (10 minuta na $40\text{ }^\circ\text{C}$) tako da je koncentracija ekstrakta iznosila 5 mg/ml.

Relativni intenzitet ESR signala slepe probe upoređan je sa radnom probom. Smanjenje intenziteta signala radne probe u odnosu na slepu probu predstavlja skevindžer efekat (SE):

$$\text{SE } (\%) = 100 \cdot (h_0 - h_x) / h_0$$

Pri čemu h_0 i h_x predstavljaju visine drugog pika na ESR spektru slepe i radne probe.

Na slici 27. prikazan je ESR spektar hidroksil-radikala u Fentonovom model sistemu u prisustvu DMPO kao „spin-trapa“ (slepa proba).



Slika 27. ESR spektar hidroksil-radikala u Fentonovom model sistemu u prisustvu DMPO kao „spin-trapa“ (slepa proba)

3.2.18. Statistička obrada podataka

Svi dobijeni rezultati predstavljeni su kao aritmetička sredina \pm SE (standardna greška). Signifikantnost razlika između srednjih vrednosti merenja utvrđene su pomoću softvera "Origin" (ANOVA, Tukey-test, za $p < 0,05$). Regresiona analiza urađena je u istom programu (OriginPro 7.5).

4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. Uticaj niskih doza γ -zračenja na antioksidantni sistem odabranih genotipova soje

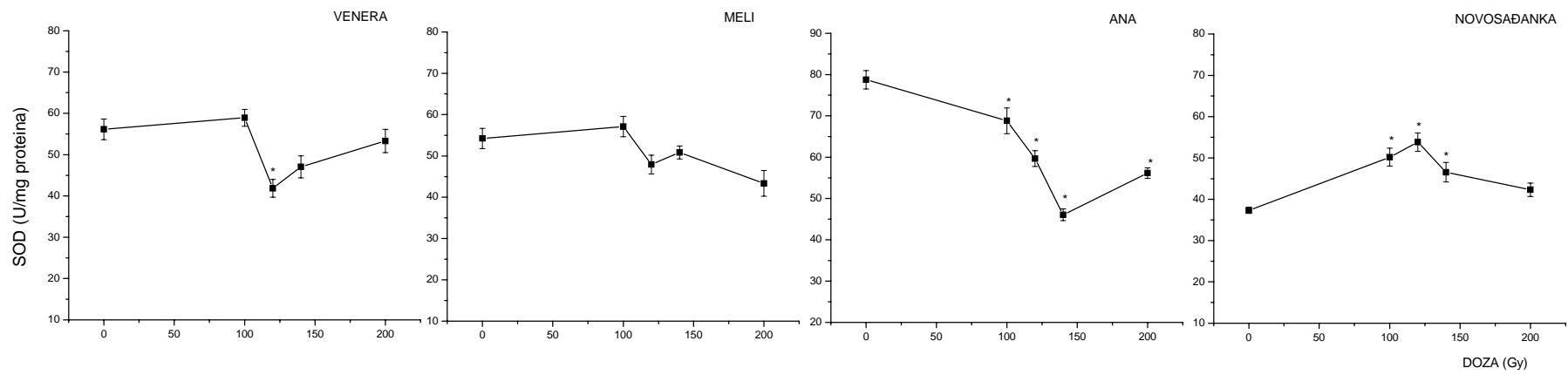
U ovom poglavlju su razmatrani i diskutovani rezultati određivanja antioksidantnih parametara i parametara oksidativnog stresa u nakvašenom semenu, poniku i listu G1 i u listu G2 generacije odabranih genotipova soje čije je seme bilo ozračeno niskim dozama γ -zračenja (100-200 Gy). Kontrolu je predstavljalo nakvašeno seme, ponik i list G1 i G2 odabranih genotipova soje čije seme nije bilo ozračeno. Rezultati su predstavljeni grafički. Na grafikonima su označene statistički signifikantne promene u odnosu na kontrolu. U analizi dobijenih rezultata diskutovane su promene veće od 25% u odnosu na kontrolu zbog toga što su one uglavnom statistički signifikantne i imaju biološki značaj. Uporedni prikaz promena u antioksidantnom sistemu odabranih genotipova ozračene i neozračene soje tokom razvića kroz dve generacije dat je u prilogu (Grafikon 63).

4.1.1. Uticaj niskih doza γ -zračenja na aktivnost superoksid-dizmutaze u različitim fazama razvoja soje

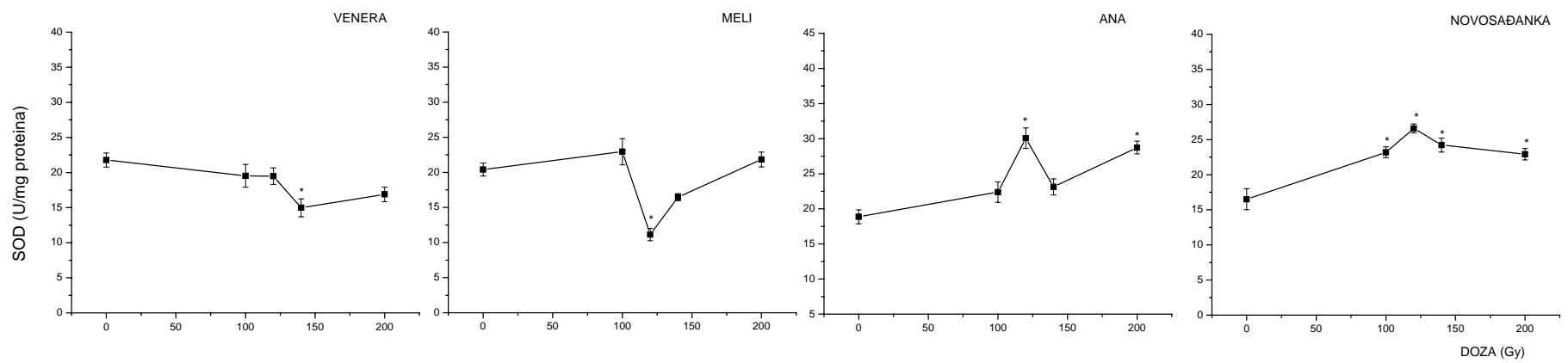
Na grafikonima 1-4. prikazani su rezultati ispitivanja uticaja niskih doza γ -zračenja na aktivnost superoksid-dizmutaze u nakvašenom semenu, poniku i listu G1 i G2 odabranih genotipova soje.

Nakvašeno seme. Aktivnost SOD izražena u U/mg proteina je u kontrolama iznosila: 56,1 (Venera); 54,2 (Meli); 78,7 (Ana) i 37,3 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja aktivnost SOD se menjala u opsegu od: 41,8-58,9 U/mg proteina (Venera); 43,3-57,1 U/mg proteina (Meli); 46,1-68,8 U/mg proteina (Ana) i 42,3-53,84 U/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 1). Kod genotipa Venera značajna promena aktivnosti SOD utvrđena je jedino kod doze od 120 Gy kada je došlo do smanjenje aktivnosti za 25,4% u odnosu na kontrolu. Kod genotipa Meli nisu utvrđene signifikantne promene ni kod jedne doze zračenja. Kod genotipa Ana aktivnost SOD se smanjivala pri svim dozama zračenja, a najizrazitije smanjenje aktivnosti uočeno je kod doze od 140 Gy (41,5%). Kod genotipa Novosađanka aktivnost SOD se povećavala pri svim dozama, a najviše pri dozi od 140 Gy (44,3%).

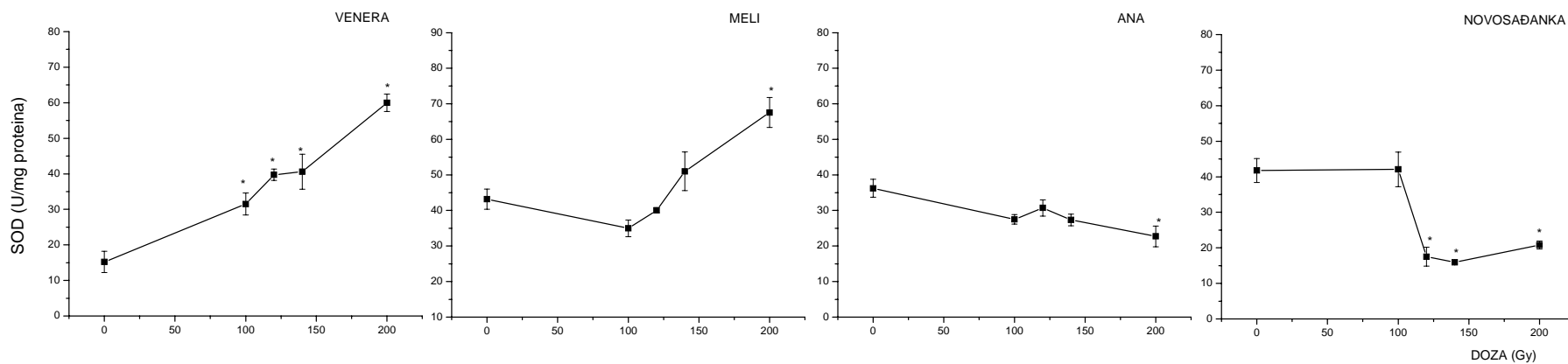
Ponik. Aktivnost SOD izražena u U/mg proteina je u kontrolama iznosila: 21,8 (Venera); 20,4 (Meli); 18,9 (Ana) i 16,5 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja aktivnost SOD se menjala u opsegu od: 15,0-19,5 U/mg proteina (Venera); 11,1-22,9 U/mg proteina (Meli); 22,4-30,1 U/mg proteina (Ana) i 23,2-26,6 U/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 2). Kod genotipa Venera, aktivnost SOD se smanjivala pri svim dozama zračenja, a najveće smanjenje je uočeno kod doze od 140 Gy i iznosilo je 31,2% u odnosu na kontrolu. Kod genotipa Meli značajna promena aktivnosti SOD je utvrđena jedino kod doze od 120 Gy pri kojoj je aktivnost SOD smanjena za 45,4%. Kod genotipa Ana aktivnost SOD se povećavala pri svim dozama zračenja, a najviše pri dozi od 120 Gy (59,4%). Kod genotipa Novosađanka aktivnost SOD se povećavala pri svim dozama, a najviše pri dozi od 120 Gy (61,1%).



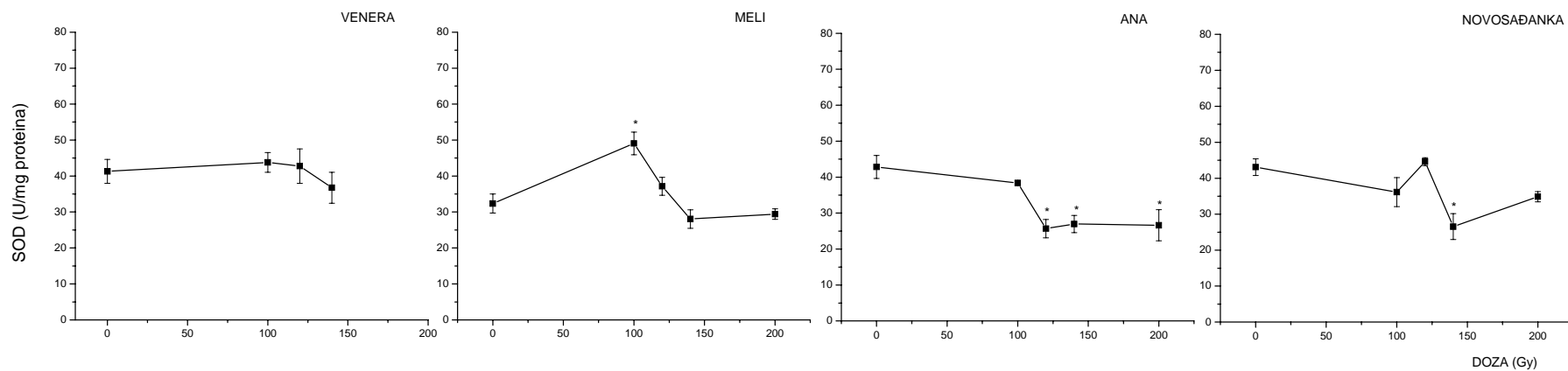
Grafikon 1. Uticaj niskih doza γ -zračenja na aktivnost SOD u nakvašenom semenu odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



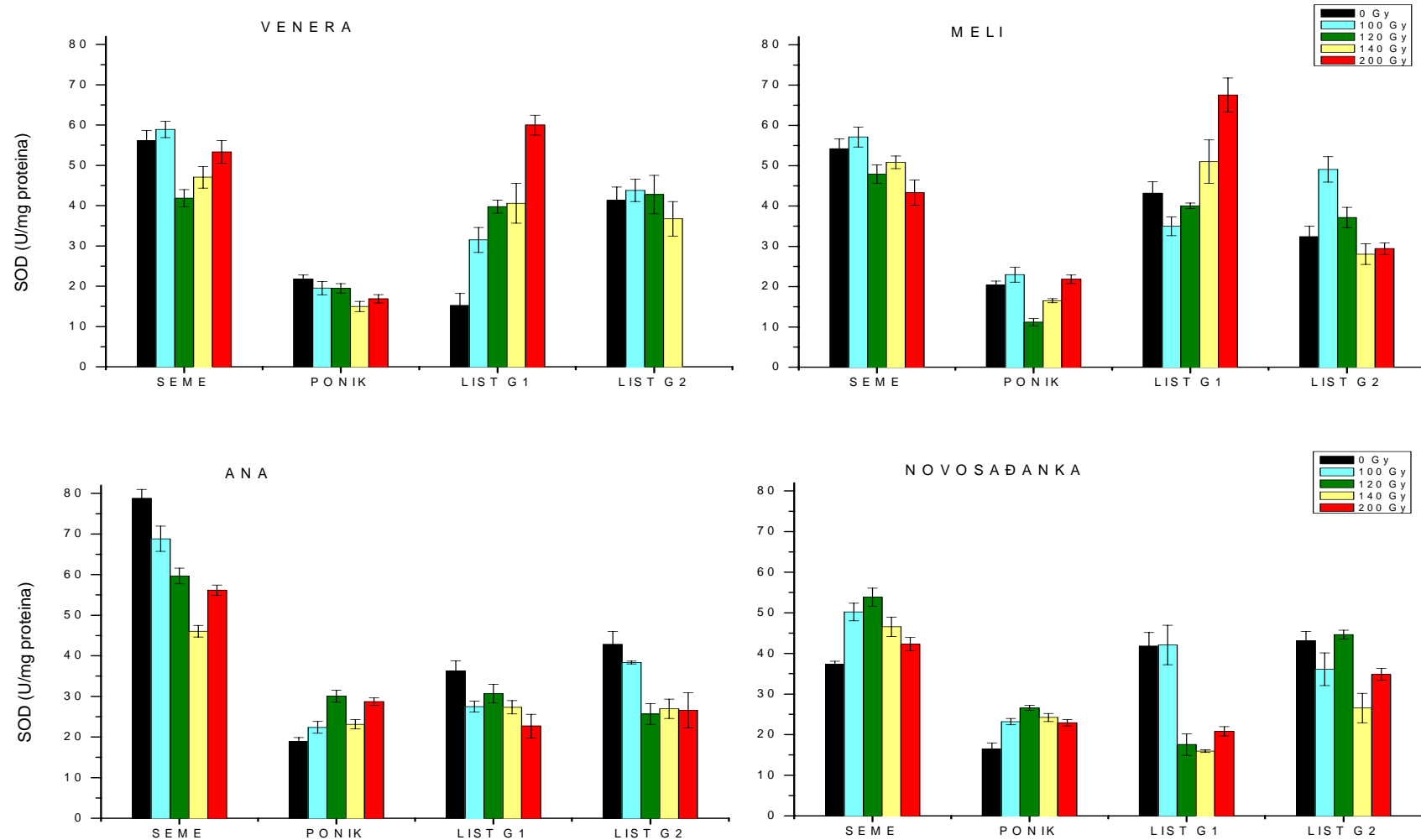
Grafikon 2. Uticaj niskih doza γ -zračenja na aktivnost SOD u poniku odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 3. Uticaj niskih doza γ -zračenja na aktivnost SOD u listu G1 odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 4. Uticaj niskih doza γ -zračenja na aktivnost SOD u listu G2 odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 5. Promene aktivnosti SOD tokom razvića odabranih genotipova ozračene i neozračene soje kroz dve generacije

List G1. Aktivnost SOD izražena u U/mg proteina je u kontrolama iznosila: 15,2 (Venera); 43,2 (Meli); 36,2 (Ana) i 41,8 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja aktivnost SOD se menjala u opsegu od: 31,5-60,0 U/mg proteina (Venera); 35,0-67,6 U/mg proteina (Meli); 22,7-30,7 U/mg proteina (Ana) i 16,0-42,1 U/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 3). Kod genotipa Venera, aktivnost SOD se povećavala pri svim dozama zračenja. Najizrazitije povećanje aktivnosti enzima bilo je kod najveće doze zračenja od 200 Gy i iznosilo je 294% u odnosu na kontrolu. Kod genotipa Meli je utvrđeno da se aktivnost SOD povećavala sa porastom doze zračenja tako da je najveće povećanje utvrđeno kod doze od 200 Gy (56,5%). Kod genotipa Ana uočeno je smanjenje aktivnosti SOD pri svim dozama zračenja, a najveće kod doze od 200 Gy (37,3%). Kod genotipa Novosađanka zapaženo je da se aktivnost SOD smanjivala pri većim dozama, a najizrazitije smanjenje aktivnosti je zapaženo kod doze od 140 Gy (61,8%).

List G2. Aktivnost SOD izražena u U/mg proteina je u kontrolama iznosila: 41,3 (Venera); 32,4 (Meli); 42,8 (Ana) i 43,1 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja aktivnost SOD se menjala u opsegu od: 36,7-43,8 U/mg proteina (Venera); 28,1-49,1 U/mg proteina (Meli); 25,7-38,4 U/mg proteina (Ana) i 26,5-44,6 U/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 4). Kod genotipa Venera nije utvrđena značajna promena aktivnosti SOD ni kod jedne doze zračenja. Najizraženija promena aktivnosti SOD kod genotipa Meli uočena je kod doze od 100 Gy kada je došlo do povećanja aktivnosti SOD za 51,7%. Kod genotipa Ana aktivnost SOD se smanjivala pri svim dozama zračenja, a najveće smanjenje je zapaženo kod doze od 120 Gy (40,0%). Kod genotipa Novosađanka je jedino kod doze od 140 Gy uočena značajna promena aktivnosti SOD kada je utvrđeno njeno smanjenje za 38,4%.

Na grafikonu 5. prikazane su promene aktivnosti SOD tokom rasta i razvića odabranih genotipova ozračene i neozračene soje kroz dve generacije. Na osnovu uporedne analize aktivnosti SOD kod ozračenih i neozračenih genotipova soje mogu se izvući sledeći zaključci o delovanju γ -zračenja na njih:

- kod genotipa Venera aktivnost SOD se povećavala jedino u listu G1 gde je zabeleženo veliko povećanje aktivnosti (294%) kod doze od 200 Gy, dok je u ostalim fazama razvoja aktivnost SOD opadala ili se nije menjala u značajnoj meri;
- kod genotipa Meli aktivnost SOD se povećavala u listu G1 pri većim dozama i u listu G2 pri nižim dozama zračenja. U ostalim fazama razvoja aktivnost SOD je opadala;
- kod genotipa Ana aktivnost SOD se povećavala jedino u poniku dok je u ostalim fazama razvoja opadala;
- kod genotipa Novosađanka aktivnost SOD se povećavala u nakvašenom semenu i poniku dok je u listu G1 i G2 opadala.

Može se zaključiti da niske doze γ -zračenja dovode do indukcije aktivnosti SOD u različitim fazama razvoja soje u zavisnosti od genotipa. Može se pretpostaviti da SOD igra važnu ulogu u razvijanju otpornosti pojedinih genotipova soje na radijacioni i oksidativni stres u različitim fazama razvoja. Slične rezultate dobili su i drugi autori. Zaka i saradnici (2002) su utvrdili da konstantno delovanje niskih doza γ -zračenja u kontaminiranim područjima dovodi do prirodne selekcije najbolje adaptiranih genotipova biljaka na hronično delovanje radijacionog i oksidativnog

stresa indukcijom aktivnosti antioksidantnih enzima, a pre svega SOD. I drugi autori takođe navode ulogu SOD u antioksidativnoj zaštiti biljaka na delovanje γ -zračenja (Wada i sar., 1998; Beak i sar., 2003).

Superoksid-dizmutaza igra ključnu ulogu u suzbijanju oksidativnog stresa izazvanog različitim uticajima (Alscher i sar., 2002). Tako je npr. uloga SOD u antioksidativnoj zaštiti soje od delovanja UV-B zračenja zavisi od osobina pojedinih genotipova. Kod većine ispitivanih genotipova soje utvrđen je porast aktivnosti SOD pod uticajem UV-B zračenja (Yanqun i sar., 2003). UV-B zračenje dovodi do indukcije aktivnosti SOD i kod kukuruza, krompira i graška dok kod suncokreta izaziva smanjenje aktivnosti SOD (Santos i sar., 1999, 2004). Kod nekih biljaka rezistencija na herbicide koji izazivaju oksidativni stres objašnjena povećanjem aktivnosti SOD (Shaaltiel i Gressel, 1986). Joni teških metala poput Pb^{2+} , koji izazivaju i oksidativni stres, takođe dovode do povećanja aktivnosti SOD u pojedinim organima kontaminiranih biljaka (Verma i Dubey, 2003).

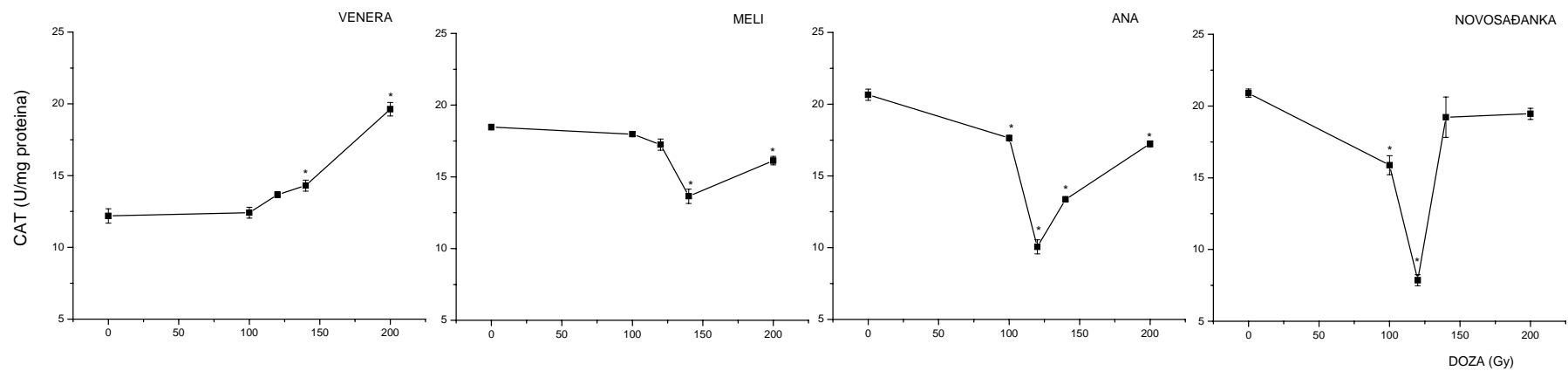
4.1.2. Uticaj niskih doza γ -zračenja na aktivnost katalaze u različitim fazama razvoja soje

Na grafikonima 6-9. prikazani su rezultati ispitivanja uticaja niskih doza γ -zračenja na aktivnost katalaze u nakvašenom semenu, poniku i listu G1 i G2 odabranih genotipova soje.

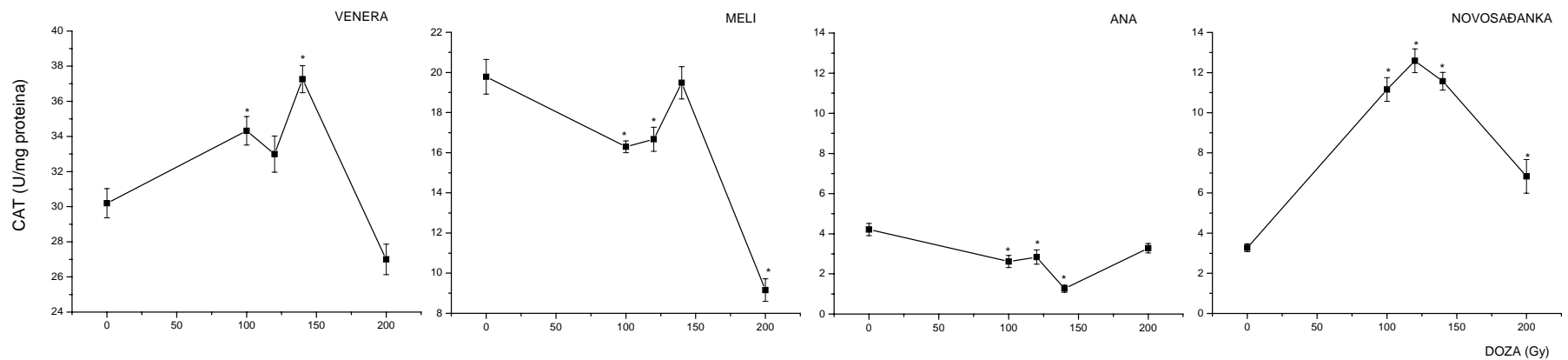
Nakvašeno seme. Aktivnost CAT izražena u U/mg proteina je u kontrolama iznosila: 12,2 (Venera); 18,5 (Meli); 20,6 (Ana) i 20,9 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja aktivnost CAT se menjala u opsegu od: 12,4-19,6 U/mg proteina (Venera); 13,6-18,0 U/mg proteina (Meli); 10,0-17,6 U/mg proteina (Ana) i 7,86-19,4 U/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 6). Kod genotipa Venera utvrđeno je da se aktivnost CAT povećavala sa porastom doze zračenja. Najveći porast aktivnosti CAT iznosio 60,6% u odnosu na kontrolu kod doze od 200 Gy. Kod genotipova Meli, Ana i Novosađanka utvrđeno je smanjenje aktivnosti CAT pri svim dozama zračenja. Najizrazitije smanjenje aktivnosti CAT uočeno je pri dozi od 140 Gy kod genotipa Meli (26,5%) i pri dozi od 120 Gy kod genotipova Ana (51,4%) i Novosađanka (62,4%).

Ponik. Aktivnost CAT izražena u U/mg proteina je u kontrolama iznosila: 30,2 (Venera); 19,8 (Meli); 4,21 (Ana) i 3,28 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja aktivnost CAT se menjala u opsegu od: 27,0-37,2 U/mg proteina (Venera); 9,2-19,5 U/mg proteina (Meli); 1,27-3,28 U/mg proteina (Ana) i 6,82-12,6 U/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 7). Kod genotipa Venera utvrđeno je povećanje aktivnosti CAT pri svim dozama sem kod doze od 200 Gy. Najveći porast aktivnosti CAT uočen je kod doze od 140 Gy (23,2%). Kod genotipova Meli i Ana aktivnost CAT se smanjivala pri svim dozama zračenja. Najveće smanjenje aktivnosti utvrđeno je pri dozi od 200 Gy kod genotipa Meli (53,5%) i pri dozi od 140 Gy kod genotipa Ana (69,8%). Kod genotipa Novosađanka uočeno je povećanje aktivnosti CAT pri svim dozama zračenja, a najizrazitije kod doze od 120 Gy (284%).

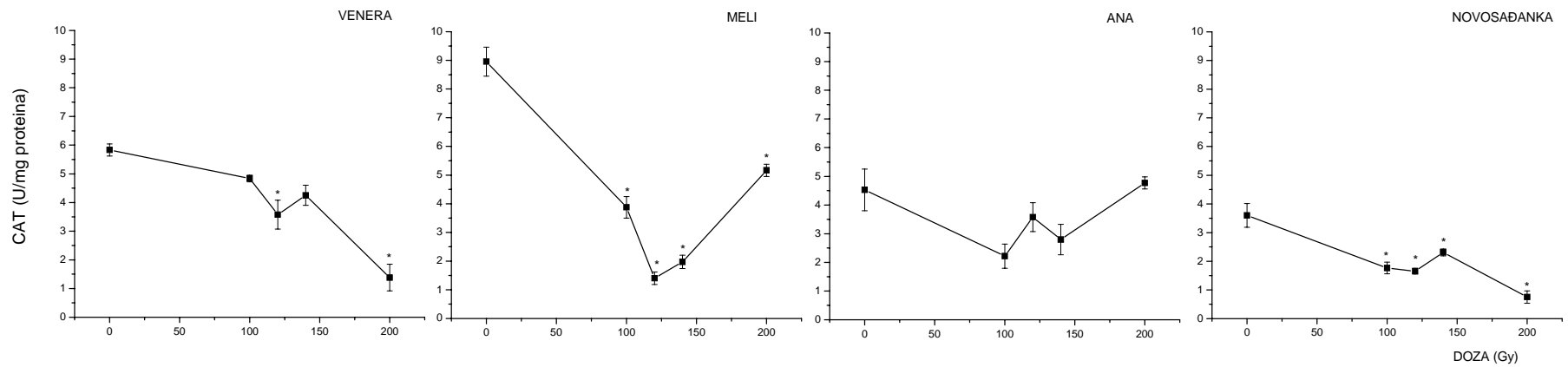
List G1. Aktivnost CAT izražena u U/mg proteina je u kontrolama iznosila: 5,83 (Venera); 8,95 (Meli); 4,53 (Ana) i 3,60 (Novosađanka).



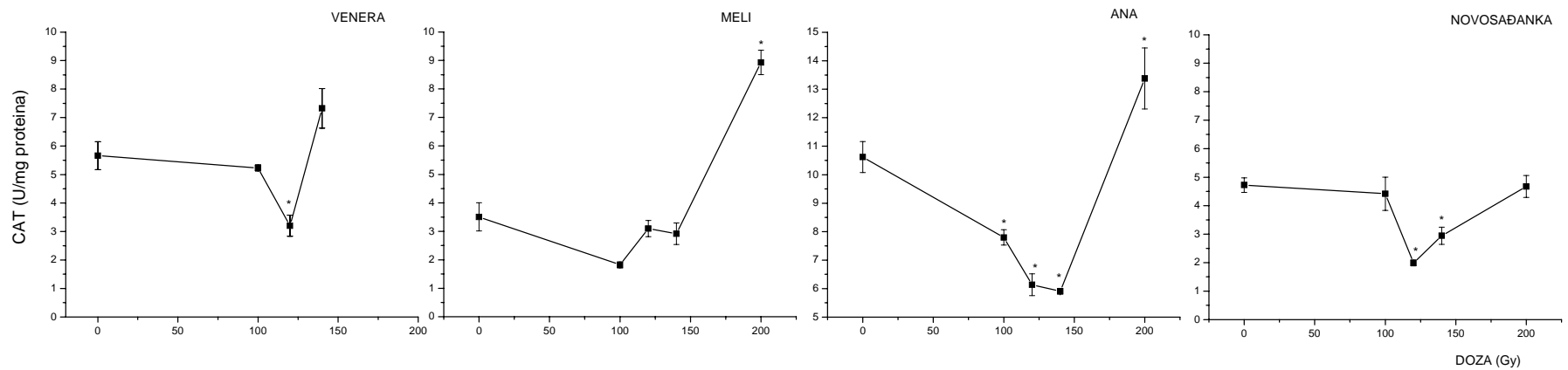
Grafikon 6. Uticaj niskih doza γ -zračenja na aktivnost CAT u nakvašenom semenu odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



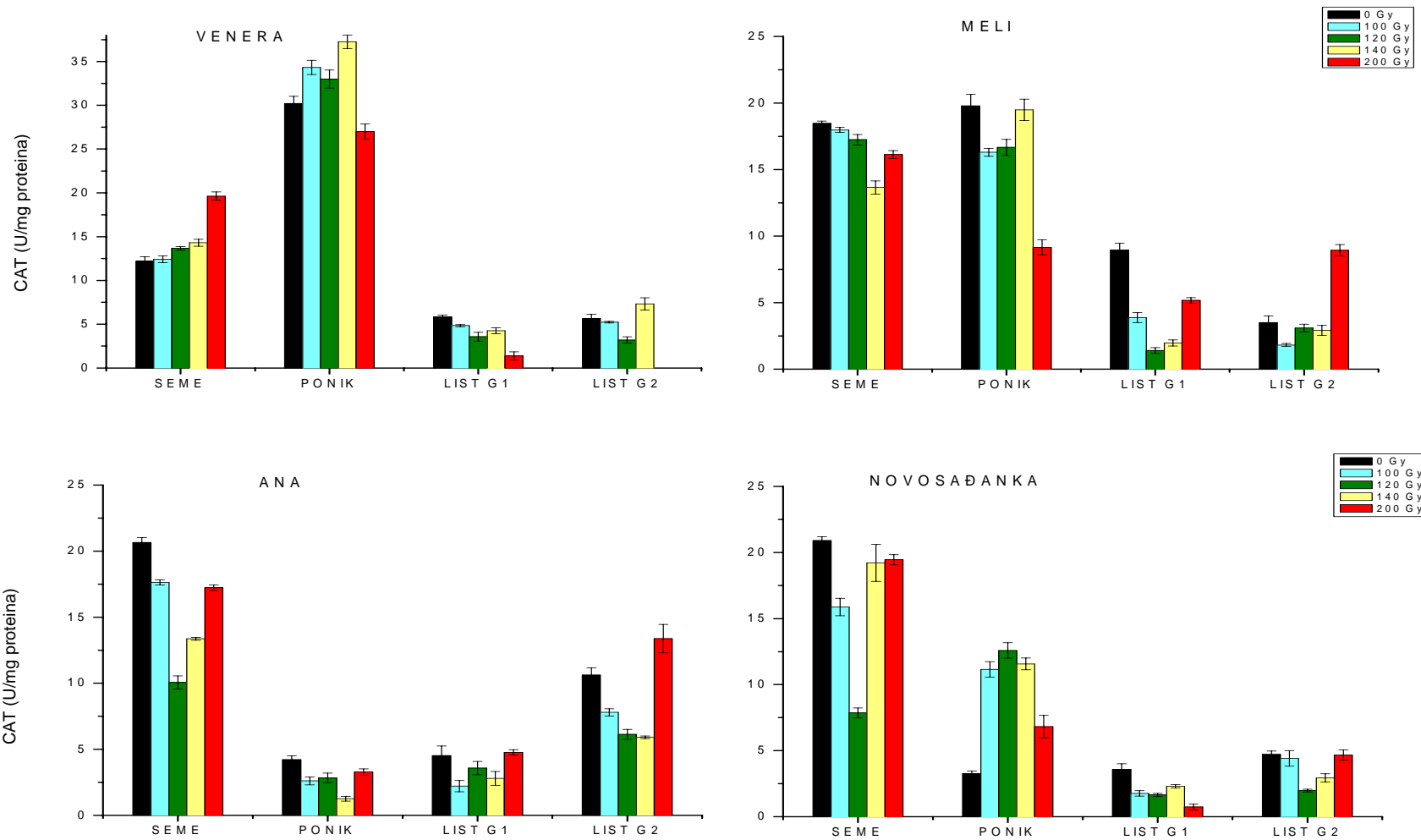
Grafikon 7. Uticaj niskih doza γ -zračenja na aktivnost CAT u poniku odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 8. Uticaj niskih doza γ -zračenja na aktivnost CAT u listu G1 odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 9. Uticaj niskih doza γ -zračenja na aktivnost CAT u listu G2 odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 10. Promene aktivnosti CAT tokom razvicia odabranih genotipova ozračene i neozračene soje kroz dve generacije

Pod uticajem različitih doza γ -zračenja aktivnost CAT se menjala u opsegu od: 1,38-4,84 U/mg proteina (Venera); 1,40-5,17 U/mg proteina (Meli); 2,22-4,77 U/mg proteina (Ana) i 0,751-2,31 U/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 8). Kod svih genotipova uočeno je smanjenje aktivnosti CAT. Najizrazitije smanjenje aktivnosti utvrđeno je pri dozi od 200 Gy kod genotipa Venera (76,3 %), pri dozi od 120 Gy kod genotipa Meli (84,4%), pri dozi od 100 Gy kod genotipa Ana (51,0%) i pri dozi od 200 Gy kod genotipa Novosađanka (79,1%).

List G2. Aktivnost CAT izražena u U/mg proteina je u kontrolama iznosila: 5,66 (Venera); 3,51 (Meli); 10,6 (Ana) i 4,72 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja aktivnost CAT se menjala u opsegu od: 3,20-7,32 U/mg proteina (Venera); 1,82-8,93 U/mg proteina (Meli); 5,91-13,38 U/mg proteina (Ana) i 1,99-4,67 U/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 9). Kod genotipa Venera značajna promena aktivnosti CAT utvrđena je jedino pri dozi od 120 Gy kada je utvrđeno njeno smanjenje od 43,5%. Kod genotipa Meli jedina značajna promena aktivnosti CAT utvrđena je pri dozi od 200 Gy kada je registrovano njeno povećanje za 154%. Kod genotipa Ana dolazi do najizrazitijeg smanjenja aktivnosti CAT pri dozi od 140 Gy (44,2%), a do najvećeg porasta aktivnosti CAT pri dozi od 200 Gy (26,2%). Kod genotipa Novosađanka dolazilo je do smanjenja aktivnosti CAT pri svim dozama zračenja, a najviše pri dozi od 120 Gy (57,8%).

Na grafikonu 10. prikazane su promene aktivnosti CAT tokom rasta i razvika odabranih genotipova ozračene i neozračene soje kroz dve generacije. Na osnovu uporedne analize aktivnosti CAT kod ozračenih i neozračenih genotipova soje mogu se izvući sledeći zaključci o delovanju γ -zračenja na njih:

- kod genotipa Venera utvrđeno je da se aktivnost CAT značajno povećavala u nakvašenom semenu i poniku pri nižim dozama zračenja dok je u listu G1 i G2 uočeno smanjenja aktivnosti CAT;
- kod genotipa Meli do značajnog porasta aktivnosti CAT došlo je jedino u listu G2 pri dozi od 200 Gy (154%). U ostalim fazama razvoja utvrđeno je smanjenje aktivnosti CAT;
- kod genotipa Ana došlo je do smanjenja aktivnosti CAT u svim fazama razvoja;
- kod genotipa Novosađanka do povećanja aktivnosti CAT došlo je jedino u poniku gde je pri dozi od 120 Gy zabeleženo najizrazitije povećanje aktivnosti CAT od 284%. U ostalim fazama razvoja aktivnost CAT se smanjivala.

Iz izloženog se može zaključiti da niske doze γ -zračenja dovode do indukcije aktivnosti CAT u nakvašenom semenu i poniku genotipa Venera, u poniku genotipa Novosađanka i u listu G2 genotipa Meli pri dozi od 200 Gy. U ostalim slučajevima uglavnom je dolazilo do opadanja aktivnosti CAT. U radovima Zaka i saradnika (2002) i Wada i saradnika (1998) takođe je zaključeno da aktivnost CAT može biti uključena u mehanizam razvoja rezistencije različitih biljnih vrsta radijacioni i oksidativni stres. Ovakva vrsta adaptacije na oksidativni stres uočena je kod hepatocita pacova tretiranih sa H_2O_2 kod kojih je utvrđena stimulacija aktivnosti CAT (Yukawa i sar., 1999).

Pored γ -zračenja poznato je da i mnogi drugi ekološki uticaji kao npr. UV-zračenje, herbicidi, delovanje patogena, ekstremne temperature, suša i sl. dovode do pojave oksidativnog stresa i do odgovarajuće biohemijske reakcije organizma (Yang i

Poovaiah, 2001; Štajner, 1990). Međutim, postoje brojni mehanizmi, enzimski i neenzimski, koji dovode do uklanjanja H₂O₂ iz ćelije (Neill i sar., 2002). Pri malim koncentracijama, H₂O₂ dovodi do aktiviranja „odbrambenih gena“ i do adaptivne reakcije organizma, tako da pri subletalnim koncentracijama H₂O₂ doprinosi otpornosti na oksidativni stres (Breusegem i sar., 2001).

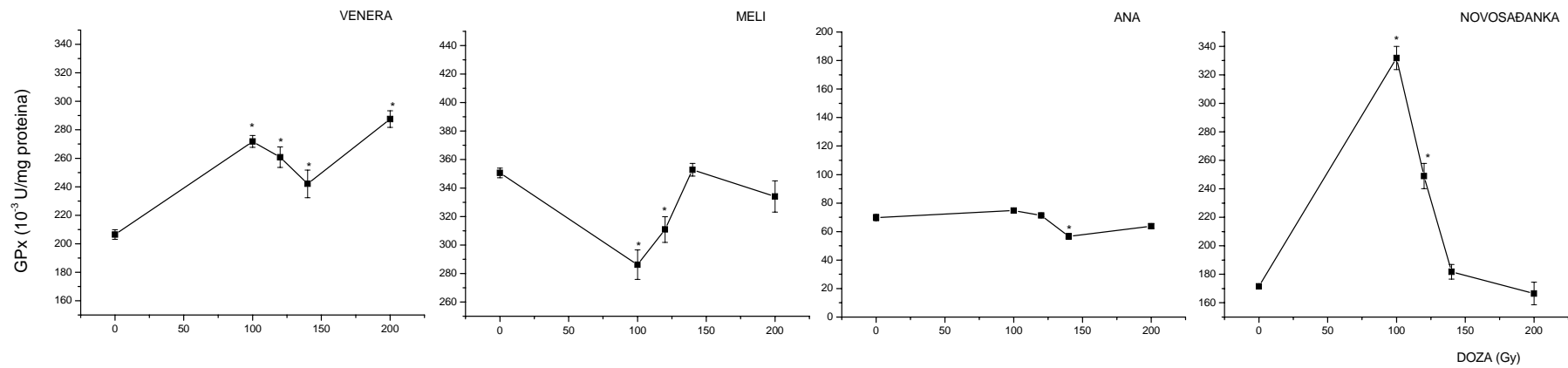
Podaci o delovanju UV-B zračenja na aktivnost CAT variraju u zavisnosti od biljne vrste. Tako, na primer, UV-B zračenje stimuliše aktivnost CAT indukujući novu izoformu ovog enzima u listu krompira, kod *Arabidopsis thaliana* ne utiče na aktivnost CAT (Rao i sar., 1996), a kod *Sorghum vulgare* (sirak) utiče na smanjenje aktivnosti CAT. Literaturni podaci o mogućoj ulozi CAT u mehanizmu rezistencije na parakvat, herbicida koji izaziva kod biljaka snažan oksidativni stres, ukazuju na moguću ulogu ovog enzima u razvijanju rezistencije na delovanje parakvata. Harper i Harvey (1978) i Ranade i Feierabend (1991) su zabeležili porast aktivnosti CAT kod parakvat rezistentnih biljaka.

4.1.3. Uticaj niskih doza γ -zračenja na aktivnost gvajakol-peroksidaze u različitim fazama razvoja soje

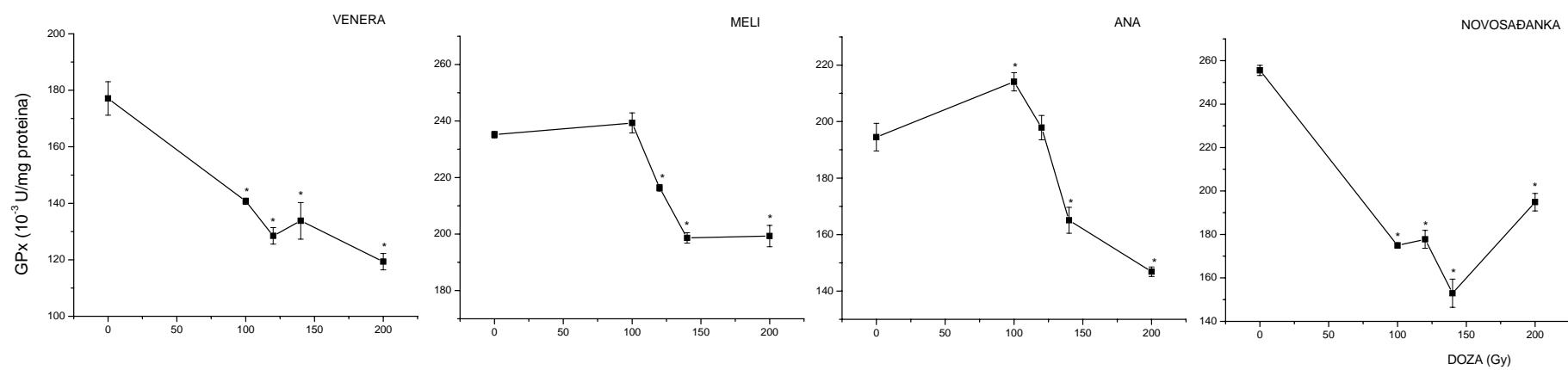
Na grafikonima 11-14. prikazani su rezultati ispitivanja uticaja niskih doza γ -zračenja na aktivnost gvajakol-peroksidaze u nakvašenom semenu, poniku i listu G1 i G2 odabranih genotipova soje.

Nakvašeno seme. Aktivnost GPx izražena u U/mg proteina je u kontrolama iznosila: 206 (Venera); 351 (Meli); 69,8 (Ana) i 172 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja aktivnost GPx se menjala u opsegu od: 242-288 U/mg proteina (Venera); 286-353 U/mg proteina (Meli); 56,6-74,7 U/mg proteina (Ana) i 166-332 U/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 11). Kod genotipa Venera utvrđeno je povećanje aktivnosti GPx pri svim dozama zračenja. Najveći porast aktivnosti GPx uočen je kod doze od 200 Gy i iznosio je 39,3% u odnosu na kontrolu. Jedina značajna promena aktivnosti GPx kod genotipa Meli utvrđena je pri dozi od 100 Gy kada je došlo do njenog smanjenja za 18,4%, a kod genotipa Ana pri dozi od 140 Gy kada se aktivnost GPx smanjila za 18,9%. Kod genotipa Novosađanka uočeno je značajno povećanje aktivnosti GPx pri nižim dozama zračenja, a naročito pri dozi od 100 Gy (93,4%).

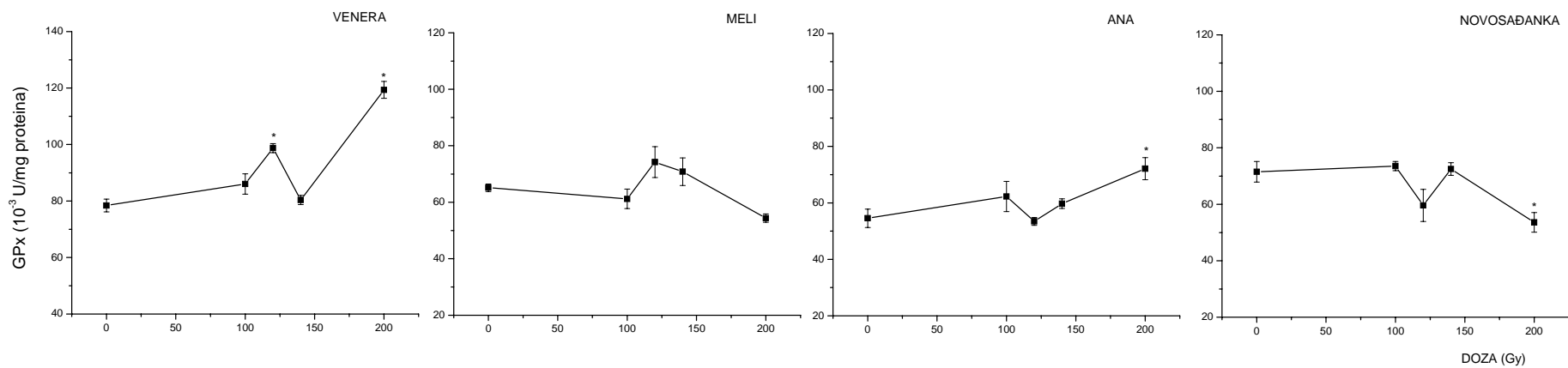
Ponik. Aktivnost GPx izražena u U/mg proteina je u kontrolama iznosila: 177 (Venera); 235 (Meli); 194 (Ana) i 256 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja aktivnost GPx se menjala u opsegu od: 119-141 U/mg proteina (Venera); 199-239 U/mg proteina (Meli); 147-214 U/mg proteina (Ana) i 153-195 U/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 12). Kod svih genotipova utvrđeno je značajno opadanje aktivnosti GPx pri dozama zračenja većim od 100 Gy. Kod genotipa Venera aktivnost GPx je opadala sa povećanjem doze zračenja a najveće smanjenje aktivnosti GPx zabeleženo je pri dozi od 200 Gy (32,6%). Kod genotipova Meli, Ana i Novosađanka utvrđeno je smanjenje aktivnosti CAT pri većim dozama zračenja. Najizrazitije smanjenje aktivnosti GPx utvrđeno je pri dozi od 140 Gy kod genotipova Meli (15,5%) i Novosađanka (40,2%), a kod genotipa Ana pri dozi od 200 Gy (24,5%).



Grafikon 11. Uticaj niskih doza γ -zračenja na aktivnost GPx u nakvašenom semenu odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$

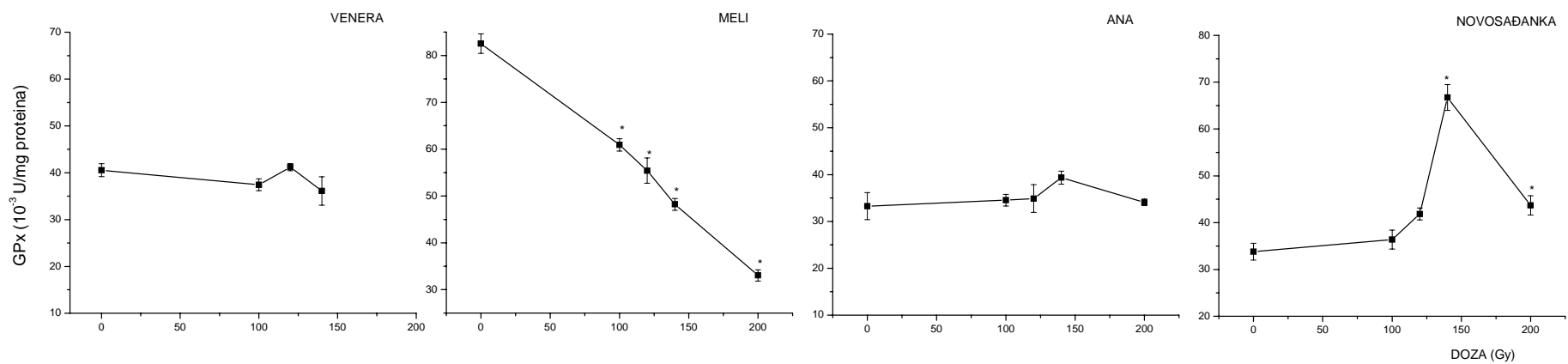


Grafikon 12. Uticaj niskih doza γ -zračenja na aktivnost GPx u poniku odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



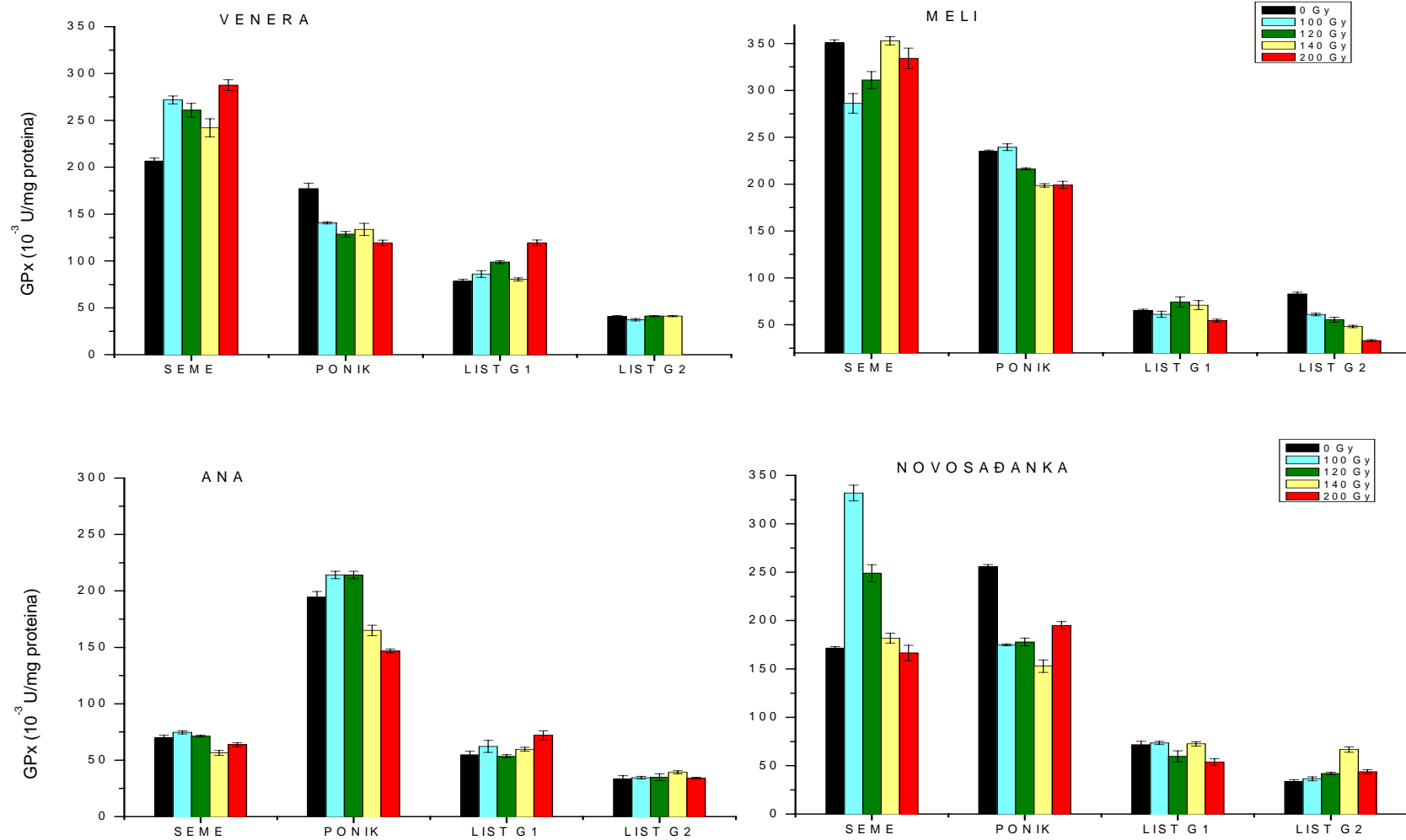
Grafikon 13. Uticaj niskih doza γ -zračenja na aktivnost GPx u listu G1 odabranih genotipova soje

* Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 14. Uticaj niskih doza γ -zračenja na aktivnost GPx u listu G2 odabranih genotipova soje

* Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 15. Promene aktivnosti GPx tokom razvića odabranih genotipova ozračene i neozračene soje kroz dve generacije

List G1. Aktivnost GPx izražena u U/mg proteina je u kontrolama iznosila: 78,4 (Venera); 65,1 (Meli); 54,6 (Ana) i 71,5 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja aktivnost GPx se menjala u opsegu od: 80,4-119 U/mg proteina (Venera); 54,4-74,2 U/mg proteina (Meli); 53,4-72,1 U/mg proteina (Ana) i 53,6-73,5 U/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 13). Za razliku od genotipa Meli kod koga nije utvrđena značajna promena aktivnosti GPx ni kod jedne doze zračenja, kod ostalih genotipova utvrđena je značajna promena aktivnosti GPx pri dozi od 200 Gy. Aktivnost GPx se pri ovoj dozi povećala kod genotipa Venera za 52,1%, a kod genotipa Ana za 32,1%, dok se kod genotipa Novosađanka smanjila za 25,0%.

List G2. Aktivnost GPx izražena u U/mg proteina je u kontrolama iznosila: 40,5 (Venera); 82,6 (Meli); 33,3 (Ana) i 33,8 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja aktivnost GPx se menjala u opsegu od: 36,1-41,2 U/mg proteina (Venera); 33,0-60,9 U/mg proteina (Meli); 34,1-39,3 U/mg proteina (Ana) i 36,4-66,7 U/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 14). Kod genotipova Venera i Ana nije utvrđena značajna promena aktivnosti GPx ni kod jedne doze zračenja. Kod genotipa Meli aktivnost GPx se smanjivala sa porastom doze zračenja, tako da je najveće smanjenje aktivnosti registrovano kod doze od 200 Gy (60,1%). Kod genotipa Novosađanka aktivnost GPx se povećavala pri svim dozama zračenja, a najveći porast aktivnosti uočen je kod doze od 140 Gy (97,34%).

Na grafikonu 15. prikazane su promene aktivnosti GPx tokom rasta i razvicia odabranih genotipova ozračene i neozračene soje kroz dve generacije. Na osnovu uporedne analize aktivnosti GPx kod ozračenih i neozračenih genotipova soje mogu se izvući sledeći zaključci o delovanju γ -zračenja na njih:

- kod genotipa Venera utvrđeno je da se aktivnost GPx povećavala u nakvašenom semenu i listu G1 dok se u poniku i listu G2 smanjivala;
- kod genotipa Meli aktivnost GPx se smanjivala u svim fazama razvoja, a naročito u listu G2;
- kod genotipa Ana aktivnost GPx se u značajnijoj meri povećavala jedino u listu G1, a smanjivala u poniku pri većim dozama zračenja. U nakvašenom semenu i listu G2 nije utvrđena značajnija promena aktivnosti GPx;
- kod genotipa Novosađanka aktivnost GPx se povećavala u nakvašenom semenu pri manjim dozama zračenja i listu G2. U ostalim fazama razvoja aktivnost GPx se smanjivala.

Može se zaključiti da niske doze γ -zračenja dovode do indukcije aktivnosti GPx u pojedinim fazama razvoja genotipova Venera, Ana i Novosađanka. I drugi autori navode da γ -zračenje utiče na promenu aktivnosti GPx kod biljaka (Crocini i sar., 1991; Singh i sar., 1993). Wada i saradnici (1998) ukazuju da biljke kod kojih je utvrđena veća aktivnost GPx pokazuju i veću otpornost na delovanje radijacionog i oksidativnog stresa. Zaka i saradnici (2002) takođe ukazuju da γ -zračenje može izazvati povećanje aktivnosti GPx i da i ovaj enzim zajedno sa ostalim antioksidantnim enzimima doprinosi razvoju radiorezistentnosti kod nekih biljaka. Santos i saradnici (2004) su utvrdili da aktivnost GPx doprinosi tolerantnosti na delovanje UV-B zračenja. U listovima krompira odgajanog pod uticajem pojačanog UV-B zračenja identifikovane su tri nove izoforme GPx uključene u mehanizam antioksidantne zaštite od delovanja oksidativnog i UV-radijacionog stresa.

Poznato je da različiti oblici biotičkog i abiotičkog stresa uslovljavaju porast aktivnosti peroksidaze. Najveći broj podataka odnosi se na delovanje parakvata. Tako su Kwak i saradnici (1996) su ustanovili da uticaj parakvata na aktivnost peroksidaze zavisi od dužine delovanja herbicida. Prvih dana, pod uticajem parakvata, primećeno je povećanje aktivnosti peroksidaze. Sa vremenom, aktivnost peroksidaze se smanjuje u tretiranim biljkama.

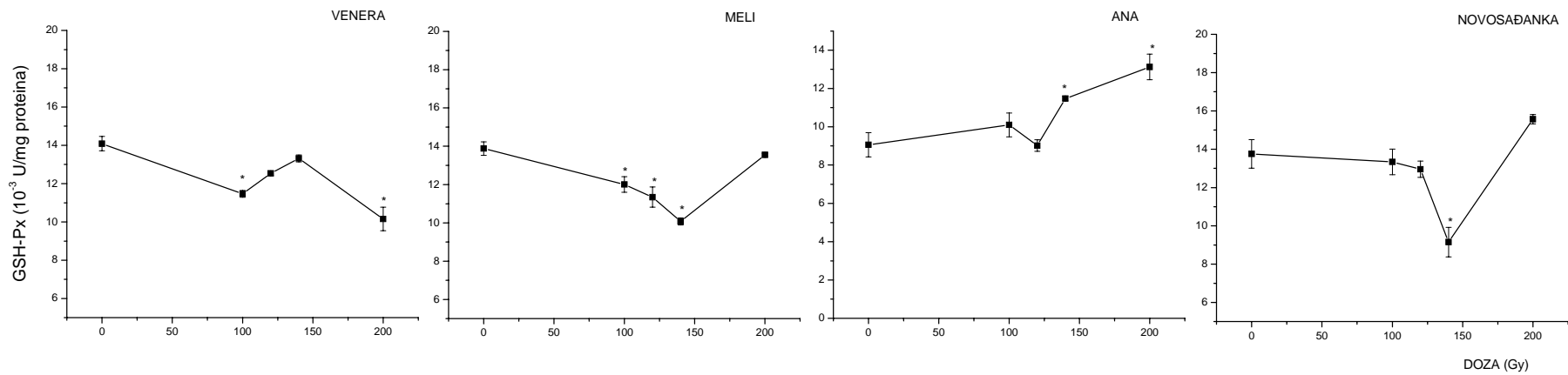
4.1.4. Uticaj niskih doza γ -zračenja na aktivnost glutation-peroksidaze u različitim fazama razvoja soje

Na grafikonima 16-19. prikazani su rezultati ispitivanja uticaja niskih doza γ -zračenja na aktivnost glutation-peroksidaze u nakvašenom semenu, poniku i listu G1 i G2 odabranih genotipova soje.

Nakvašeno seme. Aktivnost GSH-Px izražena u U/mg proteina je u kontrolama iznosila: 14,1 (Venera); 13,9 (Meli); 9,06 (Ana) i 13,8 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja aktivnost GSH-Px se menjala u opsegu od: 10,2-13,3 U/mg proteina (Venera); 10,1-13,6 U/mg proteina (Meli); 9,02-13,1 U/mg proteina (Ana) i 9,15-15,6 U/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 16). Kod genotipa Venera utvrđeno je da dolazi do smanjenja aktivnosti GSH-Px pri svim dozama zračenja a naročito pri dozi od 200 Gy gde je zapaženo smanjenje od 27,6% u odnosu na kontrolu. Kod genotipova Meli i Novosađanka značajna promena aktivnosti GSH-Px uočena je jedino pri dozi od 140 Gy kada je kod genotipa Meli utvrđeno smanjenje aktivnosti za 27,3%, a kod genotipa Novosađanka za 33,7%. Kod genotipa Ana aktivnost GSH-Px se povećavala pri većim dozama zračenja. Najveće povećanje GSH-Px aktivnosti uočeno je kod doze od 200 Gy (44,6%).

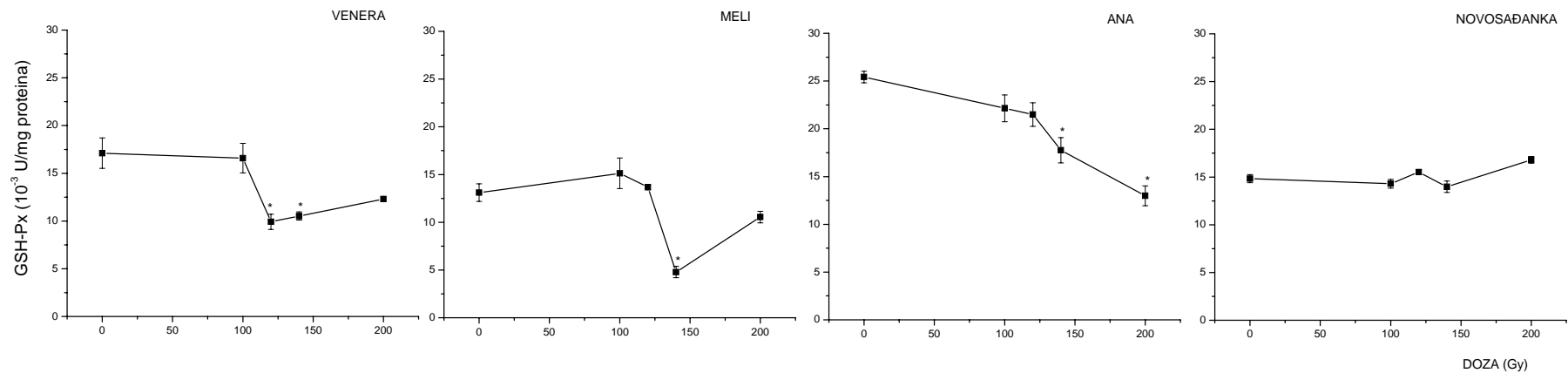
Ponik. Aktivnost GSH-Px izražena u U/mg proteina je u kontrolama iznosila: 17,1 (Venera); 13,1 (Meli); 25,4 (Ana) i 14,8 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja aktivnost GSH-Px se menjala u opsegu od: 9,92-16,6 U/mg proteina (Venera); 4,78-15,1 U/mg proteina (Meli); 13,0-22,1 U/mg proteina (Ana) i 14,0-16,8 U/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 17). Kod genotipova Venera, Meli i Ana došlo je do smanjenja aktivnosti GSH-Px, naročito pri većim dozama zračenja. Najveće smanjenje aktivnosti GSH-Px uočeno je pri dozi od 120 Gy kod genotipa Venera (42,0%), pri dozi od 140 Gy kod genotipa Meli (63,5%) i pri dozi od 200 Gy kod genotipa Ana (48,8%). Kod genotipa Novosađanka aktivnost GSH-Px nije se menjala u značajnoj meri ni kod jedne doze zračenja.

List G1. Aktivnost GSH-Px izražena u U/mg proteina je u kontrolama iznosila: 7,87 (Venera); 32,3 (Meli); 25,1 (Ana) i 14,1 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja aktivnost GSH-Px se menjala u opsegu od: 6,20-17,0 U/mg proteina (Venera); 26,1-26,9 U/mg proteina (Meli); 0,947-16,5 U/mg proteina (Ana) i 3,94-11,8 U/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 18). Kod genotipa Venera došlo je do povećanja aktivnosti GSH-Px pri većim dozama γ -zračenja, naročito pri dozi od 200 Gy (116%). Kod ostalih genotipova aktivnost GSH-Px smanjivala se pri svim dozama zračenja. Najveće smanjenje aktivnosti GSH-Px zapaženo je pri dozi od 100 Gy kod genotipa Meli (19,2%), pri dozi od 140 Gy kod genotipa Ana (96,2%) i pri dozi od 200 Gy kod genotipa Novosađanka (72,1%).



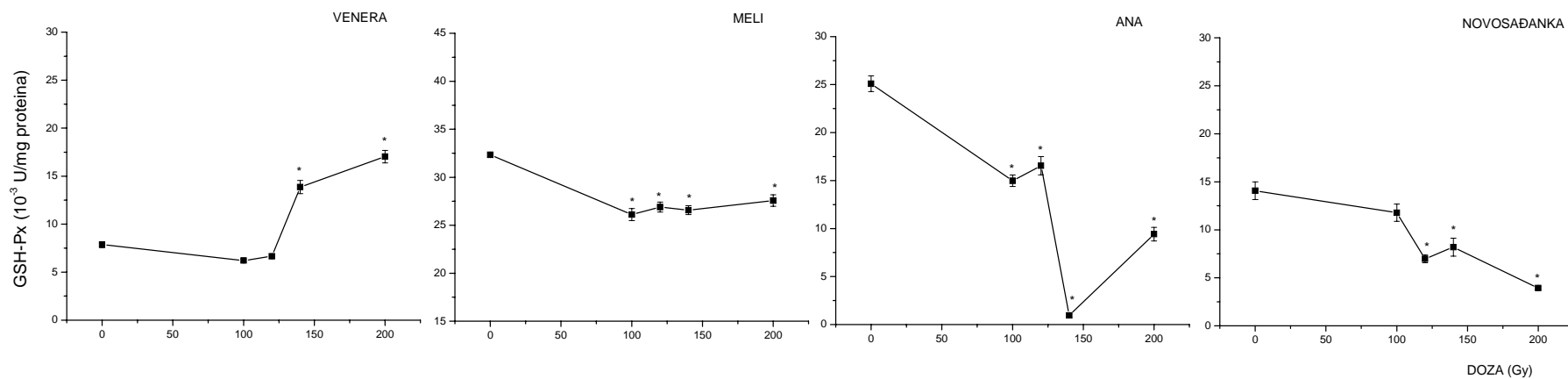
Grafikon 16. Uticaj niskih doza γ -zračenja na GSH-Px aktivnost u nakvašenom semenu odabranih genotipova soje

* Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$

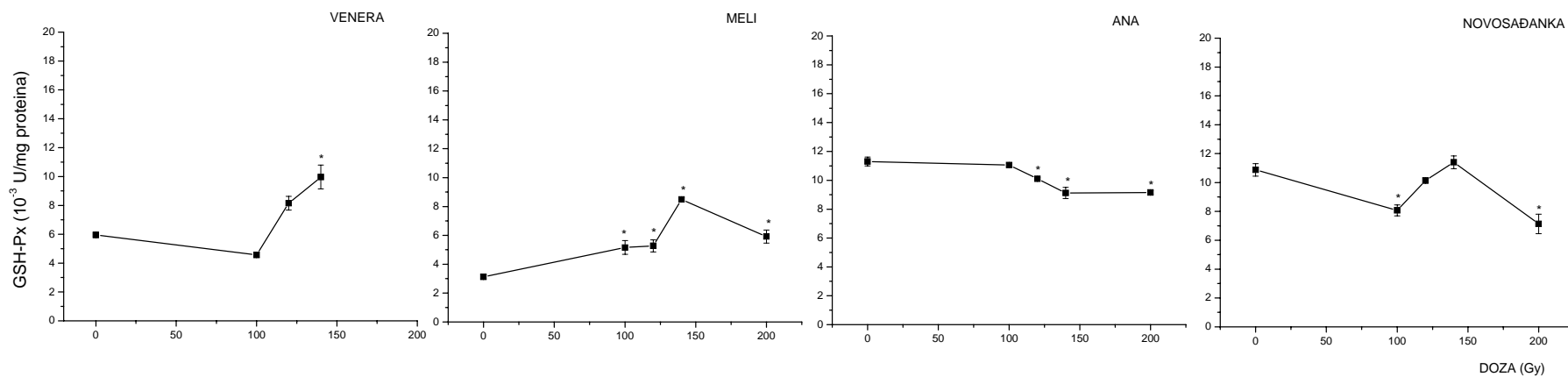


Grafikon 17. Uticaj niskih doza γ -zračenja na GSH-Px aktivnost u poniku odabranih genotipova soje

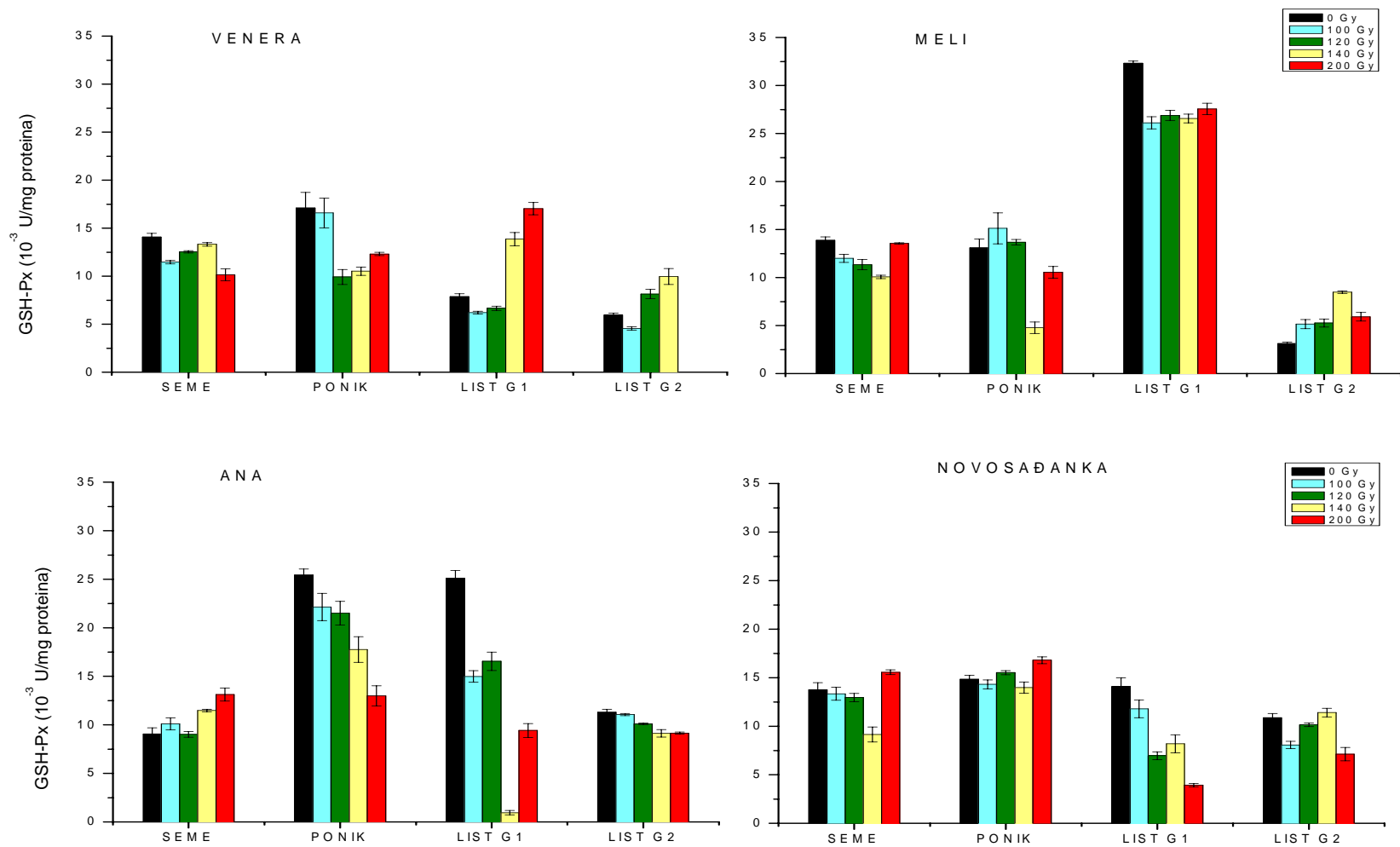
* Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 18. Uticaj niskih doza γ -zračenja na GSH-Px aktivnost u listu G1 odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 19. Uticaj niskih doza γ -zračenja na GSH-Px aktivnost u listu G2 odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 20. Promene aktivnosti GSH-Px tokom razvića odabranih genotipova ozračene i neozračene soje kroz dve generacije

List G2. Aktivnost GSH-Px izražena u U/mg proteina je u kontrolama iznosila: 5,96 (Venera); 3,12 (Meli); 11,3 (Ana) i 10,9 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja aktivnost GSH-Px se menjala u opsegu od: 4,56-9,97 U/mg proteina (Venera); 5,16-8,48 U/mg proteina (Meli); 9,12-11,1 U/mg proteina (Ana) i 7,13-11,4 U/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 19). Kod genotipa Venera utvrđena je značajna promena aktivnosti GSH-Px jedino pri dozi od 140 Gy kada je utvrđeno povećanje aktivnosti za 67,3%. Kod genotipa Meli uočeno je povećanje aktivnosti GSH-Px pri svim dozama zračenja, a najveće pri dozi od 140 Gy (171,8%). Kod genotipova Ana i Novosađanka aktivnost GSH-Px se u značajnoj meri smanjila jedino pri dozi od 140 Gy kod genotipa Ana (19,3%) i pri dozi od 200 Gy kod genotipa Novosađanka (34,6%).

Na grafikonu 20. prikazane su promene aktivnosti GSH-Px tokom rasta i razvića odabranih genotipova ozračene i neozračene soje kroz dve generacije. Na osnovu uporedne analize aktivnosti GSH-Px kod ozračenih i neozračenih genotipova soje mogu se izvući sledeći zaključci o delovanju γ -zračenja na njih:

- kod genotipa Venera dolazilo je do povećanja aktivnosti GSH-Px u listu G1 i G2. U listu G1 došlo je do značajnog povećanja aktivnosti GSH-Px od 116% pri dozi od 200 Gy. U nakvašenom semenu i poniku došlo je do smanjenja aktivnosti GSH-Px;
- kod genotipa Meli došlo je do povećanja aktivnosti GSH-Px jedino u listu G2. Najveći porast aktivnosti od 172% uočen je pri dozi od 140 Gy. U ostalim fazama razvoja utvrđeno je smanjenje aktivnosti GSH-Px;
- kod genotipa Ana uočeno je smanjenje aktivnosti GSH-Px u svim fazama razvoja sem u nakvašenom semenu;
- kod genotipa Novosađanka došlo je do smanjenja aktivnosti GSH-Px u svim fazama razvoja sem u poniku gde nije uočena značajna promena aktivnosti GSH-Px.

Iz izloženog se može zaključiti da niske doze γ -zračenja dovode do povećanja aktivnosti GSH-Px u listu G1 i G2 kod genotipa Venera i u listu G2 kod genotipa Meli.

Mišljenja o postojanju GSH-Px aktivnosti kod biljaka su veoma podeljena. U određenom broju radova je publikovano da postoji GSH-Px aktivnost kod nekih viših biljaka. Tako su Holland i saradnici (1993) iz citrusnih biljaka izolovali protein koji pokazuje visok stepen homologije sa glutation-peroksidazom sisara. U pomenutom radu je utvrđeno da ovaj „glutation-peroksidazi sličan protein“ doprinosi tolerantnosti *Escherichia coli* na oksidativni stres izazvan delovanjem parakvata.

Sun i saradnici (1997) utvrdili su da aktivnost GSH-Px u izvesnoj meri doprinosi rezistentnosti humanih ćelija na delovanje γ -zračenja, ali da najznačajniju ulogu u pojavi radiorezistentnosti igra MnSOD. Sa druge strane, Nomura i Yamaoka (1999) su pokazali da niske doze γ -zračenja dovode do smanjenja oksidativnog stresa izazvanog u tkivima miševa pomoću CCl_4 . Ovo „antioksidantno delovanje“ niskih doza γ -zračenja dovedeno je u vezu sa povećanjem aktivnosti GSH-Px i GR (glutation-reduktaze).

4.1.5. Uticaj niskih doza γ -zračenja na količinu redukovanog glutationa u različitim fazama razvoja soje

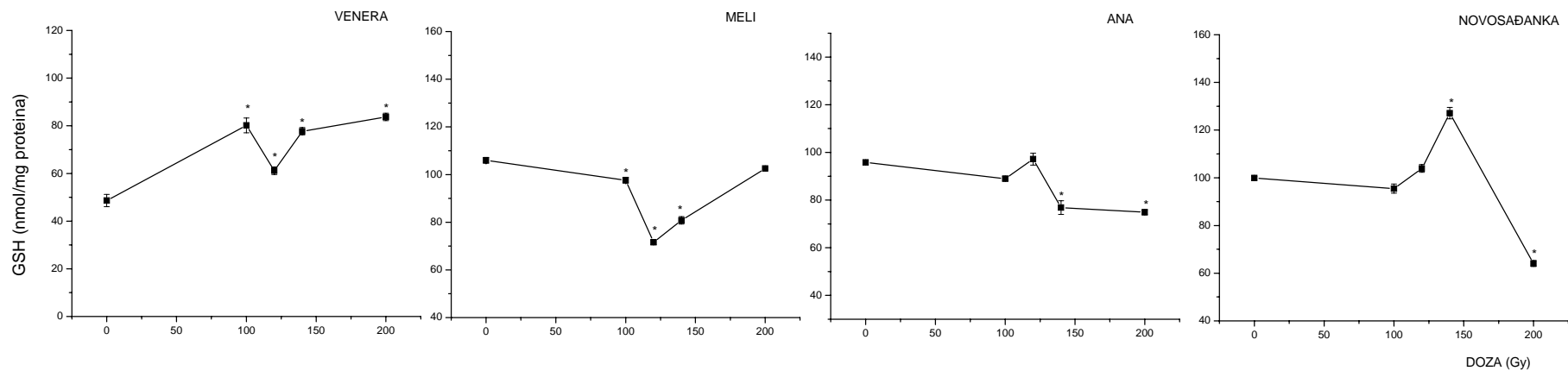
Na grafikonima 21-24. prikazani su rezultati ispitivanja uticaja niskih doza γ -zračenja na količinu redukovanog glutationa u nakvašenom semenu, poniku i listu G1 i G2 odabranih genotipova soje.

Nakvašeno seme. Količina GSH izražena u nmol/mg proteina je u kontrolama iznosila: 48,6 (Venera); 106 (Meli); 95,8 (Ana) i 100 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja količina GSH se menjala u opsegu od: 61,1-83,7 nmol/mg proteina (Venera); 71,6-102 nmol/mg proteina (Meli); 74,9-97,2 nmol/mg proteina (Ana) i 64,0-127 nmol/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 21). Kod genotipa Venera dolazilo je do povećanja količine GSH pri svim dozama zračenja, a najizrazitije povećanje utvrđeno je pri dozi od 200 Gy (72,2%). Kod genotipa Meli utvrđeno je smanjenje količine GSH pri svim dozama zračenja, a najveće pri dozi od 120 Gy (32,4%). Kod genotipa Ana značajne promene količine GSH uočene su pri većim dozama zračenja, a naročito pri dozi od 200 Gy kada je količina GSH smanjena za 21,8%. Kod genotipa Novosađanka uočeno je značajno povećanje količine GSH pri dozi od 140 Gy (27,0%), a značajno smanjenje pri dozi od 200 Gy (36,0%).

Ponik. Količina GSH izražena u nmol/mg proteina je u kontrolama iznosila: 87,7 (Venera); 157 (Meli); 135 (Ana) i 176 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja količina GSH se menjala u opsegu od: 85,1-105 nmol/mg proteina (Venera); 129-172 nmol/mg proteina (Meli); 92,8-139 nmol/mg proteina (Ana) i 139-145 nmol/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 22). Kod genotipa Venera jedina značajna promena količine GSH uočena je pri dozi od 140 Gy kada je utvrđeno njeno povećanje od 19,7%. Jedina značajna promena količine GSH kod genotipa Meli bila je njeno smanjenje za 17,8% uočeno pri dozi od 200 Gy. Kod genotipova Ana i Novosađanka utvrđeno je smanjenje količine GSH pri svim dozama. Najizrazitije smanjenje količine GSH je utvrđeno pri dozi od 140 Gy kod genotipa Ana (31,2%), a pri dozi od 120 Gy kod genotipa Novosađanka (21,0%).

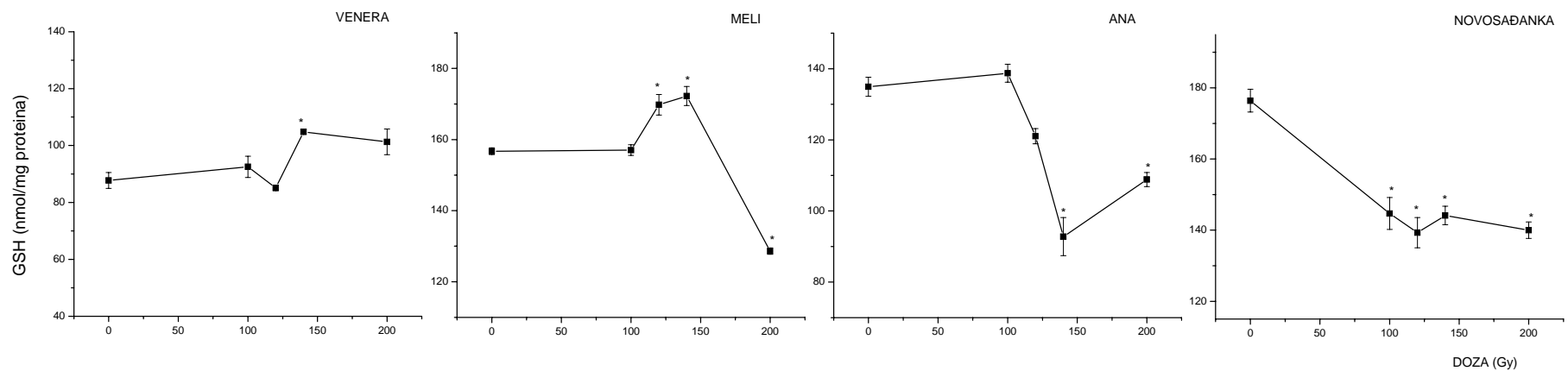
List G1. Količina GSH izražena u nmol/mg proteina je u kontrolama iznosila: 115 (Venera); 246 (Meli); 343 (Ana) i 313 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja količina GSH se menjala u opsegu od: 137-236 nmol/mg proteina (Venera); 208-340 nmol/mg proteina (Meli); 281-363 nmol/mg proteina (Ana) i 199-317 nmol/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 23). Kod genotipa Venera dolazilo je do povećanja količine GSH pri svim dozama zračenja. Najveći porast količine GSH od 105% utvrđeno je pri dozi od 200 Gy. Kod genotipa Meli količina GSH se povećavala u značajnoj meri pri većim dozama zračenja, a naročito pri dozi od 200 Gy (38,2%). Jedina značajna promena količine GSH kod genotipa Ana utvrđena je pri dozi od 120 Gy kada se smanjila za 18,1%. Kod genotipa Novosađanka količina GSH se smanjivala sa povećanjem doze zračenja. Najveće smanjenje količine GSH uočeno je pri dozi od 200 Gy (36,4%).

List G2. Količina GSH izražena u nmol/mg proteina je u kontrolama iznosila: 167 (Venera); 184 (Meli); 90 (Ana) i 108 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja količina GSH se menjala u opsegu od: 154-167 nmol/mg proteina (Venera); 159-180 nmol/mg proteina (Meli); 95-132 nmol/mg proteina (Ana) i 111-197 nmol/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 24).



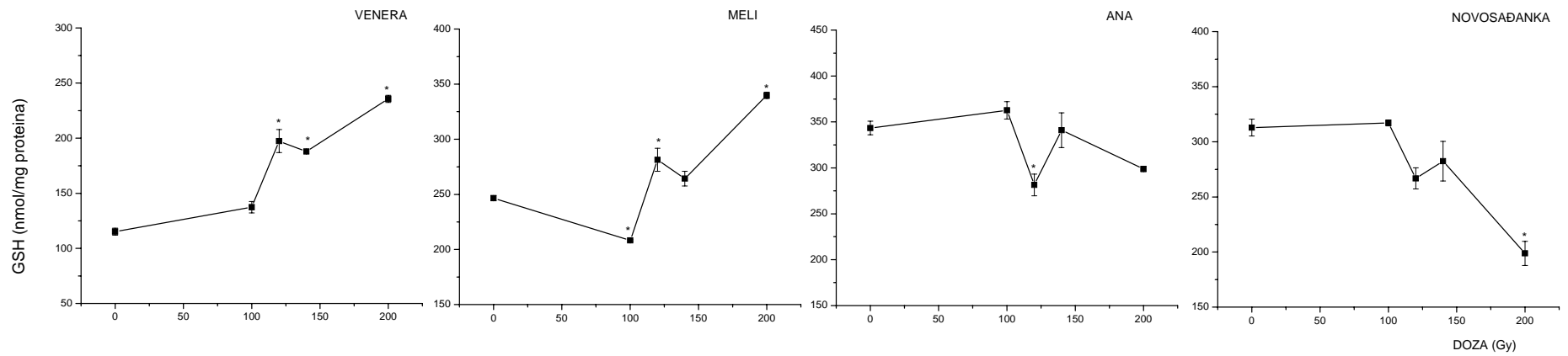
Grafikon 21. Uticaj niskih doza γ -zračenja na količinu GSH u nakvašenom semenu odabranih genotipova soje

* Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$

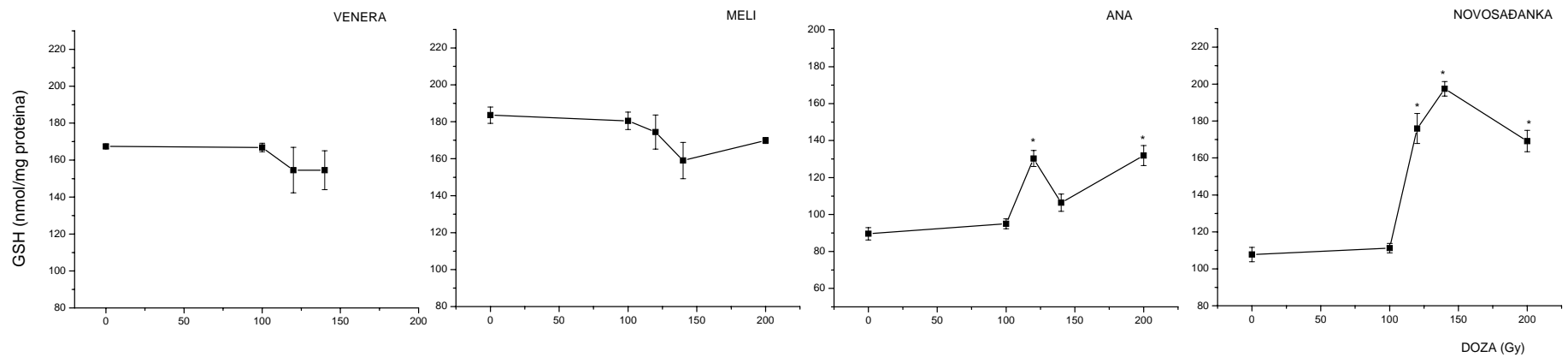


Grafikon 22. Uticaj niskih doza γ -zračenja na količinu GSH u poniku odabranih genotipova soje

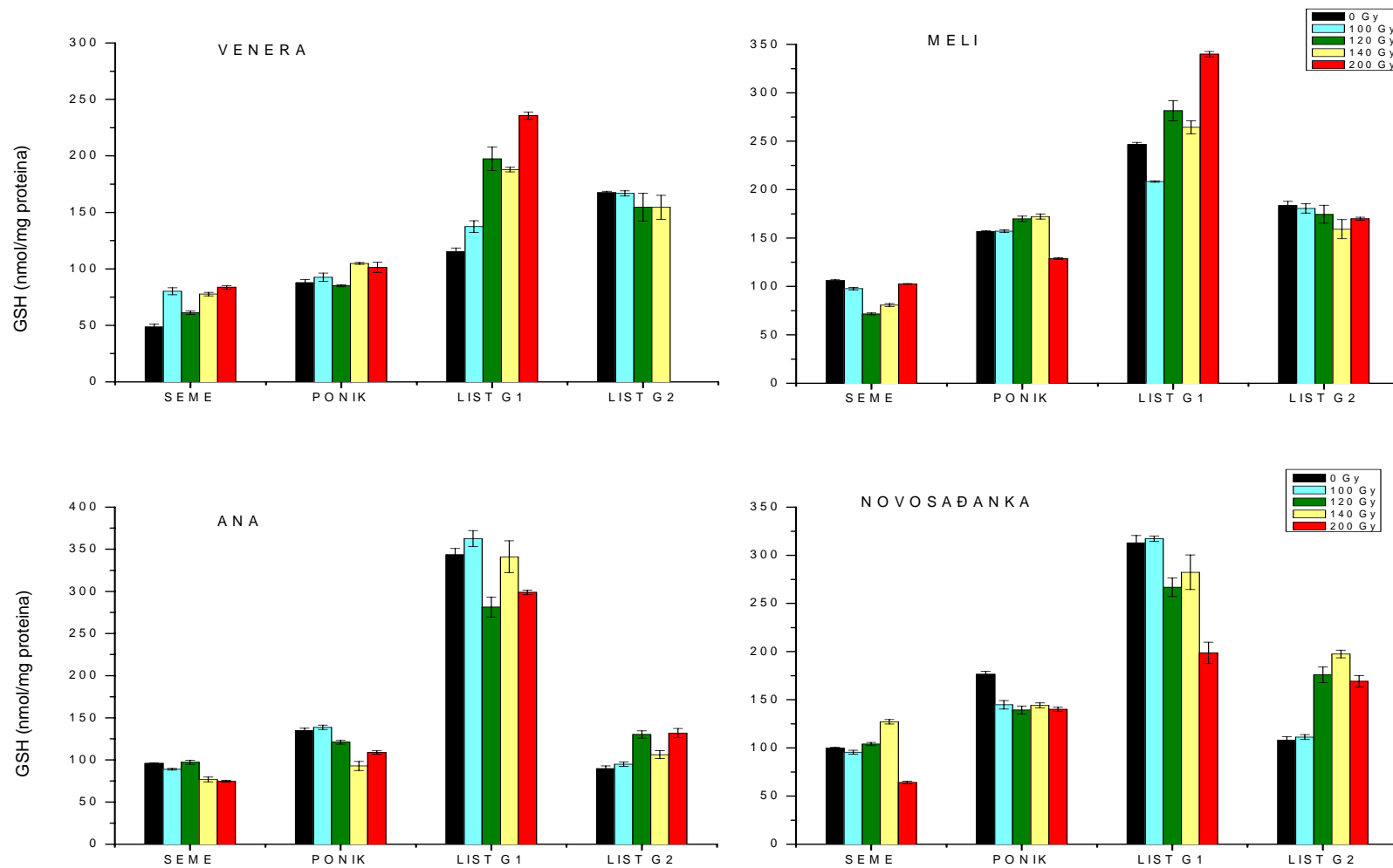
* Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 23. Uticaj niskih doza γ -zraćenja na količinu GSH u listu G1 odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 24. Uticaj niskih doza γ -zraćenja na količinu GSH u listu G2 odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 25. Promene u količini GSH tokom razvića odabranih genotipova ozračene i neozračene soje kroz dve generacije

Kod genotipova Venera i Meli količina GSH se nije menjala u značajnoj meri u odnosu na kontrolu. Kod genotipova Ana i Novosađanka utvrđeno je povećanje količine GSH, naročito pri većim dozama zračenja. Najveći porast količine GSH utvrđen je pri dozi od 200 Gy kod genotipa Ana (46,7%), a pri dozi od 140 Gy kod genotipa Novosađanka (82,4%).

Na grafikonu 25. prikazane su promene količine GSH tokom rasta i razvića odabranih genotipova ozračene i neozračene soje kroz dve generacije. Na osnovu uporedne analize količine GSH kod ozračenih i neozračenih genotipova soje mogu se izvući sledeći zaključci o delovanju γ -zračenja na njih:

- kod genotipa Venera utvrđeno je povećanje količine GSH u nakvašenom semenu, poniku i listu G1 dok se u listu G2 nije menjala u značajnoj meri. Najveći porast količine GSH utvrđen je u listu G1 pri dozi od 200 Gy (105%);
- kod genotipa Meli značajnije promene GSH uočene su u nakvašenom semenu gde je došlo do smanjenja i listu G1 gde je došlo do povećanja količine GSH;
- kod genotipa Ana uočeno je smanjenje količine GSH u nakvašenom semenu, poniku i listu G1 dok je u listu G2 utvrđeno povećanje količine GSH;
- kod genotipa Novosađanka utvrđeno je smanjenje količine GSH u nakvašenom semenu pri dozi od 200 Gy, poniku i listu G1 dok je u listu G2 registrovano povećanje količine GSH pri većim dozama zračenja.

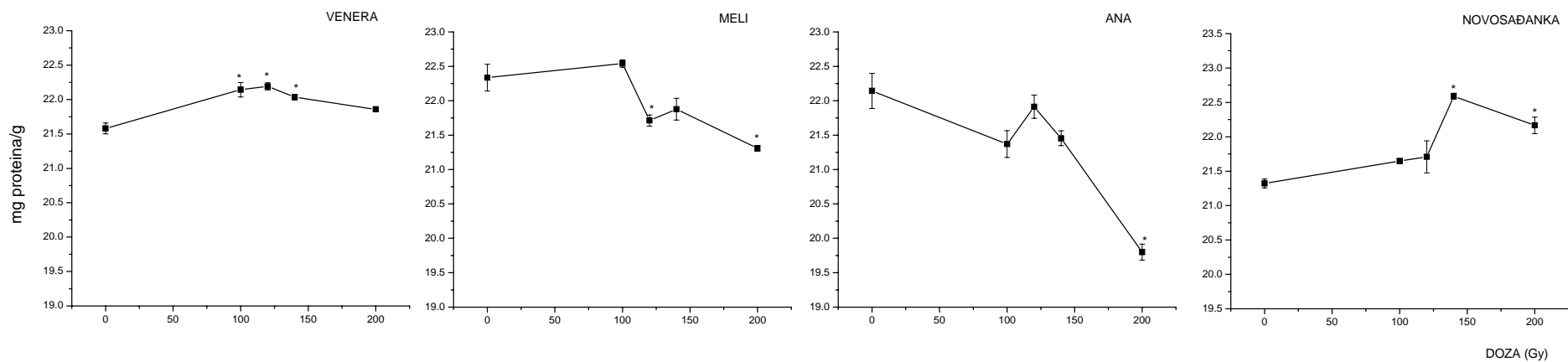
Može se zaključiti da niske doze γ -zračenja dovode do povećanja sadržaja GSH u nekim fazama razvoja soje u zavisnosti od genotipa. Može se pretpostaviti da GSH doprinosi otpornosti na radijacioni i oksidativni stres u zavisnosti od faze razvoja. Povećanje količine GSH se verovatno može dovesti u vezu sa povećanjem aktivnosti enzima glutation-reduktaze koji omogućuje recikliranje „korisnog“ redukovanog oblika glutationa.

Zaka i saradnici (2002) navode da niske doze γ -zračenja pozitivno utiču i na GR pored ostalih antioksidantnih enzima kod *Stipa capillata* (Poaceae). Pod uticajem različitih ksenobiotika kao npr. herbicida najčešće dolazi do smanjenja količine GSH što se može objasniti angažovanošću GSH u reakcijama detoksikacije koje katalizuje enzim glutation-S-transferaza. Veći deo GSH tada ostaje „zarobljen“ u vidu S-glutation-konjugata (Lamourex i sar., 1981).

Uticaj niskih doza γ -zračenja na količinu GSH i njegov metabolizam uglavnom je istraživan u animalnim tkivima. Nomura i Yamaoka (1999) su utvrdili da niske doze γ -zračenja dovode do sniženja oksidativnog stresa izazvanog u tkivima miševa što je dovedeno u vezu sa povećanjem aktivnosti antioksidantnih enzima GSH-Px i GR kao i sa povećanjem količine ukupnog glutationa (GSH i GSSG). Povećanje količine ukupnog glutationa povezano je sa pozitivnim uticajem niskih doza γ -zračenja na γ -glutamilstein-sintetazu koja dovodi do nastajanja γ -glutamilsteina, direktnog prekursora redukovanog glutationa.

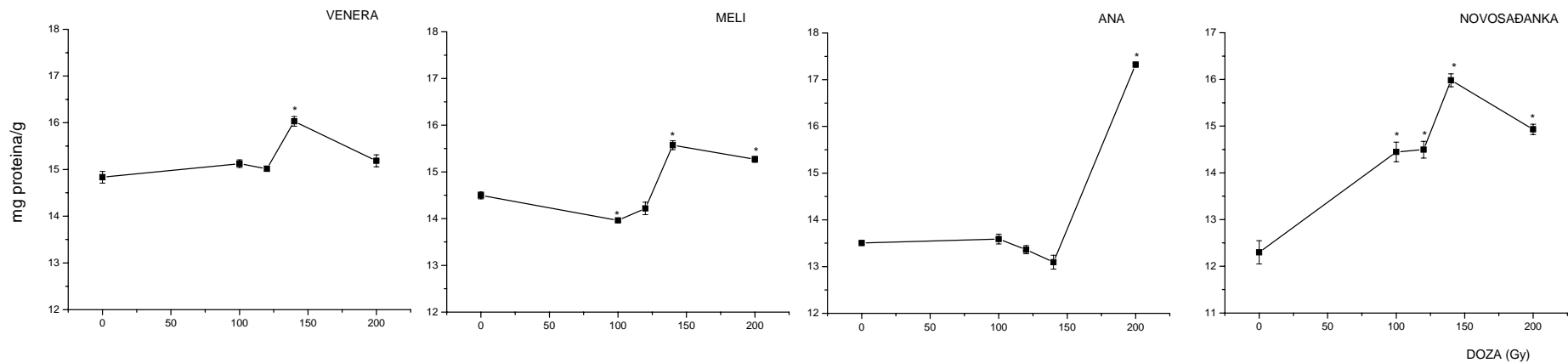
4.1.6. Uticaj niskih doza γ -zračenja na sadržaj rastvorljivih proteina u različitim fazama razvoja soje

Na grafikonima 26-29. prikazani su rezultati ispitivanja uticaja niskih doza γ -zračenja na sadržaj rastvorljivih proteina u nakvašenom semenu, poniku i listu G1 i G2 odabranih genotipova soje.



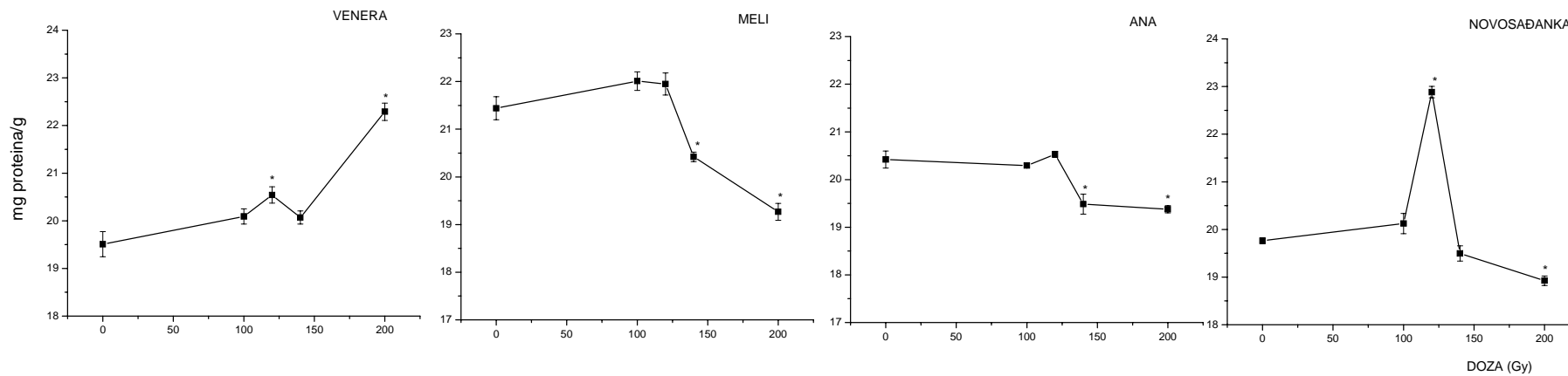
Grafikon 26. Uticaj niskih doza γ -zračenja na sadržaj rastvorljivih proteina u nakvašenom semenu odabranih genotipova soje

* Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$

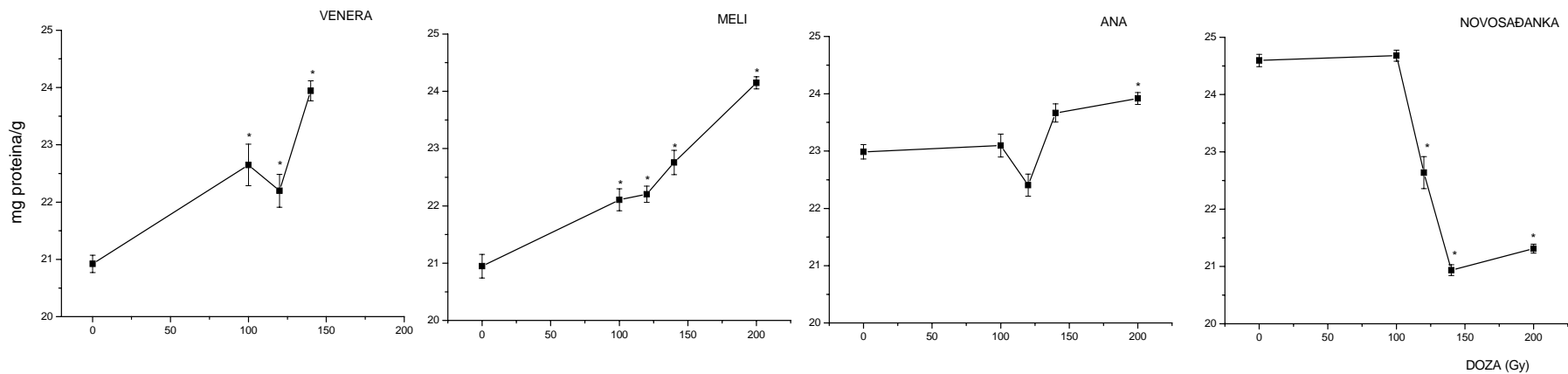


Grafikon 27. Uticaj niskih doza γ -zračenja na sadržaj rastvorljivih proteina u poniku odabranih genotipova soje

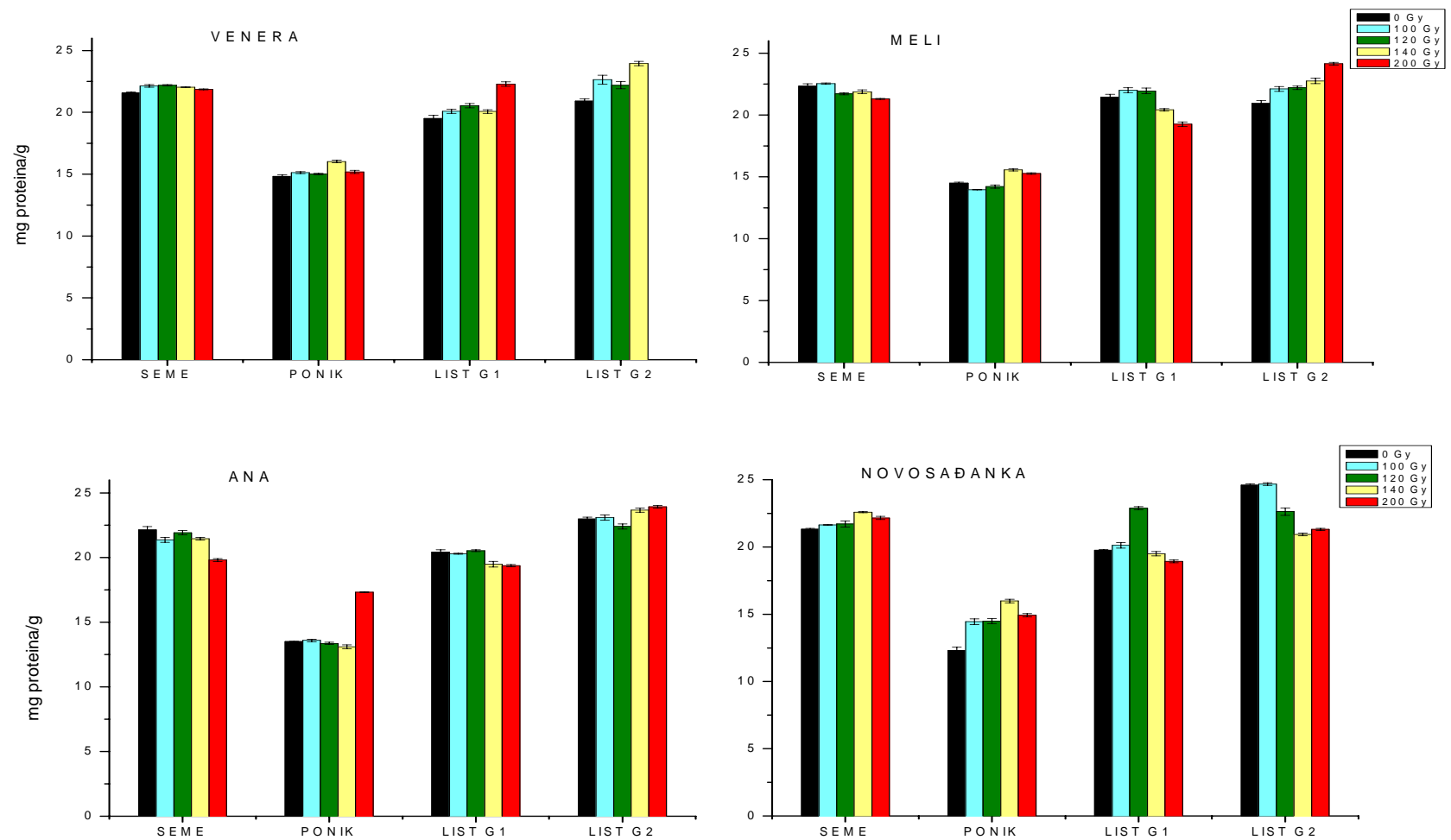
* Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 28. Uticaj niskih doza γ -zračenja na sadržaj rastvorljivih proteina u listu G1 odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 29. Uticaj niskih doza γ -zračenja na sadržaj rastvorljivih proteina u listu G2 odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 30. Promene u sadržaju rastvorljivih proteina tokom razvića odabranih genotipova ozračene i neozračene soje kroz dve generacije

Nakvašeno seme. Sadržaj rastvorljivih proteina izražen u mg/g je u kontrolama iznosio: 21,6 (Venera); 22,3 (Meli); 22,1 (Ana) i 21,3 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja sadržaj rastvorljivih proteina se menjao u opsegu od: 21,8-22,2 mg/g (Venera); 21,3-22,5 mg/g (Meli); 19,8-21,9 mg/g (Ana) i 21,6-22,6 mg/g (Novosađanka), (Grafikon 26). Promene u sadržaju rastvorljivih proteina bile su manje od 15% u odnosu na kontrolu kod svih ispitivanih genotipova. Najveća promena sadržaja rastvorljivih proteina bilo je smanjenje od 10,4% zabeleženo kod genotipa Ana pri dozi od 200 Gy.

Ponik. Sadržaj rastvorljivih proteina izražen u mg/g je u kontrolama iznosio: 14,8 (Venera); 14,5 (Meli); 13,5 (Ana) i 12,3 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja sadržaj rastvorljivih proteina se menjao u opsegu od: 15,0-16,0 mg/g (Venera); 14,0-15,6 mg/g (Meli); 13,1-17,3 mg/g (Ana) i 14,4-16,0 mg/g (Novosađanka), (Grafikon 27). Kod genotipova Venera i Meli došlo je do malog povećanja sadržaja rastvorljivih proteina koje je iznosilo do 10% u odnosu na kontrolu. Značajno povećanje sadržaja rastvorljivih proteina uočeno je kod genotipa Ana pri dozi od 200 Gy (28,1%) i kod genotipa Novosađanka pri dozi od 140 Gy (30,1%).

List G1. Sadržaj rastvorljivih proteina izražen u mg/g je u kontrolama iznosio: 19,5 (Venera); 21,4 (Meli); 20,4 (Ana) i 19,8 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja sadržaj rastvorljivih proteina se menjao u opsegu od: 20,1-22,3 mg/g (Venera); 19,3-22,0 mg/g (Meli); 19,4-20,5 mg/g (Ana) i 18,9-22,9 mg/g (Novosađanka), (Grafikon 28). Kod genotipova Meli i Ana došlo je do malog smanjenja sadržaja rastvorljivih proteina koje je iznosilo do 10% u odnosu na kontrolu. Kod genotipova Venera i Novosađanka utvrđeno je da dolazi do izvesnog povećanja sadržaja rastvorljivih proteina. Maksimalno povećanje sadržaja rastvorljivih proteina kod genotipa Venera utvrđeno je pri dozi od 200 Gy (14,4%), a kod genotipa Novosađanka pri dozi od 120 Gy (15,6%).

List G2. Sadržaj rastvorljivih proteina izražen u mg/g je u kontrolama iznosio: 20,9 (Venera); 20,9 (Meli); 23,0 (Ana) i 24,6 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja sadržaj rastvorljivih proteina se menjao u opsegu od: 22,2-23,9 mg/g (Venera); 22,1-24,1 mg/g (Meli); 22,4-23,9 mg/g (Ana) i 20,9-24,7 mg/g (Novosađanka), (Grafikon 29). Kod genotipova Venera i Meli došlo je do izvesnog povećanja sadržaja rastvorljivih proteina pri većim dozama zračenja ali ne preko 15% u odnosu na kontrolu. Kod genotipa Ana nije zabeležena značajna promena sadržaja rastvorljivih proteina ni kod jedne doze zračenja. Kod genotipa Novosađanka dolazilo je do sniženja sadržaja rastvorljivih proteina pri svim dozama zračenja, a najviše pri dozi od 140 Gy (15,0%).

Na grafikonu 30. prikazane su promene sadržaja rastvorljivih proteina tokom rasta i razvika odabranih genotipova ozračene i neozračene soje kroz dve generacije. Na osnovu uporedne analize sadržaja rastvorljivih proteina kod ozračenih i neozračenih genotipova soje mogu se izvući sledeći zaključci o delovanju γ -zračenja na njih:

- kod genotipa Venera utvrđeno je izvesno povećanje sadržaja rastvorljivih proteina u svim fazama razvoja ali ne preko 15% u odnosu na kontrolu;

- kod genotipa Meli takođe nije utvrđena značajna promena sadržaja rastvorljivih proteina veća od 15% ni u jednoj fazi razvoja;
- kod genotipa Ana došlo je do značajnog povećanja sadržaja rastvorljivih proteina jedino u poniku pri dozi od 200 Gy;
- kod genotipa Novosađanka došlo je do značajnog povećanja sadržaja rastvorljivih proteina jedino u poniku pri dozi od 140 Gy.

Naši rezultati ukazuju na to da γ -zračenje nije uticalo na značajnije smanjenje sadržaja rastvorljivih proteina u soji. Kod genotipova Ana i Novosađanka registrovano je povećanje sadržaja rastvorljivih proteina jedino u poniku.

Gama zračenje dovodi do različitih promena u strukturi proteina kao što su konformacione promene, oksidacija amino-kiselina, cepanje kovalentnih veza i formiranje slobodnih radikala proteina (Cheftel i sar., 1985). Hemijske promene na proteinima usled delovanja γ -zračenja su oksidativne modifikacije koje su posledica delovanja kiseoničnih radikala nastalih pri radiolize vode (Schuessler and Schilling, 1984).

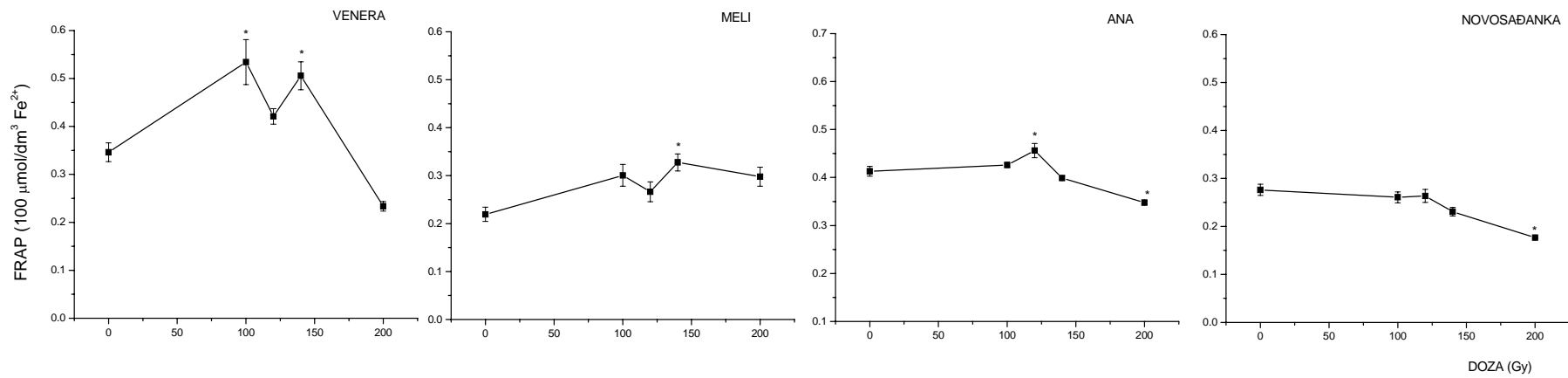
Sadržaj rastvorljivih proteina je parametar koji ukazuje na intenzitet i karakter metabolizma proteina. Povećanje sadržaja rastvorljivih proteina u ozračenju mogao bi biti i posledica i pozitivnog uticaja zračenja na neke enzime asimilacije azota. O uticaju γ -zračenja na aktivnost nitrat-reduktaze nije bilo podataka u literaturi. Quaggiotti i saradnici (2004) navode da UV-B zračenje dovodi do sniženja sadržaja azota i aktivnosti nitrat-reduktaze u korenu i listu kukuruza (*Zea mays* L.).

4.1.7. Uticaj niskih doza γ -zračenja na ukupnu antioksidantnu aktivnost određenu FRAP metodom u različitim fazama razvoja soje

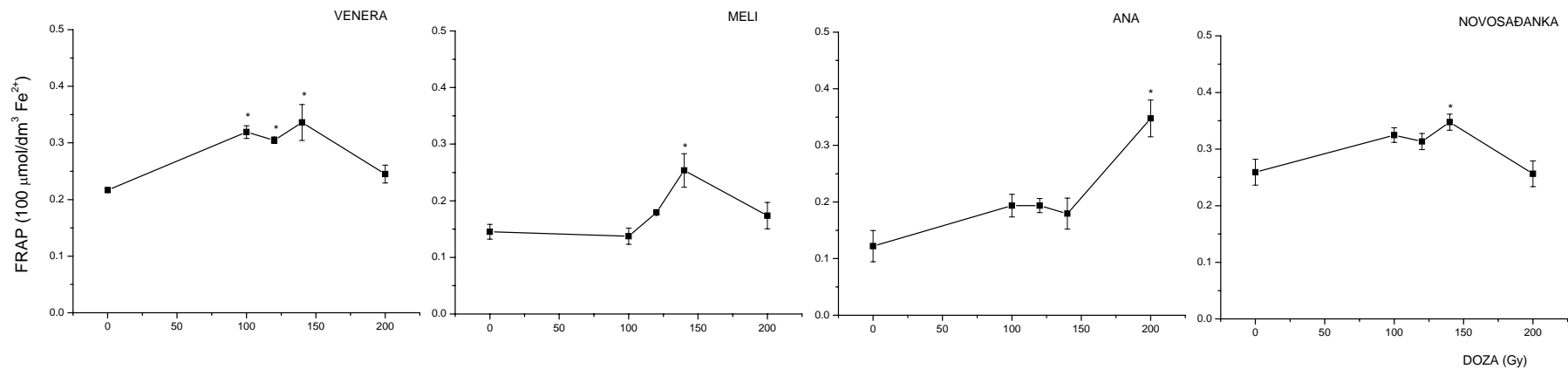
Na grafikonima 31-34. prikazani su rezultati ispitivanja uticaja niskih doza γ -zračenja na ukupnu antioksidantnu aktivnost određenu FRAP metodom u nakvašenom semenu, poniku i listu G1 i G2 odabranih genotipova soje.

Nakvašeno seme. Ukupna antioksidantna aktivnost izražena u FRAP jedinicama ($100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3 \text{Fe}^{2+}$) je u kontrolama iznosila: 0,346 (Venera); 0,219 (Meli); 0,413 (Ana) i 0,276 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja ukupna antioksidantna aktivnost menjala se u opsegu od: 0,234-0,534 FRAP jedinica (Venera); 0,266-0,328 FRAP jedinica (Meli); 0,348-0,456 FRAP jedinica (Ana) i 0,177-0,264 FRAP jedinica (Novosađanka), (Grafikon 31). Najveći porast ukupne antioksidantne aktivnosti kod genotipa Venera uočen je pri dozi od 100 Gy (54,3%), a najveće smanjenje uočeno je pri dozi od 200 Gy (32,4%). Kod genotipa Meli dolazilo je do povećanja ukupne antioksidantne aktivnosti pri svim dozama, a naročito pri dozi od 140 Gy (49,8%). Kod genotipa Ana, uočene promene ukupne antioksidantne aktivnosti bile su manje od 16% pri svim dozama zračenja. Kod genotipa Novosađanka uočeno je smanjenje ukupne antioksidantne aktivnosti pri svim dozama zračenja. Najizrazitije smanjenje ukupne antioksidantne aktivnosti uočeno je pri dozi od 200 Gy (35,9%).

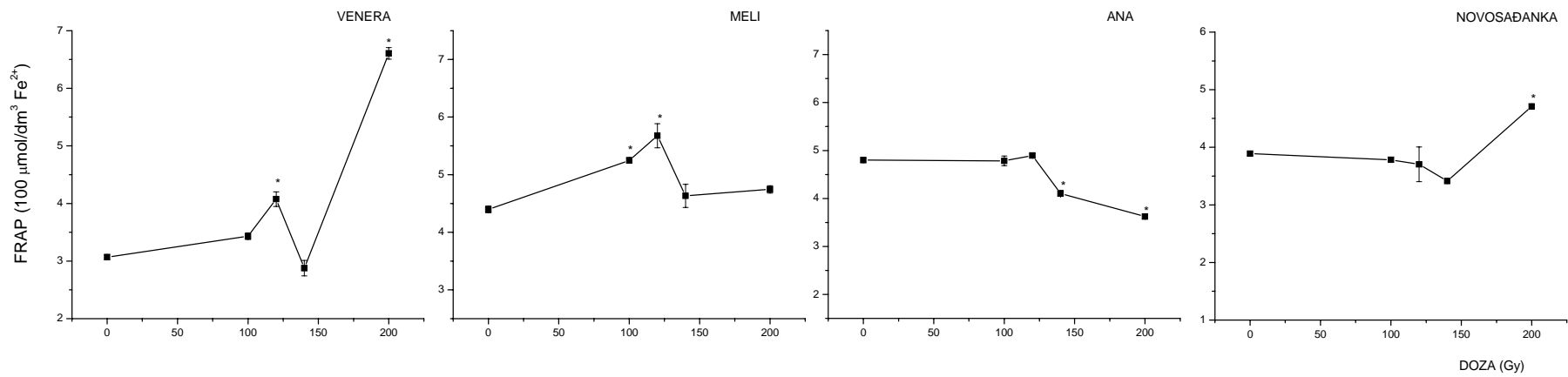
Ponik. Ukupna antioksidantna aktivnost izražena u FRAP jedinicama ($100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3 \text{Fe}^{2+}$) je u kontrolama iznosila: 0,216 (Venera); 0,145 (Meli); 0,122 (Ana) i 0,256 (Novosađanka).



Grafikon 31. Uticaj niskih doza γ -zračenja na ukupnu antioksidantnu aktivnost-FRAP u nakvašenom semenu odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$

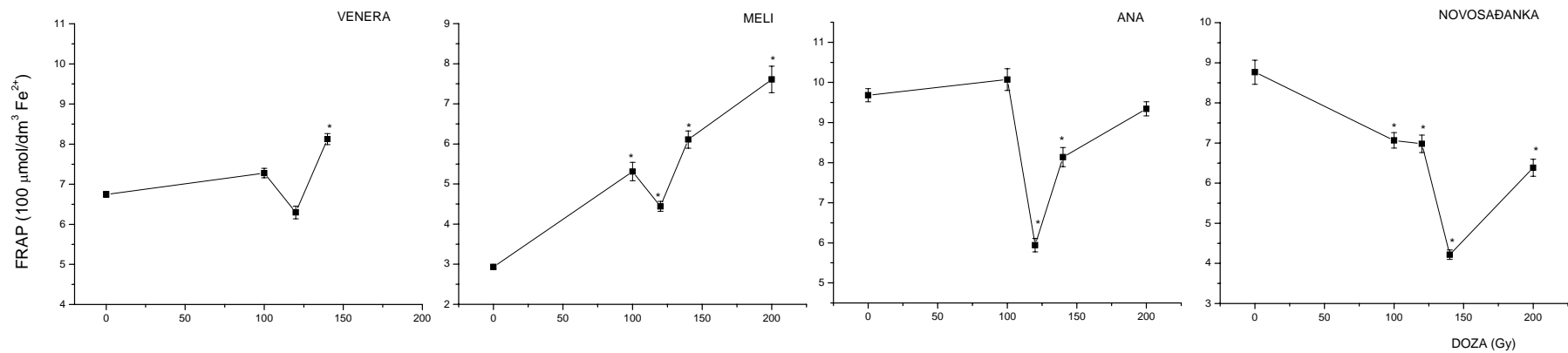


Grafikon 32. Uticaj niskih doza γ -zračenja na ukupnu antioksidantnu aktivnost-FRAP u poniku odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



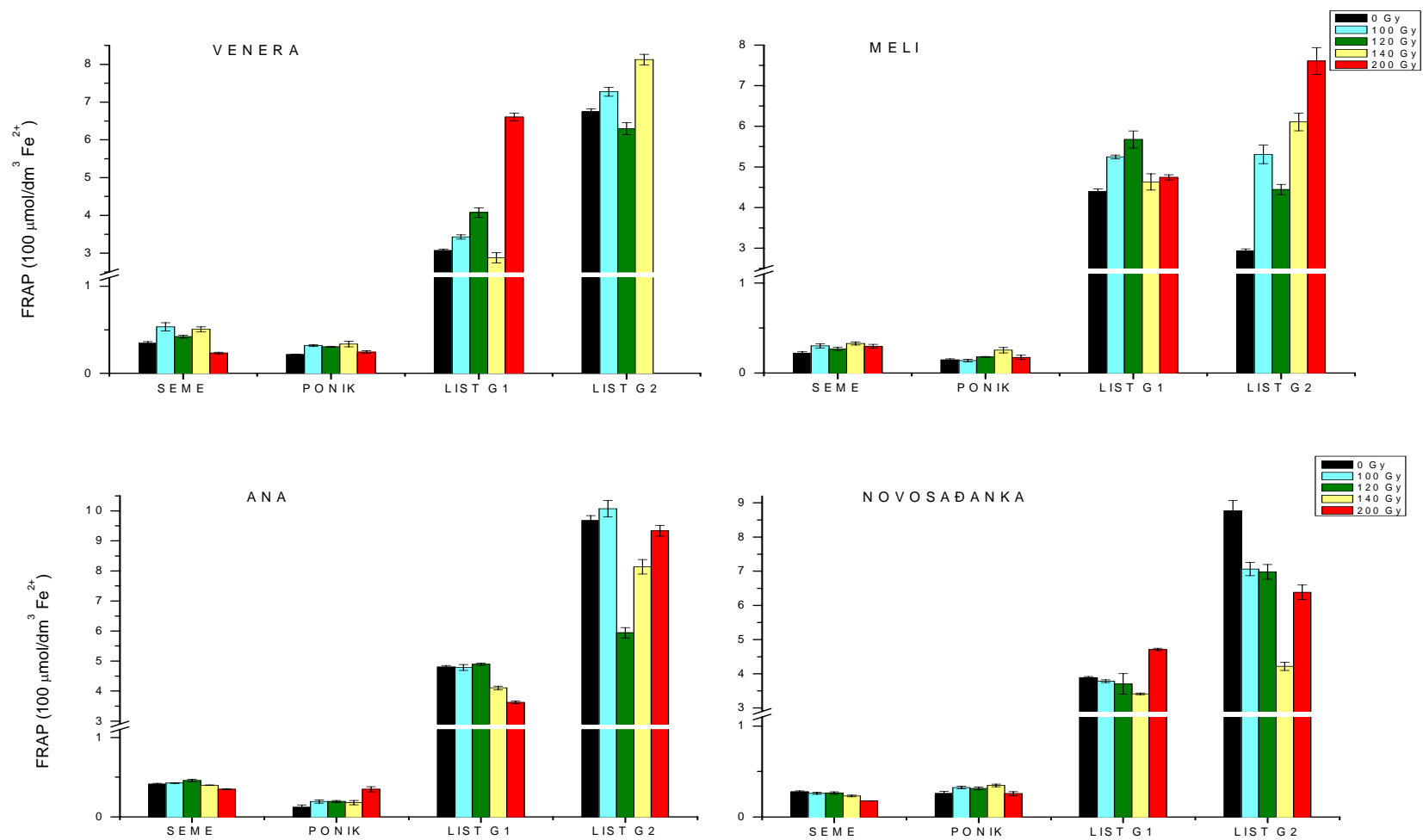
Grafikon 33. Uticaj niskih doza γ -zračenja na ukupnu antioksidantnu aktivnost-FRAP u listu G1 odabranih genotipova soje

* Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 34. Uticaj niskih doza γ -zračenja na ukupnu antioksidantnu aktivnost-FRAP u listu G2 odabranih genotipova soje

* Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 35. Promene ukupne antioksidantne aktivnosti određene FRAP metodom tokom razvića odabranih genotipova ozračene i neozračene soje kroz dve generacije

Pod uticajem različitih doza γ -zračenja ukupna antioksidantna aktivnost menjala se u opsegu od: 0,245-0,336 FRAP jedinica (Venera); 0,137-0,254 FRAP jedinica (Meli); 0,179-0,348 FRAP jedinica (Ana) i 0,256-0,348 FRAP jedinica (Novosađanka), (Grafikon 32). Kod genotipa Venera uočeno je povećanje ukupne antioksidantne aktivnosti pri svim dozama zračenja, a naročito pri dozi od 140 Gy (55,6%). Značajno povećanje ukupne antioksidantne aktivnosti kod genotipa Meli uočeno je jedino pri dozi od 140 Gy (75,2%). Kod genotipa Ana uočeno je povećanje ukupne antioksidantne aktivnosti pri svim dozama zračenja, a najveće pri dozi od 200 Gy (185%). Značajno povećanje ukupne antioksidantne aktivnosti kod genotipa Novosađanka uočeno je jedino pri dozi od 140 Gy (35,9%).

List G1. Ukupna antioksidantna aktivnost izražena u FRAP jedinicama ($100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3 \text{Fe}^{2+}$) je u kontrolama iznosila: 3,07 (Venera); 4,40 (Meli); 4,80 (Ana) i 3,89 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja ukupna antioksidantna aktivnost menjala se u opsegu od: 2,88-6,61 FRAP jedinica (Venera); 4,63-5,68 FRAP jedinica (Meli); 3,62-4,89 FRAP jedinica (Ana) i 3,41-4,71 FRAP jedinica (Novosađanka), (Grafikon 33). Kod genotipa Venera uočeno je povećanje ukupne antioksidantne aktivnosti pri svim dozama sem pri dozi od 140 Gy. Najizrazitije povećanje ukupne antioksidantne aktivnosti uočeno je pri dozi od 200 Gy (115%). Kod genotipa Meli uočeno je povećanje ukupne antioksidantne aktivnosti pri svim dozama zračenja, a naročito pri dozi od 120 Gy (29,1%). Značajne promene ukupne antioksidantne aktivnosti kod genotipa Ana utvrđene su pri većim dozama zračenja, a naročito pri dozi od 200 Gy gde je došlo do smanjenja FRAP vrednosti za 24,6%. Jedina značajna promena ukupne antioksidantne aktivnosti kod genotipa Novosađanka bilo je njeno povećanje od 21,1% utvrđeno pri dozi od 200 Gy.

List G2. Ukupna antioksidantna aktivnost izražena u FRAP jedinicama ($100 \mu\text{mol}/\text{dm}^3 \text{Fe}^{2+}$) je u kontrolama iznosila: 6,75 (Venera); 2,93 (Meli); 9,68 (Ana) i 8,76 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja ukupna antioksidantna aktivnost menjala se u opsegu od: 6,30-8,12 FRAP jedinica (Venera); 4,44-7,61 FRAP jedinica (Meli); 5,94-10,1 FRAP jedinica (Ana) i 4,22-7,06 FRAP jedinica (Novosađanka), (Grafikon 34). Jedina značajna promena ukupne antioksidantne aktivnosti kod genotipa Venera bilo je njeno povećanje od 20,3% uočeno pri dozi od 140 Gy. Kod genotipa Meli uočeno je da dolazi do povećanja ukupne antioksidantne aktivnosti sa povećanjem doze zračenja. Najveći porast ukupne antioksidantne aktivnosti od 160% utvrđen je pri dozi od 200 Gy. Kod genotipova Ana i Novosađanka registrovano je smanjenje ukupne antioksidantne aktivnosti. Najizrazitije smanjenje ukupne antioksidantne aktivnosti kod genotipa Ana utvrđeno je pri dozi od 120 Gy (38,6%), a kod genotipa Novosađanka pri dozi od 140 Gy (51,8%).

Na grafikonu 35. prikazane su promene ukupne antioksidantne aktivnosti određene FRAP metodom tokom rasta i razvića odabranih genotipova ozračene i neozračene soje kroz dve generacije. Na osnovu uporedne analize ukupne antioksidantne aktivnosti kod ozračenih i neozračenih genotipova soje mogu se izvući sledeći zaključci o delovanju γ -zračenja na njih:

- kod genotipa Venera utvrđeno je povećanje ukupne antioksidantne aktivnosti u nakvašenom semenu i poniku pri nižim dozama i u listu G1 i G2 pri većim

- dozama zračenja. Najizrazitije povećanje ukupne antioksidantne aktivnosti uočeno je u listu G1 pri dozi od 200 Gy (115%);
- kod genotipa Meli ukupna antioksidantna aktivnost povećavala se u svim fazama razvoja, a naročito u listu G2 gde je pri dozi od 200 Gy povećana za 160%;
 - kod genotipa Ana ukupna antioksidantna aktivnost povećavala se u značajnoj meri jedino u poniku gde je pri dozi od 200 Gy povećana za 185%. U ostalim fazama razvoja ukupna antioksidantna aktivnost je opadala;
 - kod genotipa Novosađanka uočeno je povećanje ukupne antioksidantne aktivnosti u poniku i listu G1 (200 Gy) dok je u nakvašenom semenu i listu G2 utvrđeno smanjenje ukupne antioksidantne aktivnosti.

Može se zaključiti da niske doze γ -zračenja dovode do indukcije ukupne antioksidantne aktivnosti kod genotipova Venera i Meli u svim fazama razvoja, kod genotipa Ana u poniku i kod genotipa Novosađanka u poniku i listu G1.

Vrednosti FRAP ukazuju na „ukupnu redukcionu moć“ ekstrakta (Benzie i sar., 1996). Kod nekih biljaka, sadržaj vitamina C doprinosi preko 50% FRAP vrednosti (Guo i sar., 2003). Pored vitamina C, značajan doprinos FRAP vrednost daju flavonoidi, fenolne kiseline i ostala polifenolna jedinjenja (Guo i sar., 1997). Visoke vrednosti FRAP-a stoga ukazuju na veliki sadržaj svih pomenutih jedinjenja koja pripadaju grupi sekundarnih biomolekula.

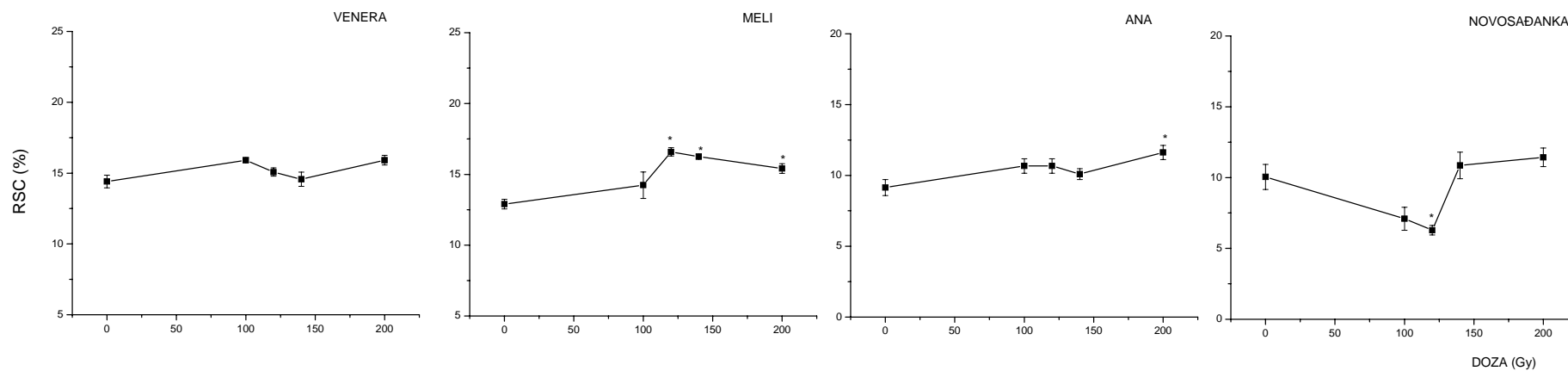
Smanjene FRAP vrednosti u listu G2 kod genotipova Ana i Novosađanka mogu biti posledica sniženja sadržaja vitamina C i fenolnih jedinjenja, ali i akumulacije antioksidantnih jedinjenja koja imaju sposobnost helatiranja jona Fe^{2+} poput tanina i fitinske kiseline što negativno utiče na vrednost FRAP-a.

Gorlanov i Kokorev su još 1973. godine ispitivali antioksidantnu aktivnost ponika pšenice i kukuruza čije je seme bilo ozračeno γ -zračenjem. Utvrđeno je da antioksidantna aktivnost može da raste ili opada kod ozračenih biljaka u zavisnosti od doze zračenja. Fan i saradnici (2004) su utvrdili γ -zračenje utiče na povećanje ukupne antioksidantne aktivnosti i sadržaja vitamina C u poniku lucerke naklijavanog iz semena ozračenog dozama do 4 kGy. Ozračivanje svežeg povrća i voćnih sokova takođe je dovelo do porasta sadržaja ukupnih fenola i ukupne antioksidantne aktivnosti (Fan, 2005; Fan i Thayer, 2002).

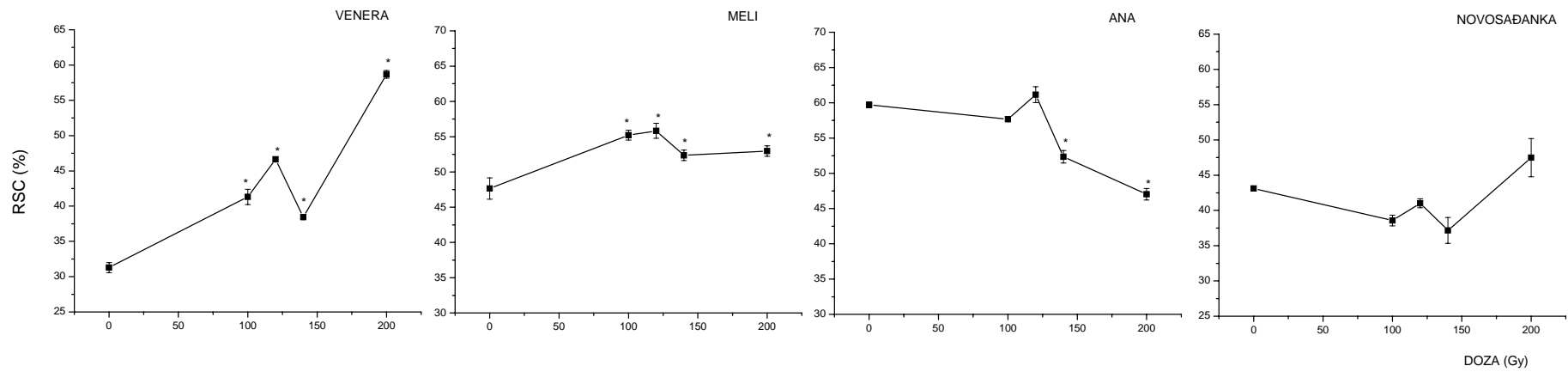
4.1.8. Uticaj niskih doza γ -zračenja na DPPH skevindžer aktivnost u različitim fazama razvoja soje

Na grafikonima 36-38. prikazani su rezultati ispitivanja uticaja niskih doza γ -zračenja na DPPH skevindžer aktivnost u poniku i listu G1 i G2 odabranih genotipova soje. U fosfatno-puferskim (pH=7) ekstraktima nakvašenog semena G1 generacije DPPH skevindžer aktivnost je bila ispod granice detekcije.

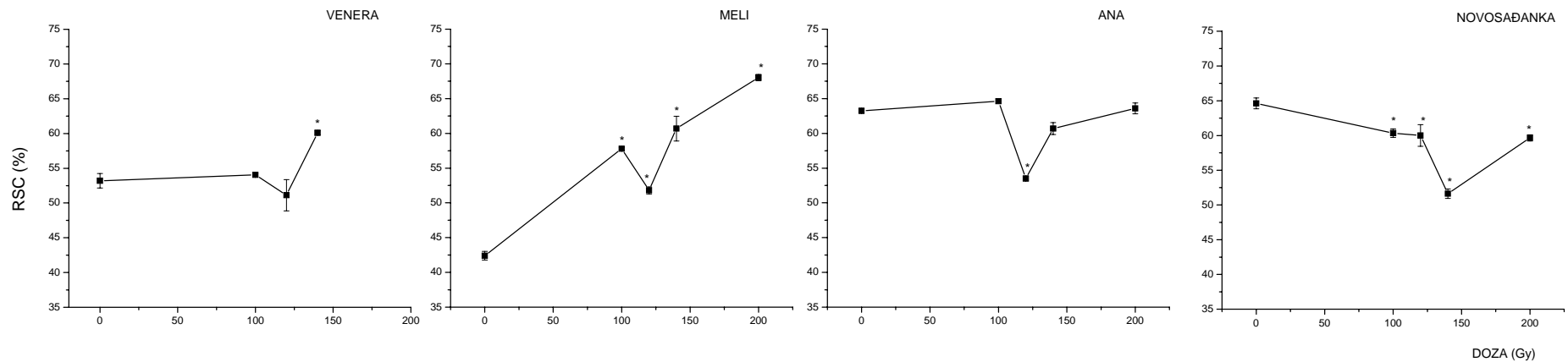
Ponik. DPPH skevindžer aktivnost izražena u procentima je u kontrolama iznosila: 14,4 (Venera); 12,9 (Meli); 9,14 (Ana) i 10,0 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja DPPH skevindžer aktivnost menjala se u opsegu od: 14,6-15,9% (Venera); 14,2-16,6% (Meli); 10,1-11,6% (Ana) i 6,3-11,4% (Novosađanka), (Grafikon 36). Kod genotipa Venera nije utvrđena značajna promena DPPH skevindžer aktivnosti ni kod jedne doze zračenja.



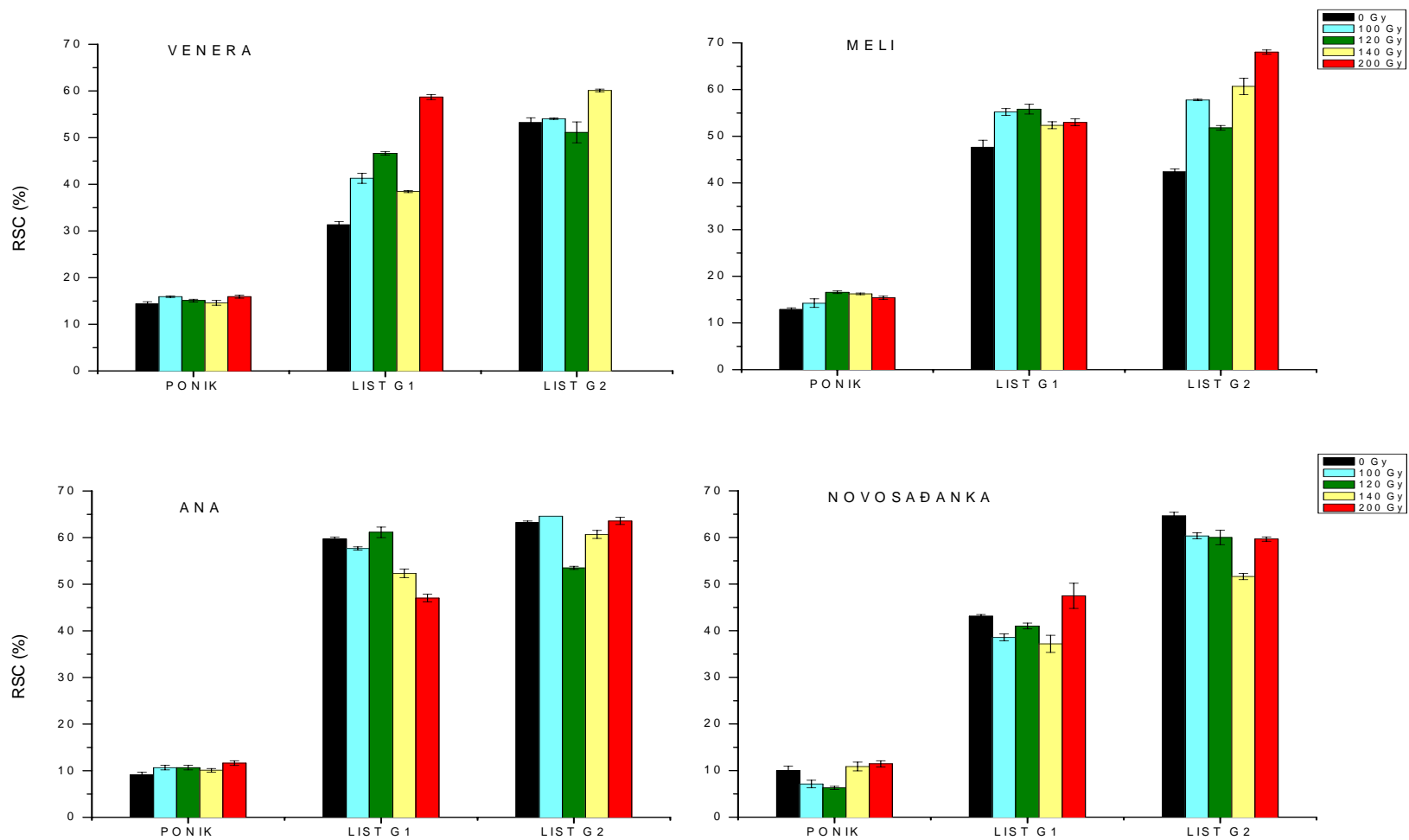
Grafikon 36. Uticaj niskih doza γ -zračenja na DPPH-skevindžer aktivnost u poniku odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 37. Uticaj niskih doza γ -zračenja na DPPH-skevindžer aktivnost u listu G1 odabranih genotipova soje
* Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 38. Uticaj niskih doza γ -zračenja na DPPH-skevindžer aktivnost u listu G2 odabranih genotipova soje
* Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 39. Promene DPPH skevindžer aktivnosti tokom razvića odabranih genotipova ozračene i neozračene soje kroz dve generacije

Kod genotipova Meli i Ana utvrđeno je povećanje DPPH skevindžer aktivnosti kod svih doza, a naročito pri dozi od 120 Gy kod genotipa Meli (28,5% u odnosu na vrednost kontrole) i pri dozi od 200 Gy kod genotipa Ana (27,1%). Kod genotipa Novosađanka jedina značajna promena DPPH skevindžer aktivnosti utvrđena je pri dozi od 120 Gy kada je snižena za 37,2%.

List G1. DPPH skevindžer aktivnost izražena u procentima je u kontrolama iznosila: 31,3 (Venera); 47,6 (Meli); 59,7 (Ana) i 43,1 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja DPPH skevindžer aktivnost menjala se u opsegu od: 38,4-58,7% (Venera); 52,4-55,8% (Meli); 47,0-61,1% (Ana) i 37,2-47,5% (Novosađanka), (Grafikon 37). Kod genotipa Venera utvrđeno je povećanje DPPH skevindžer aktivnosti pri svim dozama zračenja, a najveće pri dozi od 200 Gy (87,5% u odnosu na vrednost kontrole). Kod genotipa Meli uočeno je izvesno povećanje DPPH skevindžer aktivnosti pri svim dozama zračenja, a najveće pri dozi od 120 Gy (17,2%). Kod genotipa Ana utvrđeno je, pri većim dozama zračenja, smanjenje DPPH skevindžer aktivnosti koje nije prelazilo 25% u odnosu na kontrolu. Kod genotipa Novosađanka nije utvrđena signifikantna promena DPPH skevindžer aktivnosti ni pri jednoj dozi zračenja.

List G2. DPPH skevindžer aktivnost izražena u procentima je u kontrolama iznosila: 53,2 (Venera); 42,4 (Meli); 63,2 (Ana) i 64,6 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja DPPH skevindžer aktivnost menjala se u opsegu od: 51,1-60,1% (Venera); 51,8-68,0% (Meli); 53,5-64,6% (Ana) i 51,6-60,3% (Novosađanka), (Grafikon 38). Kod genotipova Venera, Ana i Novosađanka utvrđene promene DPPH skevindžer aktivnosti u odnosu na kontrolu bile su manje od 25% pri svim dozama zračenja. Kod genotipa Meli uočeno je da sa povećanjem doze zračenja dolazi i do porasta DPPH skevindžer aktivnosti, a najveći porast je uočen pri dozi od 200 Gy (60,04%).

Na grafikonu 39. prikazane su promene DPPH skevindžer aktivnosti tokom rasta i razvicia odabranih genotipova ozračene i neozračene soje kroz dve generacije. Na osnovu uporedne analize DPPH skevindžer aktivnosti kod ozračenih i neozračenih genotipova soje mogu se izvući sledeći zaključci o delovanju γ -zračenja na njih:

- kod genotipa Venera došlo je do povećanja DPPH skevindžer aktivnosti u svim fazama razvoja, a naročito u listu G1;
- kod genotipa Meli DPPH skevindžer aktivnost povećavala se u svim fazama razvoja, a najviše u listu G2;
- kod genotipa Ana uočeno je povećanje DPPH skevindžer aktivnosti jedino u poniku dok je u listu G1 i G2 opadala;
- kod genotipa Novosađanka uočeno je smanjenje DPPH skevindžer aktivnosti u svima fazama razvoja pri dozama od 100-140 Gy.

Može se zaključiti da niske doze γ -zračenja dovode do indukcije sinteze antioksidanata, skevindžera DPPH radikala, kod genotipa Meli u svim fazama razvoja, kod genotipa Venera u listu G1 i kod genotipa Ana u poniku. U nabrojanim slučajevima gde je zabeleženo povećanje DPPH skevindžer aktivnosti uočeno je i povećanje ukupne antioksidantne aktivnosti FRAP metodom što ukazuje na pozitivnu korelaciju između ova dva parametra. Wong i saradnici (2006) su ispitujući vodene

ekstrakte lekovitog bilja takođe utvrdili postojanje pozitivne korelacije između DPPH skevindžer aktivnosti i ukupne antioksidantne aktivnosti određene FRAP metodom.

Wada i saradnici (1998) su ispitivali uticaj niskih doza γ -zračenja na DPPH skevindžer aktivnost ekstraktata ozračenih ponika dveju vrsta roda *Nicotiana* (*N. debneyi* i *N. tabacum*) i utvrdili da su doze do 200 Gy izazvale izvesno povećanje DPPH skevindžer aktivnosti kod *N. tabacum* i smanjenje kod *N. debneyi*. Lee i saradnici (2005) su utvrdili da izoflavoni soje kao i njihovi glikozidi pokazuju DPPH antiradikalnu aktivnost. Ozračivanje semena soje dozama do 5 kGy izazvalo je povećanje DPPH skevindžer aktivnosti kao i sadržaja izoflavonskih aglikona (Variyar i sar., 2004) u suvom semenu soje. Kod nekih biljaka je utvrđeno da postoji pozitivna korelacija između tolerantnosti na delovanje UV-B zračenje i akumulacije flavonoida (Santos i sar., 2004; Bieza i Lois, 2001).

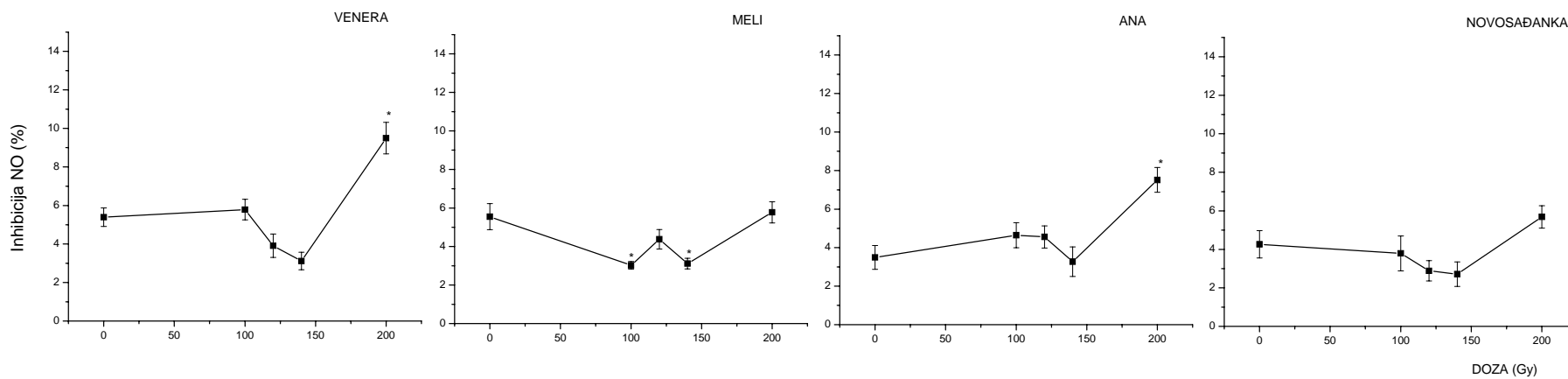
Tieppo i saradnici (2006) su utvrdili da ekstrakti *Croton cajucara* Benth. sa visokom DPPH skevindžer aktivnošću dovode do redukcije oksidativnog stresa izazvanog delovanjem parakvata. Poznato je da mnogi antioksidanti, a naročito oni iz grupe polifenolnih jedinjenja (fenolne kiseline, flavonoidi, tanini itd.) brzo neutrališu relativno stabilne DPPH radikale (Rice-Evans i sar., 1996). Smatra se da je antiradikalna aktivnost polifenola zasnovana na njihovoj sposobnosti da prenose atome vodonika na DPPH radikle kada sami prelaze u stabilne aroksi-radikale (Williams-Brand, 1995).

4.1.9. Uticaj niskih doza γ -zračenja na inhibiciju azot-monoksida u različitim fazama razvoja soje

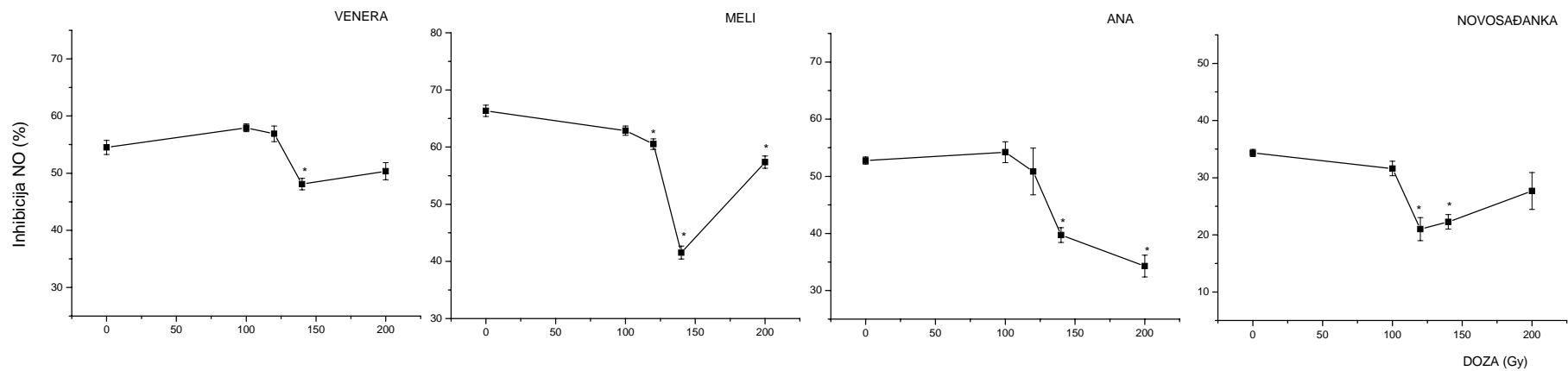
Na grafikonima 40-42. prikazani su rezultati ispitivanja uticaja niskih doza γ -zračenja na inhibiciju azot-monoksida u poniku i listu G1 i G2 odabranih genotipova soje. U fosfatno-puferskim (pH=7) ekstraktima nakvašenog semena G1 generacije inhibicija NO je bila ispod granice detekcije.

Ponik. Inhibicija NO izražena u procentima je u kontrolama iznosila: 5,39 (Venera); 5,55 (Meli); 3,49 (Ana) i 4,26 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja inhibicija NO menjala se u opsegu od: 3,12-9,50% (Venera); 3,02-5,77% (Meli); 3,27-7,52% (Ana) i 2,71-5,68% (Novosađanka), (Grafikon 40). Kod genotipova Venera, Ana i Novosađanka utvrđen je značajan porast inhibicije NO jedino kod najveće doze zračenja od 200 Gy kada se inhibicija NO povećala za 76,2% (Venera), 115% (Ana) i 33,3% (Novosađanka) u odnosu na vrednost kontrole. Kod ostalih doza zračenja inhibicija NO se smanjivala ili se nije menjala u značajnoj meri. Značajne promene inhibicije NO kod genotipa Meli utvrđene su pri dozama od 100 Gy i 140 Gy (45,6%).

List G1. Inhibicija NO izražena u procentima je u kontrolama iznosila: 54,5 (Venera); 66,3 (Meli); 52,7 (Ana) i 34,3 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja inhibicija NO menjala se u opsegu od: 48,1-57,9% (Venera); 41,5-62,9% (Meli); 34,3-54,2% (Ana) i 21,0-31,6% (Novosađanka), (Grafikon 41). Kod genotipa Venera jedina statistički značajna promena inhibicije NO uočena je pri dozi od 140 Gy kada je utvrđeno njeno smanjenje od 11,7% u odnosu na vrednost kontrole. Kod genotipova Meli, Ana i Novosađanka utvrđeno je smanjenje inhibicije NO pri dozama γ -zračenja od 120, 140 i 200 Gy.

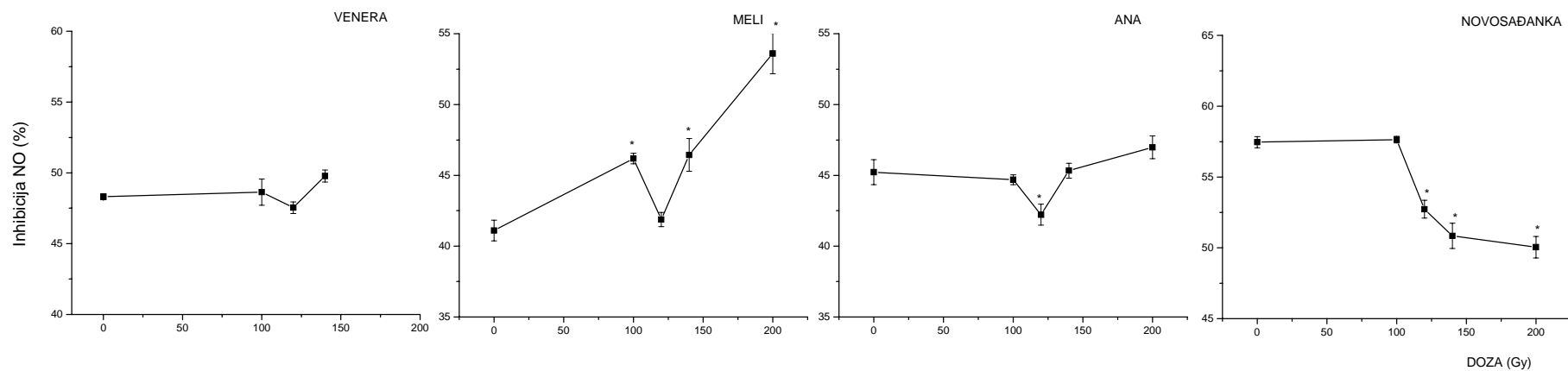


Grafikon 40. Uticaj niskih doza γ -zračenja na inhibiciju NO u poniku odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



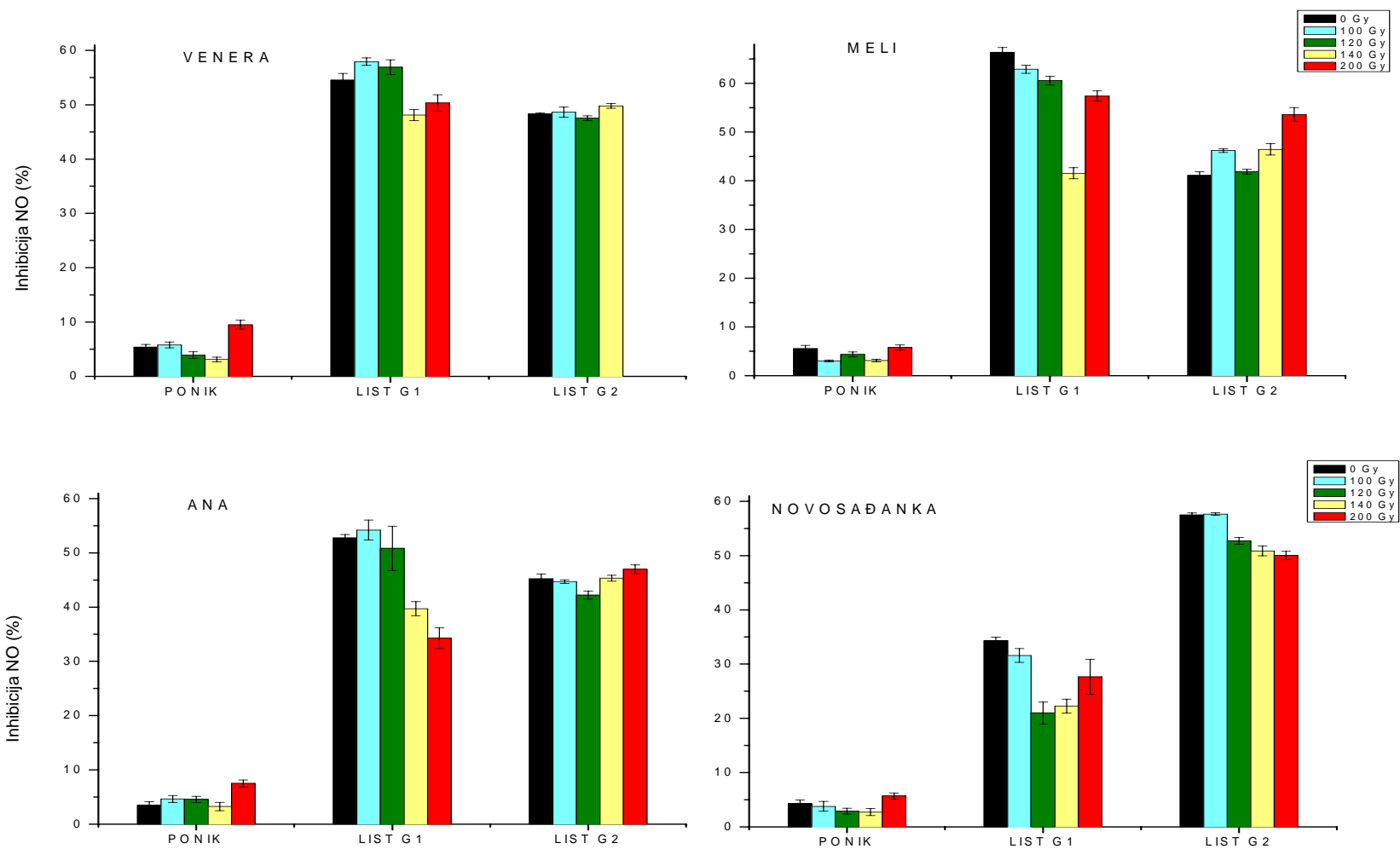
Grafikon 41. Uticaj niskih doza γ -zračenja na inhibiciju NO u listu G1 odabranih genotipova soje

* Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 42. Uticaj niskih doza γ -zračenja na inhibiciju NO u listu G2 odabranih genotipova soje

* Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 43. Promene inhibicije NO tokom razvika odabranih genotipova ozračene i neozračene soje kroz dve generacije

Najizrazitije smanjenje inhibicije NO utvrđeno je kod genotipa Meli pri dozi od 140 Gy (37,4%), kod genotipa Ana pri dozi od 200 Gy (34,9%) i kod genotipa Novosađanka pri dozi od 120 Gy (38,8%).

List G2. Inhibicija NO izražena u procentima je u kontrolama iznosila: 48,3 (Venera); 41,1 (Meli); 45,2 (Ana) i 57,5 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja inhibicija NO menjala se u opsegu od: 47,5-48,6% (Venera); 41,9-53,6% (Meli); 42,2-47,0% (Ana) i 50,0-57,6% (Novosađanka), (Grafikon 42). Kod genotipova Venera i Ana utvrđene promene inhibicije NO nisu bile veće od 7% u odnosu na kontrolu ni pri jednoj dozi zračenja. Kod genotipa Meli utvrđeno je povećanje inhibicije NO kod svih doza zračenja, a naročito pri dozi od 200 Gy (30,4%). Kod genotipa Novosađanka dolazilo je do smanjenja inhibicije NO pri većim dozama zračenja. Najizrazitije smanjenje inhibicije NO utvrđeno je pri dozi od 200 Gy (13,0%).

Na grafikonu 43. prikazane su promene inhibicije NO tokom rasta i razvića odabranih genotipova ozračene i neozračene soje kroz dve generacije. Na osnovu uporedne analize inhibicije NO kod ozračenih i neozračenih genotipova soje mogu se izvući sledeći zaključci o delovanju γ -zračenja na njih:

- kod genotipa Venera je jedino u poniku pri dozi od 200 Gy došlo do značajne promene inhibicije NO kada je utvrđeno njeno povećanje;
- u poniku i listu G1 kod genotipa Meli utvrđeno je smanjenje inhibicije NO, a naročito pri dozi od 140 Gy. U listu G2 uočeno je povećanje inhibicije NO sa povećanjem doze zračenja;
- jedino u poniku i listu G1 genotipa Ana uočene su značajne promene inhibicije NO. U poniku je uočeno povećanje inhibicije NO, a naročito pri dozi od 200 Gy (115%) dok je u listu G1 utvrđeno smanjenje inhibicije NO;
- u poniku genotipa Novosađanka uočeno je povećanje inhibicije NO, dok je u listu G1 i G2 utvrđeno smanjenje inhibicije NO.

Iz izloženog se može zaključiti da je do značajnog povećanja inhibicije NO dolazilo u poniku genotipova Venera, Ana i Novosađanka kao i u listu G2 genotipa Ana, naročito pri dozi od 200 Gy. U ostalim slučajevima inhibicija NO se smanjivala ili se nije menjala u značajnoj meri.

Toksičnost NO se ispoljava kada je prisutan u velikim koncentracijama u uslovima snažnog oksidativnog stresa usled nastajanja izuzetno toksičnog peroksinitrita (ONOO^-). S' druge strane, NO može da reaguje sa reaktivnim intermedijerima lipidne peroksidacije i da tako zaustavi propagaciju ove lančane reakcije kada deluje kao antioksidant (Hayashi i sar., 1995). NO je takođe i signalni molekul koji aktivacijom ili represijom različitih signalnih puteva utiče na ekspresiju genetske informacije i regulaciju metabolizma u uslovima stresa (Durner i Klessig, 1999). Azot-monoksid može da posluži kao koristan marker za različite tipove stresa kod biljaka (Del Rio i sar., 2004).

Sposobnost inhibicije nastajanja NO je važna karakteristika antioksidantnog sistema biljke u uslovima oksidativnog stresa, s' obzirom na to da inhibicija NO prevenira nastajanje ONOO^- koji je jak oksidans (Huie i Padmaja, 1993), izvor hidroksil-radikala i nitrujući agens. U literaturi se navode različite grupe neenzimskih antioksidanata koji inhibiraju nastajanje NO u *in vivo* uslovima: polinezasićene masne kiseline, poliacetileni, kumarini, flavonoidi, neki seskviterpeni, diterpeni, triterpeni

itd. (Matsuda i sar., 2003). Zbog navedenog, smanjenje količine NO ukazuje na povećanje sadržaja pomenutih antioksidanata. Naši rezultati ukazuju da u uslovima jačeg radijacionog i oksidativnog stresa (pri dozi od 200 Gy) dolazi do povećanja inhibicije NO u odnosu na niže doze zračenja. Na taj način se prevenira sinergistički efekat NO i kiseoničnih radikala koji dovodi do povećanja intenziteta oksidativnog stresa.

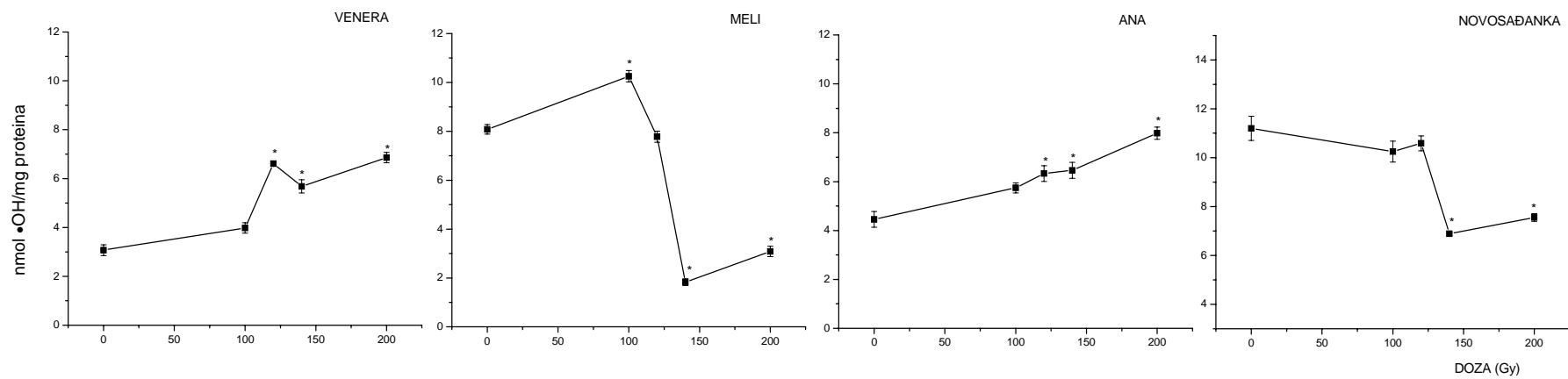
4.1.10. Uticaj niskih doza γ -zračenja na količinu hidroksil-radikala u različitim fazama razvoja soje

Na grafikonima 44-46. prikazani su rezultati ispitivanja uticaja niskih doza γ -zračenja na količinu hidroksil-radikala u poniku i listu G1 i G2 odabranih genotipova soje. U fosfatno-puferskim (pH=7) ekstraktima nakvašenog semena G1 generacije količina HO \cdot radikala je bila ispod granice detekcije.

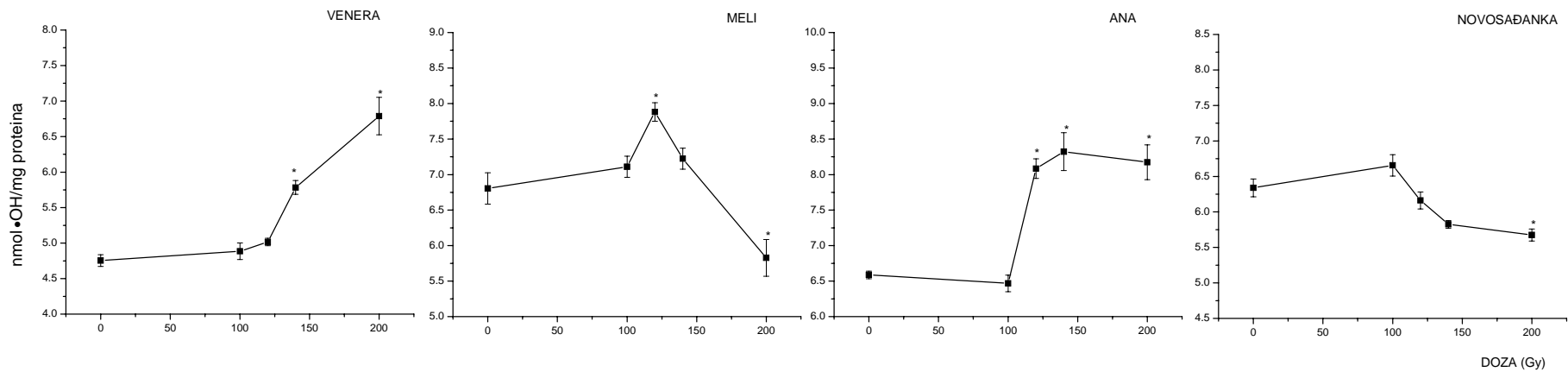
Ponik. Količina HO \cdot izražena u nmol/mg proteina je u kontrolama iznosila: 3,07 (Venera); 8,08 (Meli); 4,46 (Ana) i 11,0 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja količina HO \cdot se menjala u opsegu od: 3,98-6,86 nmol/mg proteina (Venera); 1,83-10,2 nmol/mg proteina (Meli); 5,75-7,98 nmol/mg proteina (Ana) i 6,89-10,6 nmol/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 44). Kod genotipova Venera i Ana došlo je do povećanja količine HO \cdot pri svim dozama zračenja. Najveći porast količine HO \cdot kod oba genotipa uočen je pri dozi od 200 Gy i iznosio je 123% (Venera) i 78,9% (Ana). Kod genotipa Meli količina HO \cdot povećana je jedino pri dozi od 100 Gy (26,2%), dok je najizrazitije smanjenje količine HO \cdot utvrđeno pri dozi od 140 Gy (74,4%). Kod genotipa Novosađanka uočeno je smanjenje količine HO \cdot pri svim dozama zračenja, a najveće pri dozi od 140 Gy (38,5%).

List G1. Količina HO \cdot izražena u nmol/mg proteina je u kontrolama iznosila: 4,75 (Venera); 6,80 (Meli); 6,59 (Ana) i 6,34 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja količina HO \cdot se menjala u opsegu od: 4,88-6,79 nmol/mg proteina (Venera); 5,83-7,88 nmol/mg proteina (Meli); 6,47-8,32 nmol/mg proteina (Ana) i 5,67-6,65 nmol/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 45). Kod genotipa Venera utvrđeno je povećanje količine HO \cdot sa povećanjem doze zračenja, tako da je najveći porast utvrđen pri dozi od 200 Gy (42,9%). Najveći porast količine HO \cdot kod genotipa Meli utvrđen je pri dozi od 120 Gy (16,0%), a najveće smanjenje pri dozi od 200 Gy (14,3%). Kod genotipa Ana utvrđeno je povećanje količine HO \cdot pri većim dozama zračenja, a najveće pri dozi od 140 Gy (26,2%). Kod genotipa Novosađanka jedina statistički značajna promena količine HO \cdot utvrđena je pri dozi od 200 Gy (10,6%).

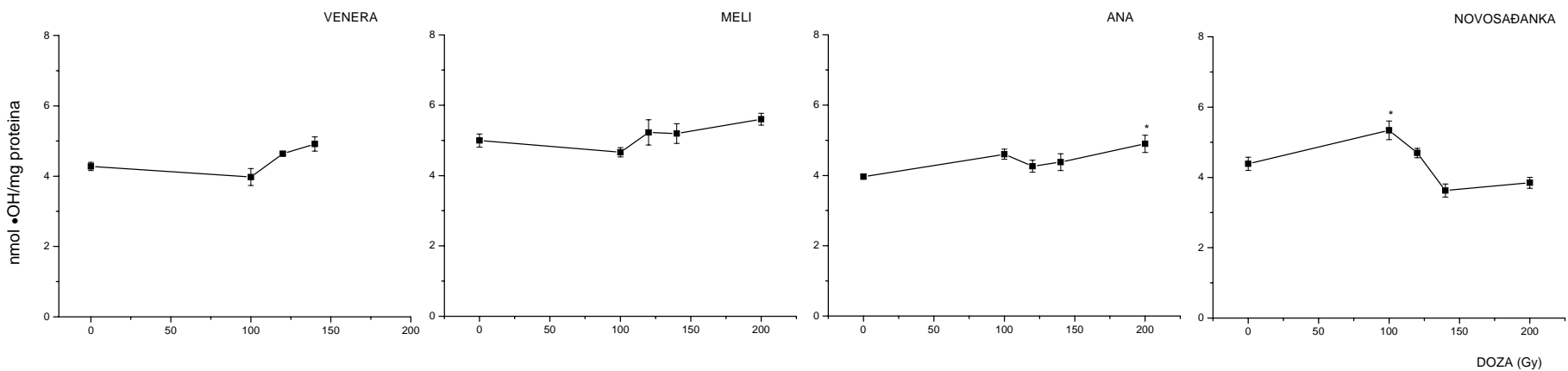
List G2. Količina HO \cdot izražena u nmol/mg proteina je u kontrolama iznosila: 4,28 (Venera); 5,00 (Meli); 3,96 (Ana) i 4,39 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja količina HO \cdot se menjala u opsegu od: 3,97-4,92 nmol/mg proteina (Venera); 4,66-5,60 nmol/mg proteina (Meli); 4,26-4,90 nmol/mg proteina (Ana) i 3,63-5,34 nmol/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 46). Kod genotipova Venera, Meli i Ana dolazilo je do povećanja količine HO \cdot pri većim dozama zračenja. Najveći porast količine HO \cdot kod genotipa Venera zabeležen je pri dozi od 140 Gy (15,0%), a pri dozi od 200 Gy kod genotipova Meli (12,0%) i Ana (23,7%). Najveći porast količine HO \cdot kod genotipa Novosađanka utvrđen je pri dozi od 100 Gy (21,6%), a najizrazitije smanjenje pri dozi od 140 Gy (17,3%).



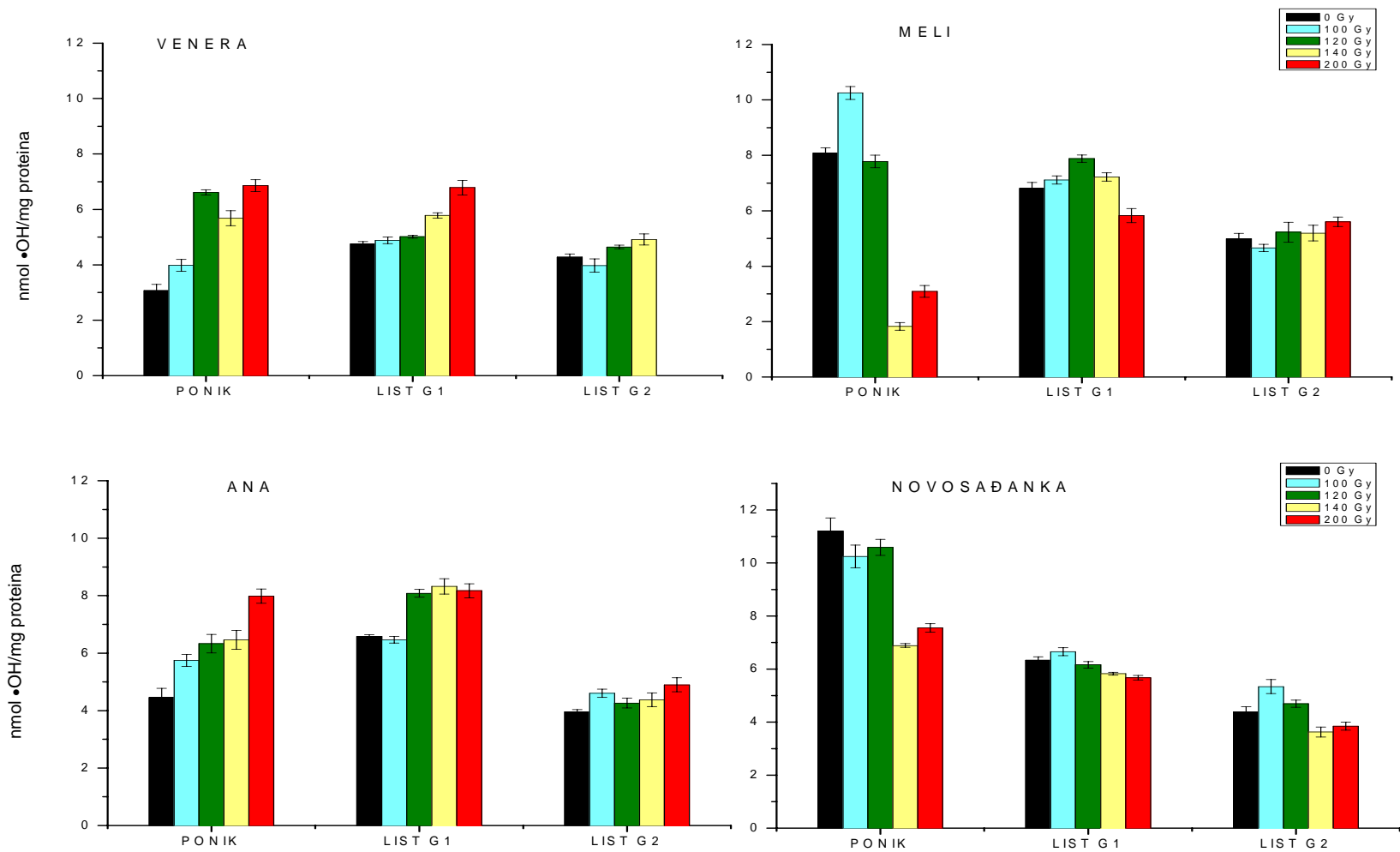
Grafikon 44. Uticaj niskih doza γ -zračenja na količinu hidroksil-radikala u poniku odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 45. Uticaj niskih doza γ -zračenja na količinu hidroksil-radikala u listu G1 odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 46. Uticaj niskih doza γ -zračenja na količinu hidroksil-radikala u listu G2 odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 47. Promene u količini hidroksil-radikala tokom razvića odabranih genotipova ozračene i neozračene soje kroz dve generacije

Na grafikonu 47. prikazane su promene količine HO[•] tokom rasta i razvića odabranih genotipova ozračene i neozračene soje kroz dve generacije. Na osnovu uporedne analize količine HO[•] kod ozračenih i neozračenih genotipova soje mogu se izvući sledeći zaključci o delovanju γ -zračenja na njih:

- kod genotipa Venera dolazilo je do porasta količine HO[•] u svim fazama razvoja, a naročito u poniku pri dozi od 200 Gy (123%);
- u poniku i listu G1 kod genotipa Meli utvrđeno je smanjenje količine HO[•] pri većim dozama zračenja. U listu G2 količina HO[•] se u maloj meri povećala jedino pri dozi od 200 Gy;
- kod genotipa Ana količina HO[•] se povećavala sa porastom doze zračenja u svim fazama razvoja, a naročito u poniku;
- kod genotipa Novosađanka količina HO[•] se uglavnom smanjivala, a naročito pri većim dozama zračenja.

Iz izloženog se može konstatovati da je količina HO[•] povećana u svim fazama razvoja ozračenih genotipova Venera i Ana, a naročito u poniku, dok se kod genotipova Meli i Novosađanka količina HO[•] smanjivala ili se nije menjala u značajnoj meri. Očigledan je presudan uticaj genotipa na količinu HO[•] u ozračenoj soji.

Wada i saradnici (1998) su utvrdili da γ -zračenje dovodi do povećanja količine HO[•] u ozračenim biljkama i da ona raste sa povećanjem doze γ -zračenja. Slično je utvrđeno i u našem radu kod genotipova Venera i Ana. Smanjenje količine HO[•], utvrđeno kod genotipova Meli i Novosađanka, može biti posledica akumulacije antioksidantnih jedinjenja koja negativno utiču na Fentonovu reakciju svojom skevindžer aktivnošću ili helatiranjem jona Fe²⁺ (tanini, fitinska kiselina i donekle izoflavoni).

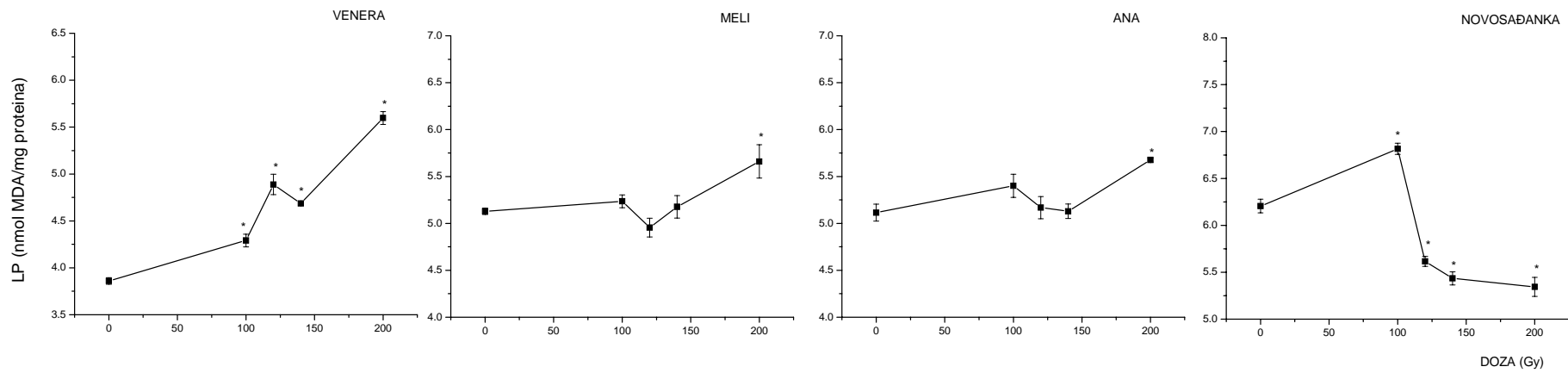
Hidroksil-radikal u listu nastaje redukcijom superoksid-radikala, iz vodonik-peroksida (Navari Izzo i sar., 1999) kao i pod dejstvom jonizujućeg zračenja (Elstner, 1994). Hidroksil-radikal predstavlja osnovni proizvod reakcije radiolize vode, a pored njega nastaju i superoksid-radikal i perhidroksi-radikal, (Bielski, 1985). Kod genotipova Venera i Ana kod kojih je utvrđena povećana količina HO[•] u svim fazama razvoja verovatno da postoji stalan izvor kiseoničnih radikala usled oštećenja izazvanih ozračivanjem semena, što prouzrokuje stanje hroničnog oksidativnog stresa

Hidroksil-radikal napada i oštećuje sve biomolekule živih ćelija, npr. hidroksiluje purinske i pirimidinske baze DNK usled čega nastaju mutacije (Halliwell, 1984), a svojom velikom reaktivnošću, HO[•] zajedno sa singlet-kiseonikom najviše doprinosi oštećenju membrana hloroplasta usled procesa lipidne peroksidacije.

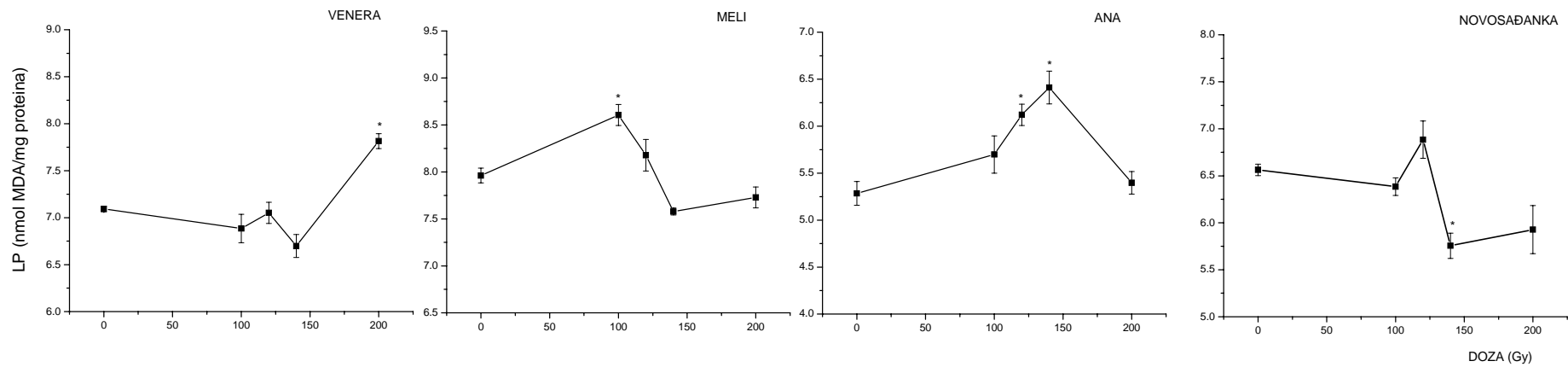
4.1.11. Uticaj niskih doza γ -zračenja na intenzitet lipidne peroksidacije u različitim fazama razvoja soje

Na grafikonima 48-51. prikazani su rezultati ispitivanja uticaja niskih doza γ -zračenja na količinu malonildialdehida u poniku i listu G1 i G2 odabranih genotipova soje.

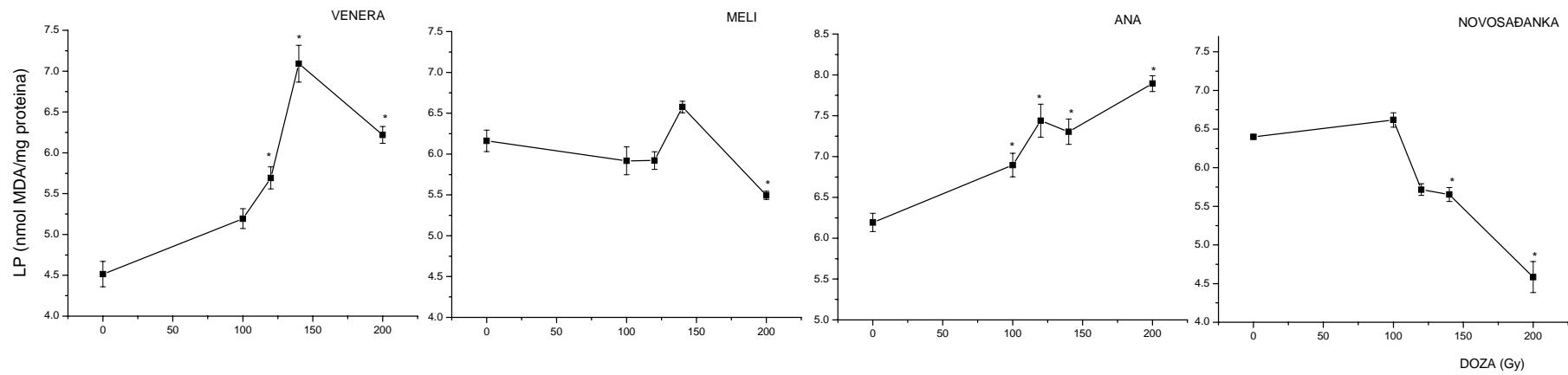
Nakvašeno seme. Količina MDA izražena u nmol/mg proteina je u kontrolama iznosila: 3,86 (Venera); 5,13 (Meli); 5,11 (Ana) i 6,21 (Novosađanka).



Grafikon 48. Uticaj niskih doza γ -zračenja na intenzitet LP u nakvašenom semenu odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$

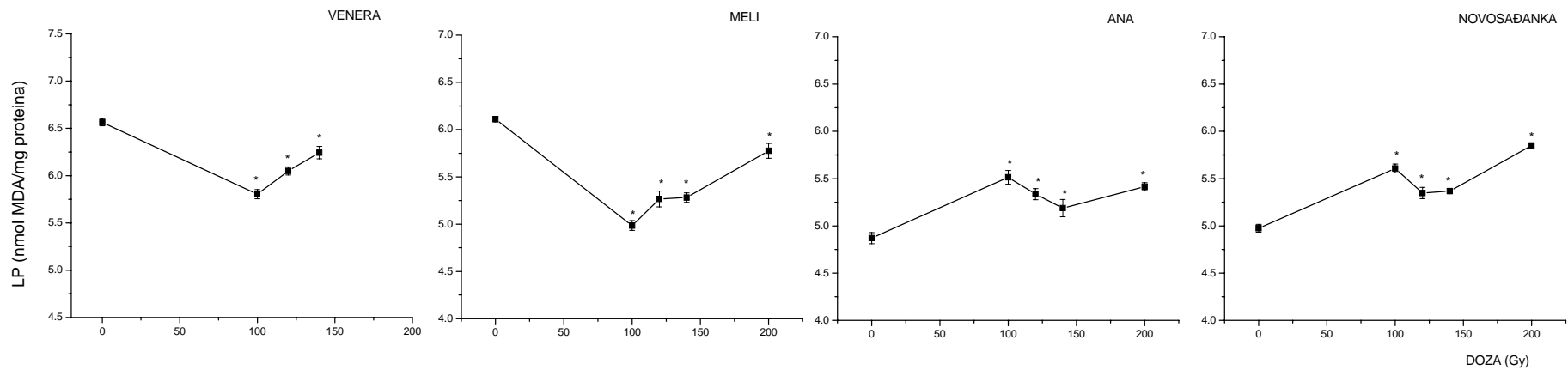


Grafikon 49. Uticaj niskih doza γ -zračenja na intenzitet LP u poniku odabranih genotipova soje
 * Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



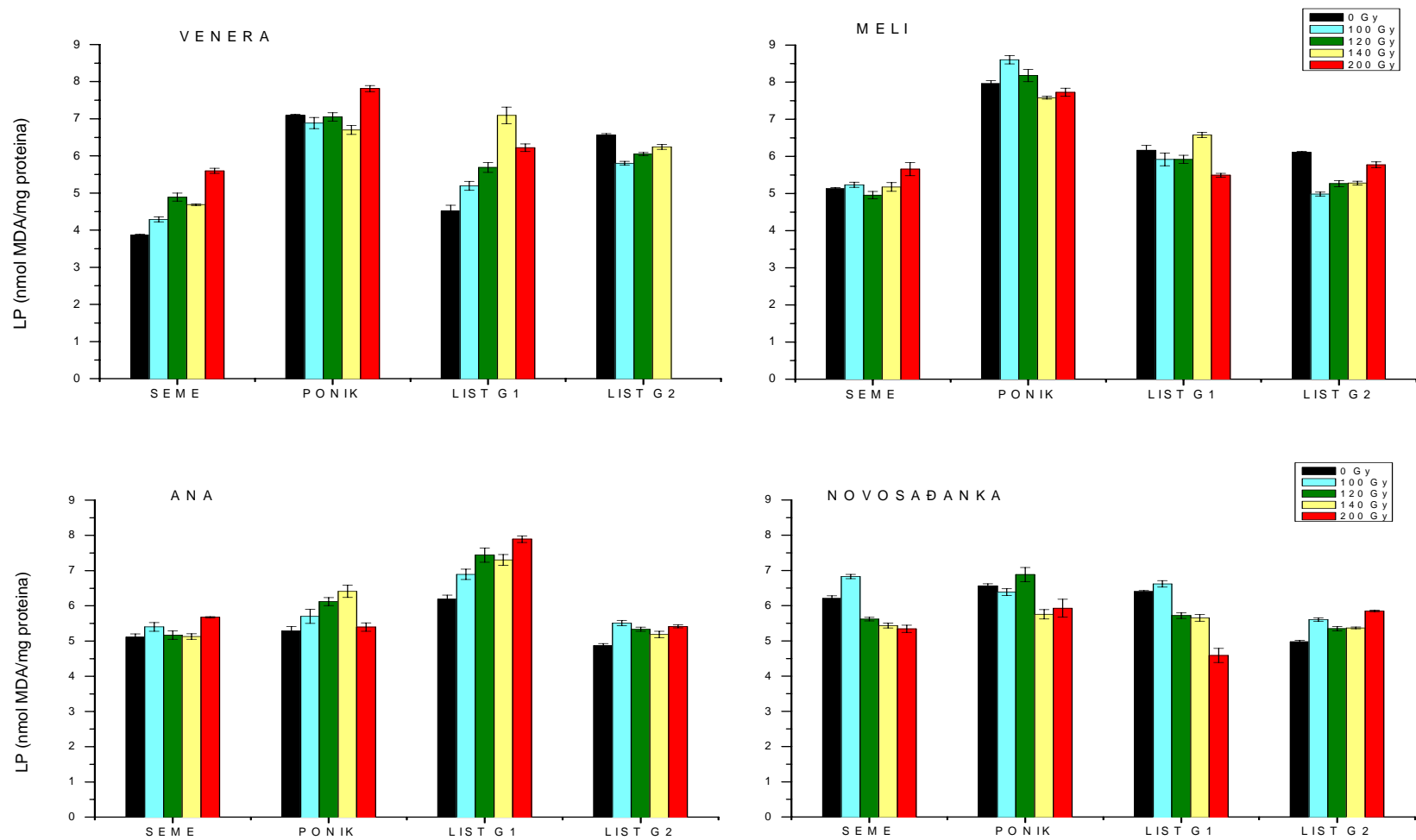
Grafikon 50. Uticaj niskih doza γ -zračenja na intenzitet LP u listu G1 odabranih genotipova soje

* Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 51. Uticaj niskih doza γ -zračenja na intenzitet LP u listu G2 odabranih genotipova soje

* Signifikantnost u odnosu na kontrolu (neozračeni uzorak) za $p < 0,05$



Grafikon 52. Promene u intenzitetu lipidne peroksidacije tokom razvika odabranih genotipova ozračene i neozračene soje kroz dve generacije

Pod uticajem različitih doza γ -zračenja količina MDA se menjala u opsegu od: 4,29-5,60 nmol/mg proteina (Venera); 4,95-5,66 nmol/mg proteina (Meli); 5,13-5,68 nmol/mg proteina (Ana) i 5,34-6,82 nmol/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 48). Kod genotipa Venera utvrđeno je povećanje količine MDA sa povećanjem doze zračenja, tako da je najveći porast količine MDA uočen pri dozi od 200 Gy (45,1%). Jedina statistički značajna promena količine MDA kod genotipova Meli i Ana utvrđena je pri dozi od 200 Gy kada je zabeleženo povećanje količine MDA za 10,3% (Meli) i 11,2% (Ana). Kod genotipa Novosađanka uočeno je povećanje količine MDA jedino pri dozi od 100 Gy (9,82%). Pri ostalim dozama zračenja došlo je do opadanja količine MDA, a naročito pri dozi od 200 Gy (14,0%).

Ponik. Količina MDA izražena u nmol/mg proteina je u kontrolama iznosila: 7,09 (Venera); 7,96 (Meli); 5,28 (Ana) i 6,56 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja količina MDA se menjala u opsegu od: 6,70-7,81 nmol/mg proteina (Venera); 7,58-8,61 nmol/mg proteina (Meli); 5,40-6,41 nmol/mg proteina (Ana) i 5,76-6,88 nmol/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 49). Promene količine MDA kod genotipova Venera, Meli i Novosađanka bile su manje od 15% u odnosu na kontrolu i uglavnom nisu bile statistički značajne. Kod genotipa Ana utvrđen je porast količine MDA pri svim dozama, a najveći porast zabeležen je pri dozi od 140 Gy (21,4%).

List G1. Količina MDA izražena u nmol/mg proteina je u kontrolama iznosila: 4,51 (Venera); 6,16 (Meli); 6,19 (Ana) i 6,40 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja količina MDA se menjala u opsegu od: 5,19-7,09 nmol/mg proteina (Venera); 5,49-6,58 nmol/mg proteina (Meli); 6,89-7,89 nmol/mg proteina (Ana) i 4,58-6,62 nmol/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 50). Kod genotipova Venera i Ana došlo je do povećanja količine MDA pri svim dozama zračenja, a naročito pri dozi od 140 Gy kod genotipa Venera (57,2%) i pri dozi od 200 Gy kod genotipa Ana (27,5%). Kod genotipa Meli jedina statistički značajna promena količine MDA bila je njeno smanjenje za 10,9% uočeno pri dozi od 200 Gy. Kod genotipa Novosađanka količina MDA se smanjivala pri većim dozama zračenja, a najviše pri dozi od 200 Gy (28,4%).

List G2. Količina MDA izražena u nmol/mg proteina je u kontrolama iznosila: 6,56 (Venera); 6,11 (Meli); 4,87 (Ana) i 4,97 (Novosađanka). Pod uticajem različitih doza γ -zračenja količina MDA se menjala u opsegu od: 5,80-6,24 nmol/mg proteina (Venera); 4,98-5,78 nmol/mg proteina (Meli); 5,19-5,51 nmol/mg proteina (Ana) i 5,35-6,25 nmol/mg proteina (Novosađanka), (Grafikon 51). Kod genotipova Venera i Meli uočeno je smanjenje količine MDA pri svim dozama zračenja. Najveće smanjenje količine MDA uočeno je kod oba genotipa pri dozi od 100 Gy i iznosilo je 11,6% (Venera) i 18,5% (Meli). Kod genotipova Ana i Novosađanka došlo je do porasta količine MDA pri svim dozama, a naročito pri dozi od 100 Gy kod genotipa Ana (13,1%) i pri dozi od 200 Gy kod genotipa Novosađanka (17,7%).

Na grafikonu 52. prikazane su promene količine MDA tokom rasta i razvika odabranih genotipova ozračene i neozračene soje kroz dve generacije. Na osnovu uporedne analize intenziteta lipidne peroksidacije (LP) kod ozračenih i neozračenih genotipova soje mogu se izvući sledeći zaključci o delovanju γ -zračenja na količinu MDA:

- kod genotipa Venera utvrđeno je značajno povećanje količine MDA u nakvašenom semenu i listu G1, a naročito pri većim dozama zračenja;
- kod genotipa Meli promene količine MDA nisu bile velike i uglavnom nisu bile signifikantne sem u listu G2 gde je utvrđeno izvesno smanjenje količine MDA;
- kod genotipa Ana utvrđeno je povećanje količine MDA u svim fazama razvoja, a najviše u listu G1;
- kod genotipa Novosađanka utvrđeno je smanjenje količine MDA u listu G1, nakvašenom semenu i u poniku pri većim dozama zračenja, dok je u listu G2 uočeno izvesno povećanje količine MDA.

Iz izloženog se može konstatovati da je količina MDA povećana u svim fazama razvoja ozračenog genotipa Ana, a naročito u listu G1 i kod genotipa Venera u nakvašenom semenu i listu G1. U ovim fazama razvoja kod pomenutih genotipova takođe je povećana i količina HO[•] radikala što ukazuje na pozitivnu korelaciju između ova dva parametra. Kod genotipova Meli i Novosađanka količina MDA se nije menjala u značajnoj meri ili se smanjivala.

Najvažnija posledica delovanja γ -zračenja na lipide je građenje lipidnih-hidroperoksida (Nawar, 1972) i isparljivih karbonilnih jedinjenja (Merritt, 1972). Međutim, lipidi u znu soje se u većoj meri razgrađuju tek pri visokim dozama γ -zračenja, većim od 10 kGy. Doze γ -zračenja do 10 kGy dovode do smanjenja aktivnosti lipoksigenaze a samim tim i do smanjenja peroksidacije nezasićenih masnih kiselina, a naročito linoleinske kiseline (Byun i sar., 1995). Promene intenziteta lipidne peroksidacije u pojedinim fazama razvika soje čije je seme bilo ozračeno niskim dozama γ -zračenja posledica su dinamičkih promena u antioksidantnom sistemu ozračene biljke i povećane produkcije visokotoksičnog HO[•] radikala.

Yanqun i saradnici (2003) su utvrdili da je uticaj UV-B zračenja na lipidnu peroksidaciju varirao u zavisnosti od genotipa. Takođe je utvrđeno da genotipovi soje tolerantni na oksidativni stres izazvan sušom imaju manju količinu MDA u listovima u odnosu na osetljive genotipove (Malenčić i sar., 2003). Stoga se može zaključiti da je lipidna peroksidacija jedan od indikatora osetljivosti pojedinih genotipova na pojavu oksidativnog stresa.

4.1.12. Lipidna peroksidacija kao kriterijum osetljivosti pojedinih genotipova soje na radijacioni stres

Prema Ferrat i saradnicima (2003) LP predstavlja biomarker oksidativnog stresa izazvanog delovanjem nekih metala (Cu, Zn i Cd) na morske i slatkovodne biljne vrste i može poslužiti zajedno sa nekim antioksidantnim parametrima u „ekotoksikološkoj dijagnostici“. Lytle i saradnici (1998) su lipidnu peroksidaciju okarakterisali kao koristan indikator osetljivosti i rezistentnosti pojedinih biljaka na delovanje atrazina, triazinskog herbicida koji u biljnim tkivima izaziva oksidativni stres. Prema ovom kriterijumu, biotipovi kod kojih je zabeležen porast LP bili su osetljivi na atrazin, a rezistentni oni kod kojih je utvrđeno smanjenje intenziteta LP. Lipidna peroksidacija predstavlja biomarker oksidativnog stresa takođe i u humanim tkivima (Jovanović i sar., 1998).

Kao što je pomenuto, lipidna peroksidacija je direktna posledica delovanja većih doza γ -zračenja na lipide (Merritt, 1972; Nawar, 1972). Niske doze γ -zračenja dovode do povećanja LP u živoj ćeliji utičući negativno na brojne fiziološke procese

kada nastaju reaktivne kiseonične vrste, a pre svega hidroksil-radikal (Wada i sar., 1998).

Na osnovu analogije sa rezistencijom biljka na oksidativni stres izazvan različitim ekološkim uticajima, LP bi mogla poslužiti i kao indikator senzitivnosti odnosno rezistentnosti genotipova soje na delovanje radijacionog stresa.

Najizrazitija povećanja intenziteta lipidne peroksidacije kod genotipova Venera i Ana utvrđena su u listu G1 pa se može zaključiti da su u ovoj fazi razvoja ispitivani genotipovi soje bili najosetljiviji na delovanje oksidativnog i radijacionog stresa. Kod ovih genotipova je i u ostalim fazama razvoja utvrđeno povećanje intenziteta LP ali u manjoj meri. Kod genotipova Meli i Novosađanka intenzitet LP se nije menjao u značajnoj meri ili se smanjivao tokom razvoja.

Na osnovu LP kao kriterijuma (biomarkera) osetljivosti na radijacioni i oksidativni stres ispitivani genotipovi se mogu svrstati u dve grupe:

- radiosenzitivni genotipovi Venera i Ana za koje je utvrđena izražena osetljivost na oksidativni i radijacioni stres i
- radiorezistentni genotipovi Meli i Novosađanka za koje je utvrđena otpornost na delovanje oksidativnog i radijacionog stresa.

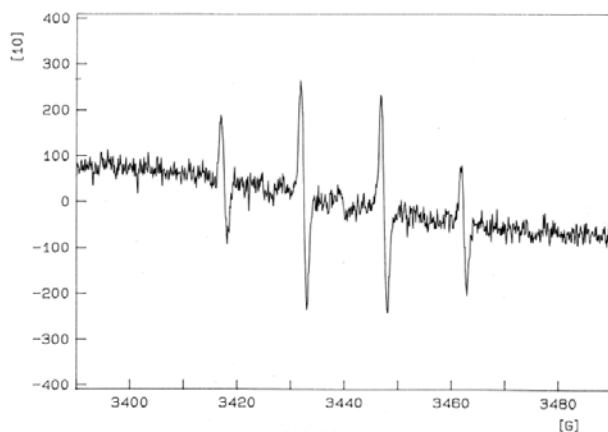
4.1.13. ESR spektroskopsko određivanje hidroksil-radikala u prisustvu ekstrakata lista ozračene i neozračene soje

Pomoću elektron spin rezonantne spektroskopije (ESR) moguće je određivanje količine slobodnih radikala u biološkim sistemima i hrani (Dadayli i sar., 1997). Jedna od važnijih metoda za identifikaciju ozračene hrane i dozimetriju je ESR spektroskopija (Raffi i sar., 2000).

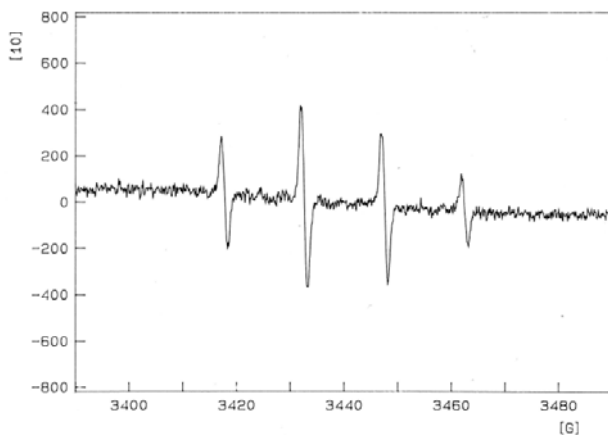
Lee i saradnici (2002) detektovali su pomoću ESR spektroskopije u preparatima soje 4 vrste C-centriranih radikala izvedenih iz proteina. Hidroksil-radikal, koji nastaje radiolizom vode, identifikovan je samo u preparatima koji nisu bili potpuno suvi. Kumagai i saradnici (2000) su pomoću ESR spektroskopije ispitivali uticaj γ -zračenja na seme *Arabidopsis thaliana* i *Raphanus sativus*. Utvrdili su da γ -zračenje dovodi do nastajanja dugo-živećih i super-dugo-živećih C- i N-centriranih radikala izvedenih iz proteina u semenu ovih vrsta. Osetljivost ispitivanih biljaka na radijacioni stres dovedena je u vezu sa pojavom super-dugo-živećih radikala. Osetljivost pojedinih sorti pirinča na delovanje γ -zračenja takođe je dovedeno u vezu sa dugo-živećim slobodnim radikalima koji tada nastaju (Kumagai i sar., 1999).

Elektron spin rezonantna eksperimentalna istraživanja bioloških sistema dovode u vezu oštećenja tkiva sa kiseonikovim slobodnim radikalima (Čanadanović-Brunet, 1998). ESR spektroskopija omogućuje određivanje hidroksil-radikala u biološkim sistemima (*in vivo*) spin-trap metodom. ESR spektroskopija i spin-trap tehnika su izuzetno precizne i lako primenljive tehnike za detekciju i određivanje visokoreaktivnih kiseoničnih radikala u biološkim sistemima.

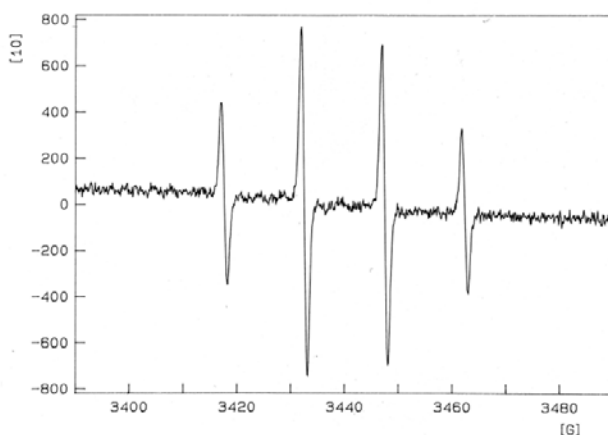
Na slikama 28-35 prikazani su ESR spektri DMPO-OH spin-adukata snimljenih u prisustvu fosfatno-puferskih ekstrakata lista G1 neozračenih i ozračenih (200 Gy) genotipova soje.



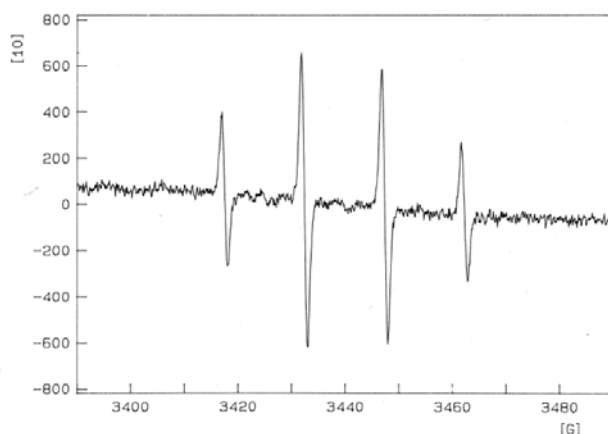
Slika 28. ESR spektar DMPO-OH spin-adukta model sistema u prisustvu fosfatno-puferskog ekstrakta lista G1 neozračenog genotipa Venera



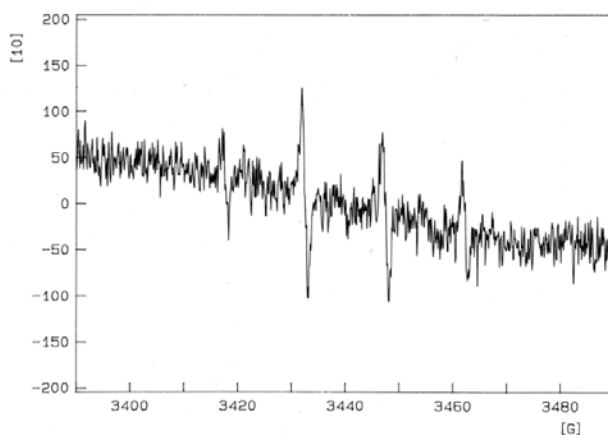
Slika 29. ESR spektar DMPO-OH spin-adukta model sistema u prisustvu fosfatno-puferskog ekstrakta lista G1 ozračenog (200 Gy) genotipa Venera



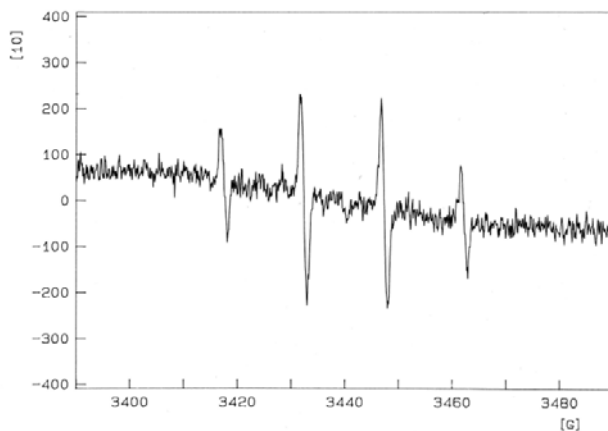
Slika 30. ESR spektar DMPO-OH spin-adukta model sistema u prisustvu fosfatno-puferskog ekstrakta lista G1 neozračenog genotipa Meli



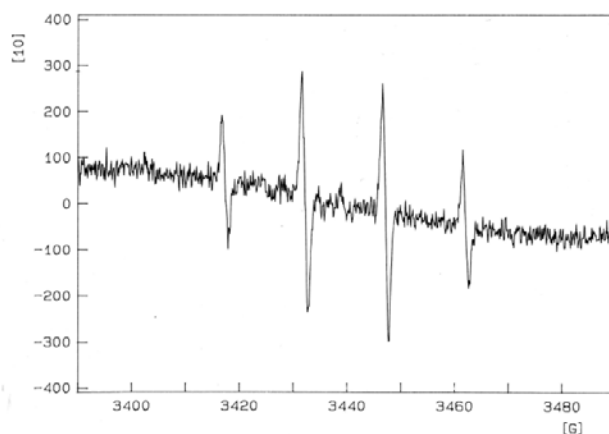
Slika 31. ESR spektar DMPO-OH spin-adukta model sistema u prisustvu fosfatno-puferskog ekstrakta lista G1 ozračenog (200 Gy) genotipa Meli



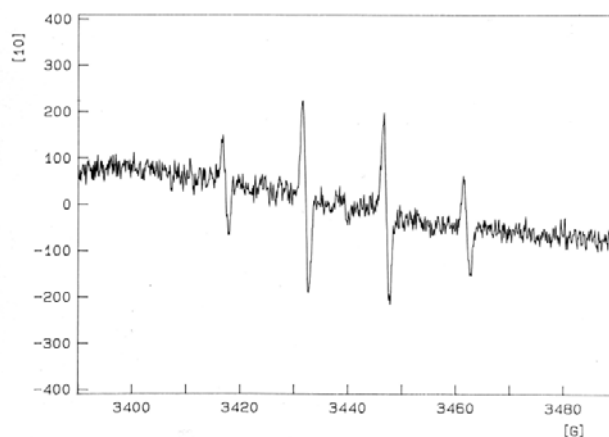
Slika 32. ESR spektar DMPO-OH spin-adukta model sistema u prisustvu fosfatno-puferskog ekstrakta lista G1 neozračenog genotipa Ana



Slika 33. ESR spektar DMPO-OH spin-adukta model sistema u prisustvu fosfatno-puferskog ekstrakta lista G1 ozračenog (200 Gy) genotipa Ana



Slika 34. ESR spektar DMPO-OH spin-adukta model sistema u prisustvu fosfatno-puferskog ekstrakta lista G1 neozračenog genotipa Novosađanka



Slika 35. ESR spektar DMPO-OH spin-adukta model sistema u prisustvu fosfatno-puferskog ekstrakta lista G1 ozračenog (200 Gy) genotipa Novosađanka

U tabeli 2. prikazane su vrednosti relativnih intenziteta (RI) ESR signala DMPO-OH spin-adukata snimljenih u prisustvu fosfatno-puferskih ekstrakata lista G1 neozračenih i ozračenih (200 Gy) genotipova soje. Ekstrakti neozračene soje korišćeni su kao kontrole.

Tabela 2. Rezultati ESR ispitivanja ekstrakata lista G1 ozračene i neozračene soje

Genotip	RI _{kontrole}	RI _{ozračene soje}	Promena RI (±%) [*]
Venera	2650	4300	+62,3
Meli	7650	6500	-15,0
Ana	1250	2300	+84,0
Novosađanka	2880	2230	-22,6

* Promena RI ESR signala ozračene soje izražena je u procentima (±%) u odnosu na kontrolu. Promena RI (±%)=100•(RI_{ozračene soje}-RI_{kontrole})/RI_{kontrole}

Kao što se može videti iz tabele 2. relativni intenziteti ESR signala DMPO-OH spin-adukata u prisustvu ekstrakata ozračene soje bili su veći u odnosu na kontrolu za 62,3% kod genotipa Venera i za 84,0% kod genotipa Ana. Kod

genotipova Meli i Novosađanka utvrđeno je izvesno smanjenje RI ESR signala u odnosu na kontrolu. Povećanje RI ESR signala kod genotipova Venera i Ana ukazuje na to da u listovima ovih genotipova dolazi do povećane produkcije izuzetno toksičnog HO[•] radikala u odnosu na neozračenu kontrolu. Kao što je već pomenuto, HO[•] radikal u listu nastaje iz manje reaktivnih kiseoničnih vrsta, superoksid-radikala i vodonik-peroksida (Navari Izzo i sar., 1999). Do pojačanog stvaranja reaktivnih kiseoničnih vrsta u biljnoj ćeliji dolazi uglavnom pri nepravilnom odvijanju oksidoredukcionih reakcija u procesima respiracije i fotosinteze (Elstner i sar., 1991). Stoga se može zaključiti da je ozračivanje semena genotipova Venera i Ana izazvalo poremećaje u odvijanju redoks procesa u listovima odraslih biljaka a time i hroničan oksidativni stres.

Navedeni rezultati su u potpunoj saglasnosti sa rezultatima spektrofotometrijskog određivanja intenziteta LP i količine hidroksil-radikala u pomenutim uzorcima. Rezultati ESR spektroskopije potvrđuju pretpostavku da su genotipovi Meli i Novosađanka rezistentni na oksidativni i radijacioni stres izazvan delovanjem γ -zračenja. Za razliku od njih, kod ozračenih genotipova Venera i Ana dolazi do povećane produkcije hidroksil-radikala u listu G1 što je i glavni uzrok povećanja intenziteta LP.

4.1.14. Indukcija antioksidantne aktivnosti odabranih genotipova soje pod uticajem radijacionog i oksidativnog stresa

Upoređivanjem antioksidantnih statusa ozračenih i neozračenih genotipova soje može se utvrditi da pod uticajem radijacionog i oksidativnog stresa kojem je bilo izloženo seme, pojedini genotipovi tokom razvoja aktiviraju određene komponente svog antioksidantnog sistema. Može se konstatovati da γ -zračenje kojem je bilo izloženo seme dovodi do dinamičkog odgovora biljke i do indukcije antioksidantne aktivnosti u različitim fazama razvoja soje. Do značajne indukcije aktivnosti ispitivanih antioksidantnih parametara došlo je u sledećim slučajevima:

- aktivnost SOD povećavala se kod genotipa Venera u listu G1, kod genotipa Meli listu G1 i G2, kod genotipa Ana u poniku i kod genotipa Novosađanka u nakvašenom semenu i poniku;
- aktivnost CAT povećavala se kod genotipa Venera u nakvašenom semenu i poniku, kod genotipa Meli u listu G2 i kod genotipa Novosađanka u poniku;
- aktivnost GPx povećavala se kod genotipa Venera u nakvašenom semenu i listu G1, kod genotipa Ana u listu G1 i kod genotipa Novosađanka u nakvašenom semenu i listu G2;
- aktivnost GSH-Px povećavala se kod genotipa Venera u listu G1 i G2 i kod genotipa Meli u listu G2;
- količina GSH povećavala se kod genotipa Venera u nakvašenom semenu, poniku i listu G1, kod genotipa Meli u listu G1 i kod genotipa Novosađanka u listu G2;
- ukupna antioksidantna aktivnost određena FRAP metodom povećavala se kod genotipova Venera i Meli u svim fazama razvoja, kod genotipa Ana u poniku i kod genotipa Novosađanka u poniku i listu G1;
- DPPH skevindžer aktivnost povećavala se kod genotipova Venera i Meli u svim fazama razvoja i kod genotipa Ana u poniku;

- inhibicija NO povećavala se kod genotipova Venera, Ana i Novosađanka u poniku i kod genotipa Meli u listu G2.

Na osnovu izloženog može se zaključiti sledeće:

- postoji uzročno-posledična veza između radijacionog stresa izazvanog delovanjem γ -zračenja, oksidativnog stresa i antioksidantnog odgovora biljke;
- promene aktivnosti pojedinih komponenti antioksidantnog sistema zavise od doze primenjenog zračenja, genotipa kao i od faze razvoja biljke;
- ni jedan od ispitivanih antioksidanata ne može se izdvojiti kao univerzalni indikator radijacionog stresa za sve genotipove i u svim fazama razvoja;
- u mehanizam antioksidantne zaštite podjednako su uključeni neenzimski antioksidanti kao i antioksidantni enzimi;
- u slučaju smanjenja aktivnosti neke komponente antioksidantnog sistema, ostale komponente preuzimaju ulogu u sistemu antioksidantne zaštite tako da se antioksidantni sistem ponaša kao neraskidiva celina čije su pojedine komponente povezane u svojoj aktivnosti;
- u slučajevima značajnog povećanja ukupne antioksidantne aktivnosti pojedine komponente antioksidantnog sistema deluju sinergistički;
- antioksidantni sistem je dinamički sistem u kome se aktivnosti pojedinih komponenti neprestano menjaju tokom razvoja i u zavisnosti od spoljnih uticaja;
- u nekim slučajevima je utvrđeno da se indukcija određene antioksidantne aktivnosti kao fenotipska karakteristika stečena u G1 generaciji (u listu) prenosi i u drugu, G2 generaciju;
- u većini slučajeva je utvrđeno da postoji razlika između efekata nižih doza (100 i 120 Gy) i većih doza (140 i 200 Gy) zračenja na aktivnost pojedinih antioksidanata.

Ako se uporede antioksidantni statusi genotipova za koje je pretpostavljeno da su radiosenzitivni i radiorezistentni može se zaključiti da indukcija antioksidantnog sistema nije jedini uzrok pojave rezistencije na radijacioni stres. Tako je, na primer, kod genotipa Venera u listu G1 utvrđeno izrazito povećanje antioksidantne aktivnosti kod većine parametara iako je istovremeno zabeleženo i povećanje intenziteta LP i količine hidroksil-radikala.

Pored antioksidantnog sistema u zaštiti od radijacionog i oksidativno stresa uključeni su i drugi zaštitni sistemi, kao npr. sistem za „popravku“ („repair“) oštećenih biomolekula. Uticaj jonizujućeg zračenja na žive sisteme je kompleksan fenomen i obuhvata niz signalnih puteva i gena koji se tada aktiviraju. Tako je utvrđeno da je za izrazitu radiorezistentnost nekih mikroorganizama (*Deinococcus radiodurans* i *Escherichia coli*) odgovoran gen koji aktivira sistem za popravku radijacijom izazvanih oštećenja na DNK (Gao i sar., 2003).

Može se pretpostaviti da važnu ulogu u razvoju rezistencije genotipova Meli i Novosađanka na radijacioni stres ima i sistem za reparaciju DNK.

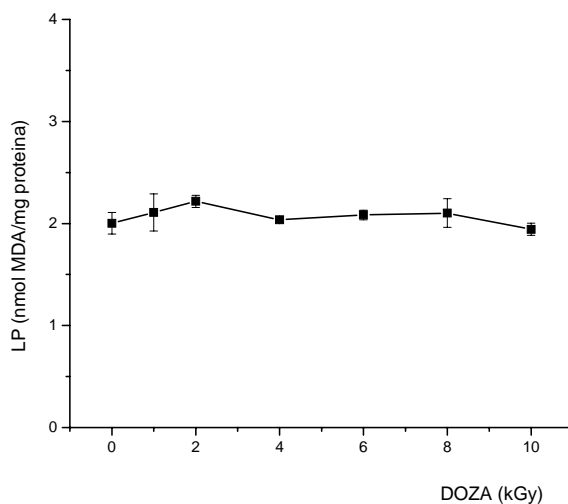
4.2. Uticaj srednjih doza γ -zračenja na odabrane antioksidantne karakteristike semena soje

U ovom poglavlju su razmatrani i diskutovani rezultati ispitivanja uticaja srednjih doza γ -zračenja (1-10 kGy) na parametre oksidativnog stresa i odabrane antioksidantne parametre u semenu soje. Kontrolu je predstavljalo neozračeno seme. Rezultati su predstavljeni grafički. Na grafikonima su označene statistički signifikantne promene u odnosu na kontrolu.

4.2.1. Uticaj srednjih doza γ -zračenja na intenzitet lipidne peroksidacije u semenu soje

Na grafikonu 53. prikazani su rezultati ispitivanja uticaja srednjih doza γ -zračenja na intenzitet LP u semenu soje.

Količina MDA u neozračenom semenu soje je iznosila 2,00 nmol/mg proteina. Pod uticajem γ -zračenja količina MDA se menjala u opsegu od 1,94-2,22 nmol/mg proteina (Grafikon 53). Ni kod jedne doze zračenja nije utvrđena signifikantna promena količine MDA u odnosu na kontrolu. Najveća promena količine MDA je utvrđena kod doze od 2 kGy. Tada je uočeno povećanje količine MDA za 11,0% u odnosu na neozračenu kontrolu.



Grafikon 53. Uticaj srednjih doza γ -zračenja na intenzitet LP u semenu soje

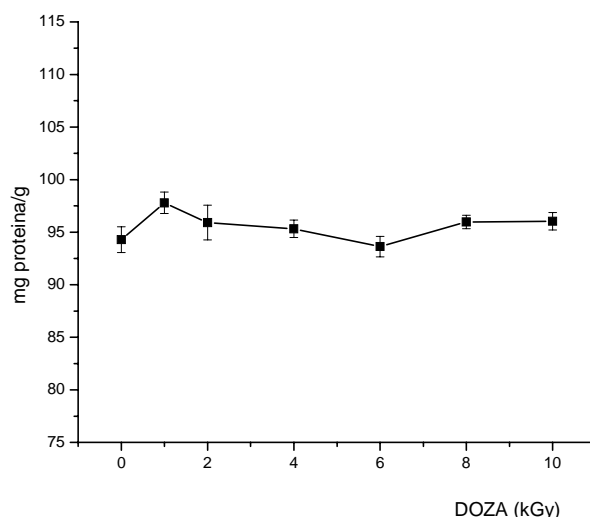
Byun i saradnici (1995) su dobili slične rezultate ispitujući fizičko-hemijske karakteristike sojinog ulja ekstrahovanog iz ozračenog semena soje. Utvrđeno je da doze γ -zračenja do 10 kGy ne izazivaju signifikantne promene sadržaja ukupnih lipida, sastava viših masnih kiselina, peroksidnog i kiselinskog broja. Međutim, pri dozama γ -zračenja većim od 10 kGy lipidi u soji se u većoj meri razgrađuju kada dolazi do povećanja količine n-heksanala. n-Heksanal predstavlja jedan od najvažnijih proizvoda peroksidacije nezasićenih masnih kiselina, a naročito linoleinske kiseline. Doze γ -zračenja do 100 kGy dovode do postepenog povećanja količine n-heksanala, tako da je pri dozi od 100 kGy sadržaj n-heksanala 5 puta veći nego u neozračenoj kontroli (Byun i sar., 1995).

4.2.2. Uticaj srednjih doza γ -zračenja na sadržaj rastvorljivih proteina u semenu soje

Na grafikonu 54. prikazani su rezultati ispitivanja uticaja srednjih doza γ -zračenja na sadržaj rastvorljivih proteina u semenu soje.

Sadržaj rastvorljivih proteina je u kontroli je iznosio 94,3 mg proteina/g. Pod uticajem γ -zračenja sadržaj rastvorljivih proteina se menjao u opsegu od 93,6-97,8 mg proteina/g (Grafikon 54). Ni kod jedne doze zračenja nije utvrđena signifikantna promena sadržaja rastvorljivih proteina u odnosu na kontrolu. Najveća promena sadržaja rastvorljivih proteina bilo je povećanje od svega 3,71% utvrđeno pri dozi od 1 kGy.

Byun i saradnici (1996) su utvrdili da doze γ -zračenja veće od 10 kGy dovode do signifikantnog povećanja vodorastvornih komponenti u soji kao što su mineralne materije, šećeri i azot. Utvrđeno je takođe da soja ozračena većim dozama zračenja od 5 kGy kada se potopi u vodu otpušta slobodne aminokiseline, a naročito treonin, glicin, alanin, valin i fenilalanin. Utvrđeno je da količina oslobođenih aminokiselina raste sa porastom doze zračenja, a naročito pri dozama većim od 10 kGy. Navedeni rezultati su u skladu sa našim rezultatom da doze γ -zračenja do 10 kGy ne dovode do signifikantne promene sadržaja rastvorljivih proteina u semenu soje.

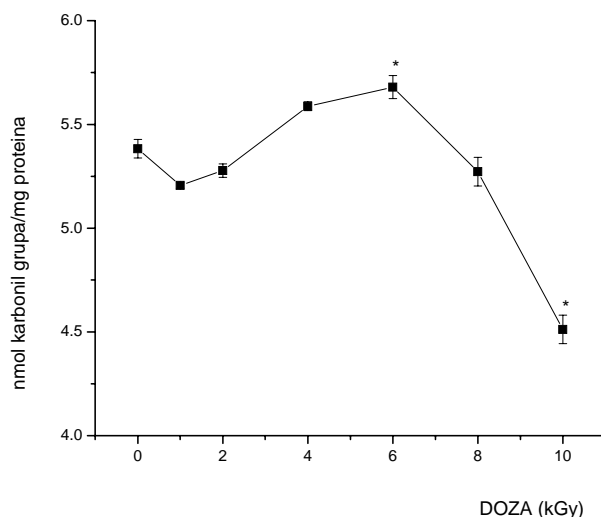


Grafikon 54. Uticaj srednjih doza γ -zračenja na sadržaj rastvorljivih proteina u semenu soje

4.2.3. Uticaj srednjih doza γ -zračenja na intenzitet oksidacije proteina u semenu soje

Na grafikonu 55. prikazani su rezultati ispitivanja uticaja srednjih doza γ -zračenja na količinu karbonil-grupa u oksidativno modifikovanim proteinima u semenu soje.

Količina karbonil-grupa u oksidativno modifikovanim proteinima u kontroli je iznosila 5,38 nmol/mg proteina. Pod uticajem γ -zračenja količina karbonil-grupa se menjala u opsegu od 4,51-5,68 nmol/mg proteina (Grafikon 55).



Grafikon 55. Uticaj srednjih doza γ -zračenja na količinu karbonil-grupa u oksidativno modifikovanim proteinima u semenu soje

Signifikantne promene količine karbonil-grupa uočene su jedino pri dozama od 6 i 10 kGy. Najveći porast količine karbonil-grupa utvrđen je pri dozi od 6 kGy (5,58%), a najveće smanjenje pri dozi od 10 kGy (16,2%).

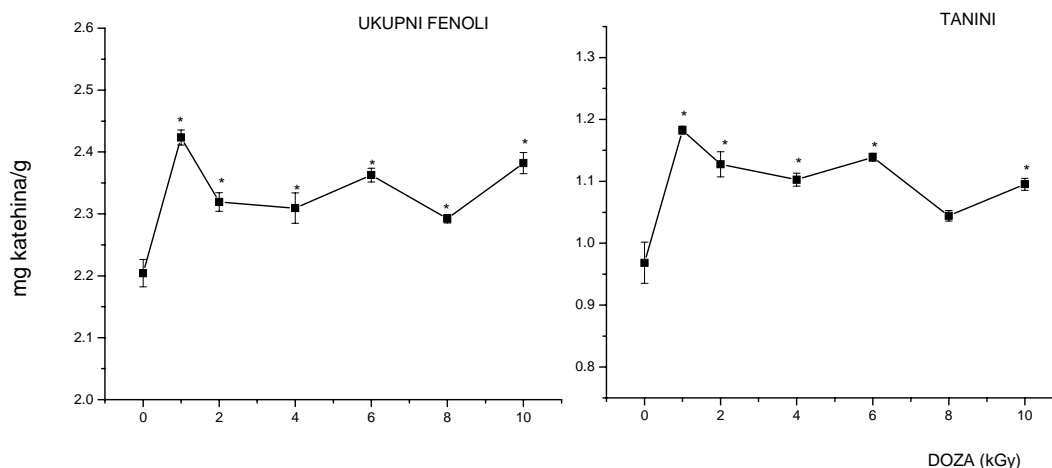
Kao što je već pomenuto, rezultati ESR spektroskopije ukazuju da dejstvom γ -zračenja na soju nastaju radikali izvedeni iz proteina (Lee i sar., 2002). Proteinski radikali mogu lako da reaguju sa molekulskim kiseonikom i da se tako oksiduju. Oksidacijom α -C atoma i ostalih C-atoma u bočnim nizovima amino-kiselina povećava se količina karbonil-grupa u proteinima (Huang i sar., 2006).

Naši rezultati ukazuju da je određivanje oksidativnih modifikacija na proteinima osetljiviji parametar oksidativnog stresa od lipidne peroksidacije kod koje nisu utvrđene signifikantne promene. Smanjenje količine karbonil-grupa u proteinima pri dozi od 10 kGy ukazuje na istovremeno povećanje ukupne antioksidantne aktivnosti.

4.2.4. Uticaj srednjih doza γ -zračenja na sadržaj ukupnih fenola i tanina u semenu soje

Na grafikonu 56. prikazani su rezultati ispitivanja uticaja srednjih doza γ -zračenja na sadržaj ukupnih fenola i tanina u semenu soje.

Sadržaj ukupnih fenola u kontroli je iznosio 2,20 mg katehina/g, a sadržaj ukupnih tanina 0,97 mg katehina/g. Pod uticajem γ -zračenja sadržaj ukupnih fenola se menjao u opsegu od 2,29-2,42 mg katehina/g, a sadržaj ukupnih tanina od 1,04-1,18 mg katehina/g (Grafikon 56). Pri svim dozama zračenja uočeno je povećanje sadržaja oba parametra. Najveći porast sadržaja ukupnih fenola (10,0%) i ukupnih tanina (21,6%) uočen je pri dozi od 1 kGy.



Grafikon 56. Uticaj srednjih doza γ -zračenja na sadržaj ukupnih fenola i tanina u semenu soje

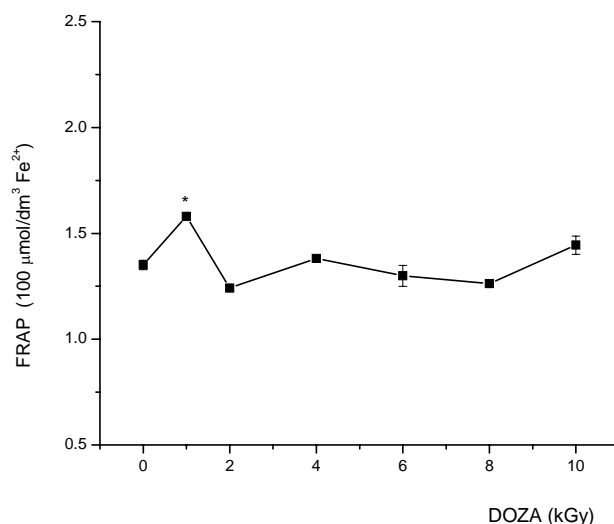
Ako se uporede grafikoni zavisnosti sadržaja ukupnih fenola i tanina u zavisnosti od doze γ -zračenja (Grafikon 56) može se konstatovati da su tanini upravo ta grupa fenolnih jedinjenja čiji se sadržaj povećava delovanjem γ -zračenja. Tanini predstavljaju grupu vodorastvornih oligo- i polimerizovanih fenola i dele se u dve grupe, na hidrolizujuće i kondenzovane (proantocijanidine), (Harborn, 1997). Poznato je da γ -zračenje pored jonizujućeg dejstva na materiju dovodi i do nastajanja slobodnih radikala. Jedna od primena jonizujućeg zračenja u tehnologiji i zasniva se na inicijaciji slobodno-radikalskih reakcija kod dobijanja sintetičkih polimera (Tagawa i sar., 2004). Može se pretpostaviti da u ozračenoj soji nastaju kondenzovane taninske strukture po slobodno-radikalском mehanizmu.

4.2.5. Ispitivanje uticaja srednjih doza γ -zračenja na ukupnu antioksidantnu aktivnost ekstrakata semena soje FRAP metodom

Na grafikonu 57. prikazani su rezultati ispitivanja uticaja srednjih doza γ -zračenja na ukupnu antioksidantnu aktivnost ekstrakata semena soje.

Ukupna antioksidantna aktivnost ekstrakta neozračenog semena iznosila je 1,35 FRAP jedinica. Pod uticajem γ -zračenja ukupna antioksidantna aktivnost se menjala u opsegu od 1,24-1,58 FRAP jedinica (Grafikon 57). Jedino pri dozi od 1 kGy utvrđena je signifikantna promena i to povećanje FRAP vrednosti za 17,0% u odnosu na kontrolu.

Kao što je pomenuto, Guo i saradnici (2003) su utvrdili da kod nekih biljaka, sadržaj vitamina C doprinosi preko 50% FRAP vrednosti, a da pored vitamina C, značajan doprinos FRAP vrednost daju flavonoidi, fenolne kiseline i ostala polifenolna jedinjenja (Guo i sar., 1997). Pri dozi od 1 kGy dolazi i do najvećeg porasta sadržaja ukupnih fenola (10,0%) i tanina (21,6%) u odnosu na neozračenu kontrolu.



Grafikon 57. Uticaj srednjih doza γ -zračenja na ukupnu antioksidantnu aktivnost ekstrakta semena soje

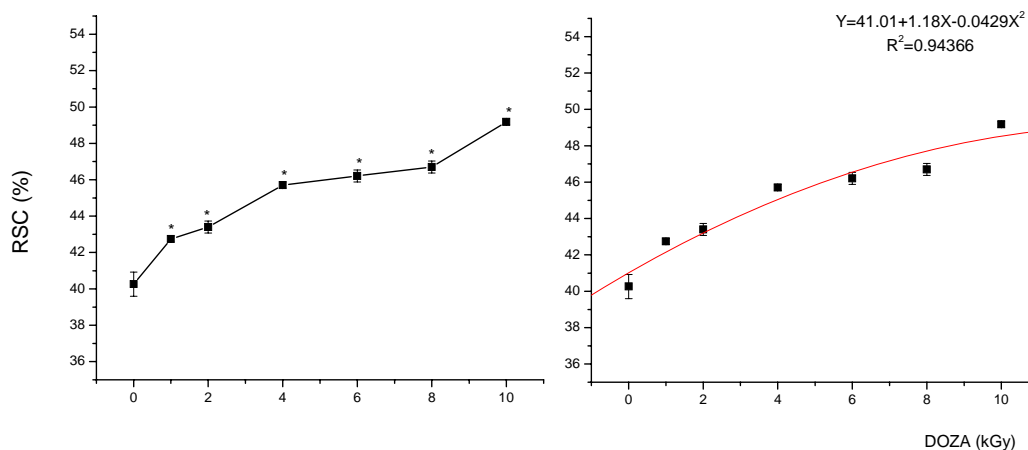
Ukupni fenoli su u ekstraktima iz suvog semena soje određeni po metodi zasnovanoj na redukcionim svojstvima fenola (Rechner, 2000) koja je analogna sa FRAP-metodom. Stoga se može pretpostaviti da pri dozi od 1 kGy dolazi upravo do povećanja sadržaja neke od navedenih grupa fenolnih jedinjenja koja imaju veliku „redukcionu moć“ na šta ukazuje FRAP-vrednost (Benzie i sar., 1996).

4.2.6. Uticaj srednjih doza γ -zračenja na DPPH skevindžer aktivnosti ekstrakta semena soje

Na grafikonu 58. prikazani su rezultati ispitivanja uticaja srednjih doza γ -zračenja na DPPH skevindžer aktivnost ekstrakta semena soje.

DPPH skevindžer aktivnost 70% etanolnih ekstrakta nezračenog semena iznosila je 40,3%. Pod uticajem γ -zračenja DPPH skevindžer aktivnost se menjala u opsegu od 42,7-49,2% (Grafikon 58). Sa povećanjem doze zračenja povećavala se i DPPH skevindžer aktivnost po zakonu koji je dobijen kao rezultat regresione analize ($y=41,01+1,18x-0,0429x^2$) i sa visokim koeficijentom korelacije ($R^2=0,94366$). Najveći porast DPPH skevindžer aktivnosti utvrđen je pri dozi od 10 kGy i iznosio je 22,1% u odnosu na kontrolu.

Variyar i saradnici (2004) su utvrdili da doze γ -zračenja do 5 kGy dovode do povećanja DPPH skevindžer aktivnosti butanolnih ekstrakata semena soje sa povećanjem doze zračenja. Povećanje DPPH skevindžer aktivnosti je dovedeno u vezu sa povećanjem sadržaja genisteina pod uticajem γ -zračenja. U pomenutom radu, pri dozi od 5 kGy utvrđeno je da se DPPH skevindžer aktivnost butanolnog ekstrakta povećala za 14,7% u odnosu na kontrolu dok je u našem radu pri dozi od 10 kGy ovo povećanje iznosilo 8,9%. Izraženiji efekat γ -zračenja na DPPH skevindžer aktivnost koji su utvrdili Variyar i saradnici (2004) može se objasniti 16 puta manjom brzinom doze γ -zračenja koja je primenjena za ozračivanje soje. Može se pretpostaviti da manje brzine doze γ -zračenja imaju izraženiji uticaj na povećanje DPPH skevindžer aktivnosti od većih brzina doze s` obzirom da se tada manje količine energije saopštavaju uzorku tokom dužeg vremenskog perioda kada dolazi do određenih hemijskih procesa.



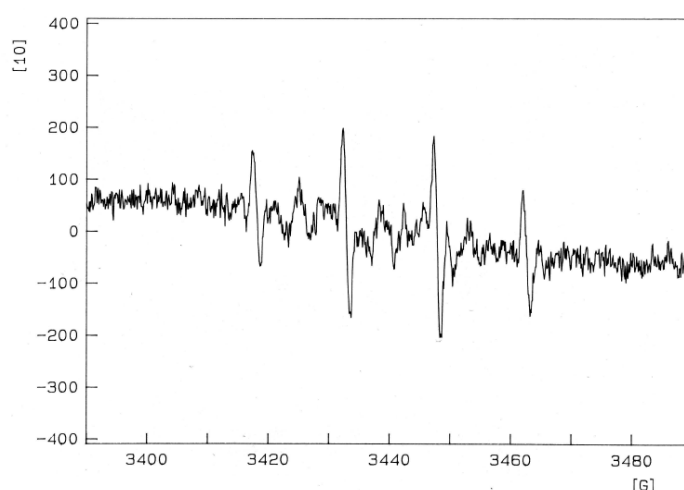
Grafikon 58. Uticaj srednjih doza γ -zračenja na DPPH skevindžer aktivnosti ekstrakata semena soje

4.2.7. ESR spektroskopsko ispitivanje skevindžer aktivnosti etilacetatnih ekstrakata ozračene i neozračene soje

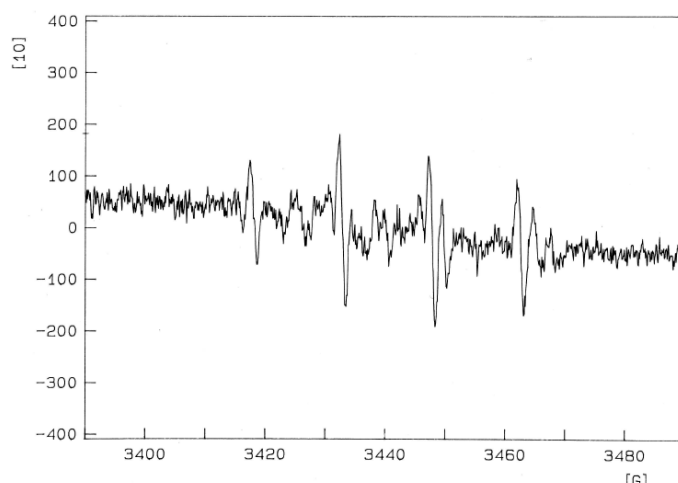
Na slikama 36-37. prikazani su ESR spektri DMPO-OH spin-adukata snimljenih u prisustvu etilacetatnih ekstrakata semena neozračene i ozračene (10 kGy) soje, a na slici 27. prikazan je ESR spektar hidroksil-radikala u Fentonovom modelu sistema (slepa proba). Sniženje intenziteta ESR signala DMPO-OH spin adukata, u odnosu na slepu probu predstavlja skevindžer efekat (SE).

Etil-acetatni ekstrakt semena neozračene soje pokazao je skevindžer efekat 22,5% dok je skevindžer efekat etil-acetatnog ekstrakta semena soje ozračenog dozom od 10 kGy iznosio 30,2%.

Veći skevindžer efekat etil-acetatnog ekstrakta ozračenog semena u odnosu na neozračeno je u saglasnosti i sa većim sadržajem ukupnih fenola i većom DPPH skevindžer aktivnošću koja je utvrđena kod ozračenog semena.



Slika 36. ESR spektar DMPO-OH spin-adukta model sistema u prisustvu etilacetatnog ekstrakta neozračenog semena soje



Slika 37. ESR spektar DMPO-OH spin-adukta model sistema u prisustvu etilacetatnog ekstrakta semena soje ozračenog dozom od 10 kGy

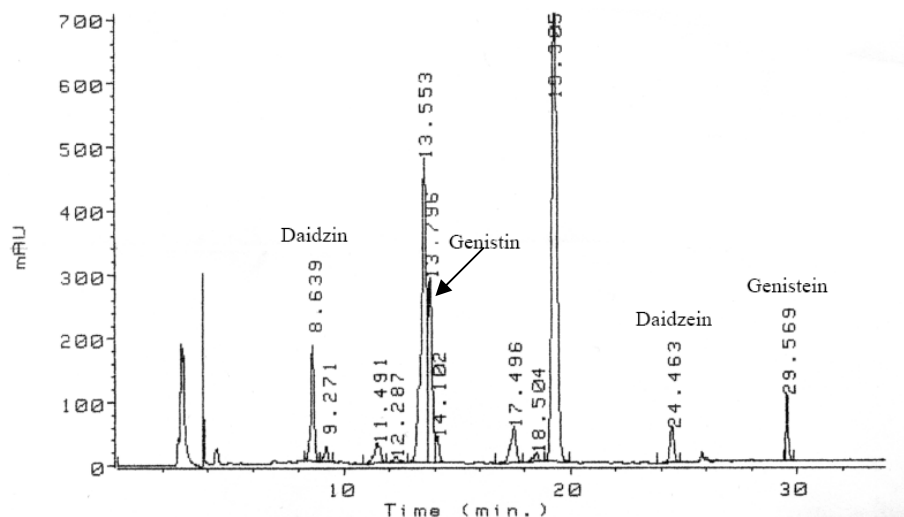
Za ESR analizu skevindžer aktivnosti nisu korišćeni 70% etanolni ekstrakti semena soje s obzirom da je utvrđeno da etanol nije pogodan kao rastvarač za ESR analizu zbog spektralnih interferencija koje potiču od etoksi-radikala. Etil-acetat se za razliku od etanola pokazao pogodnim za ESR analizu skevindžer aktivnosti antioksidantnih jedinjenja soje. Sistem rastvarača etanol-voda je pogodan za većinu fenolnih jedinjenja i njihovih glikozida (Robards, 2003). Etil-acetat je takođe odličan rastvarač za većinu fenolnih jedinjenja uključujući i izoflavone (Wu i sar., 2004).

Sposobnost fenolnih jedinjenja da uklanjaju hidroksil-radikale zasnovana je na donaciji atoma vodonika od strane fenolnih struktura kada nastajaju manje reaktivni aroksi-radikali ($\text{ArOH} + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{ArO}\cdot + \text{HOH}$). Formirani aroksi-radikali su takođe dobri skevindžeri $\cdot\text{OH}$ radikala ($\text{ArO}\cdot + \cdot\text{OH} \rightarrow \text{HO-Ar(=O)}$), (Canadanovic-Brunet i sar., 2005).

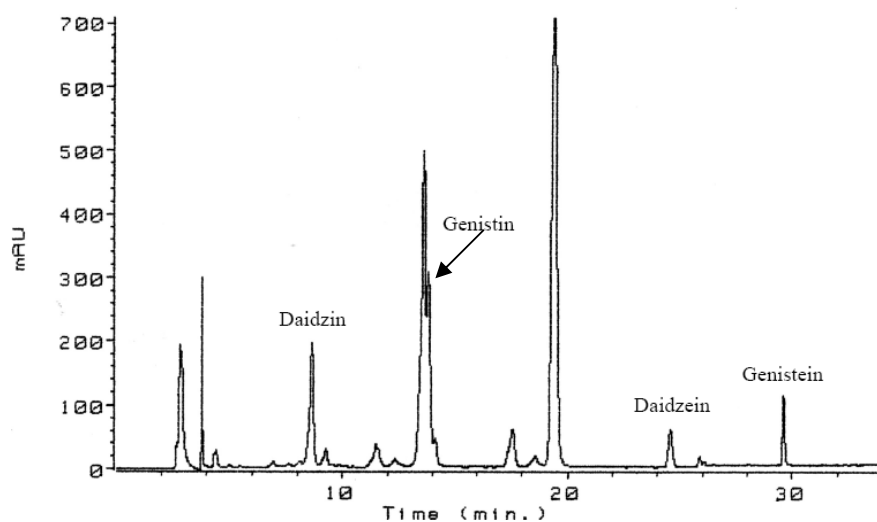
4.2.8. Uticaj srednjih doza γ -zračenja na sadržaj izoflavona genisteina i daidzeina i njihovih glikozida u semenu soje

Sadržaj izoflavona genisteina i daidzeina i njihovih glikozida genistina i daidzina određen je u semenu ozračene i neozračene soje pomoću HPLC analize. Hromatogrami uzoraka neozračene soje (kontrola) i ozračene soje (1, 2, 4 i 10 kGy) prikazani su na slikama 38-42.

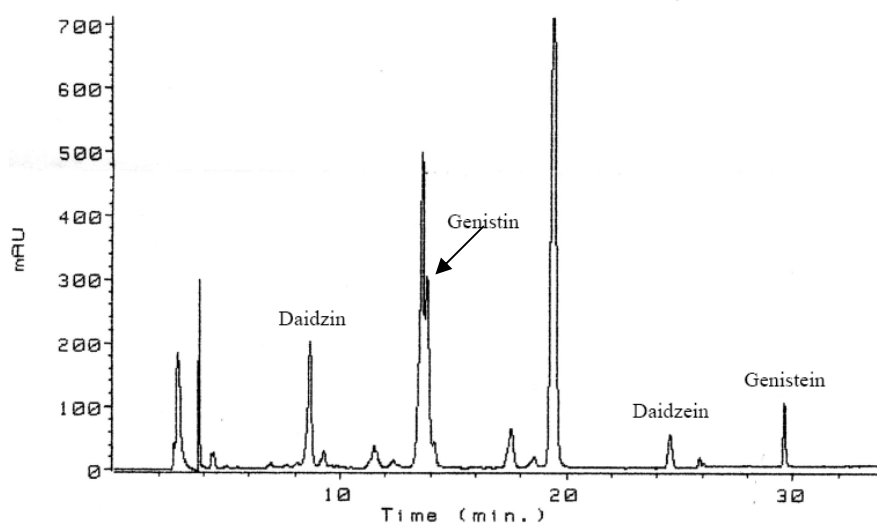
Na grafikonima 59. i 60. prikazani su rezultati ispitivanja uticaja srednjih doza γ -zračenja na sadržaj izoflavona (genisteina, daidzeina, genistina i daidzina) u semenu soje.



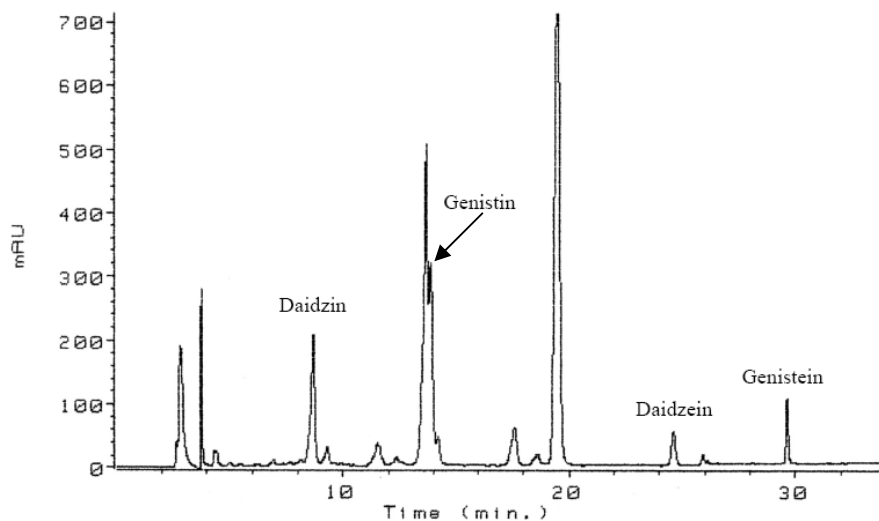
Slika 38. HPLC hromatogram semena neozračene soje (kontrola)



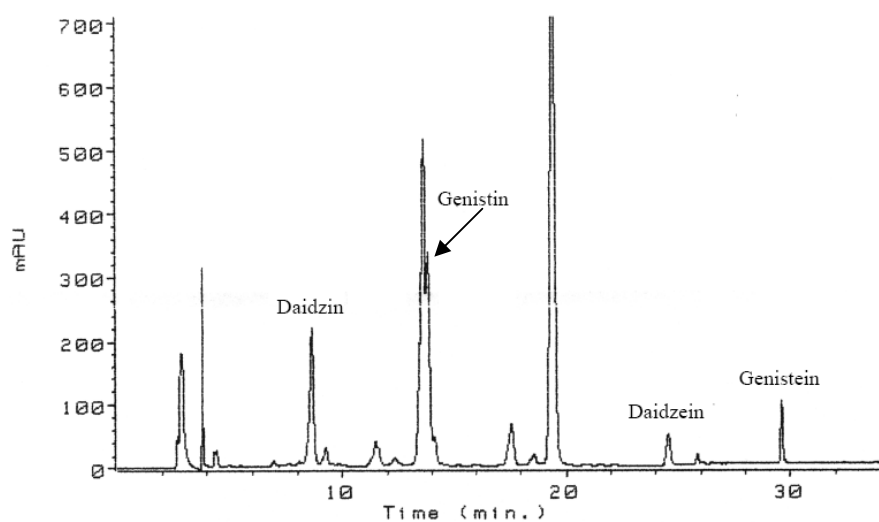
Slika 39. HPLC hromatogram semena soje ozračenog dozom od 1 kGy



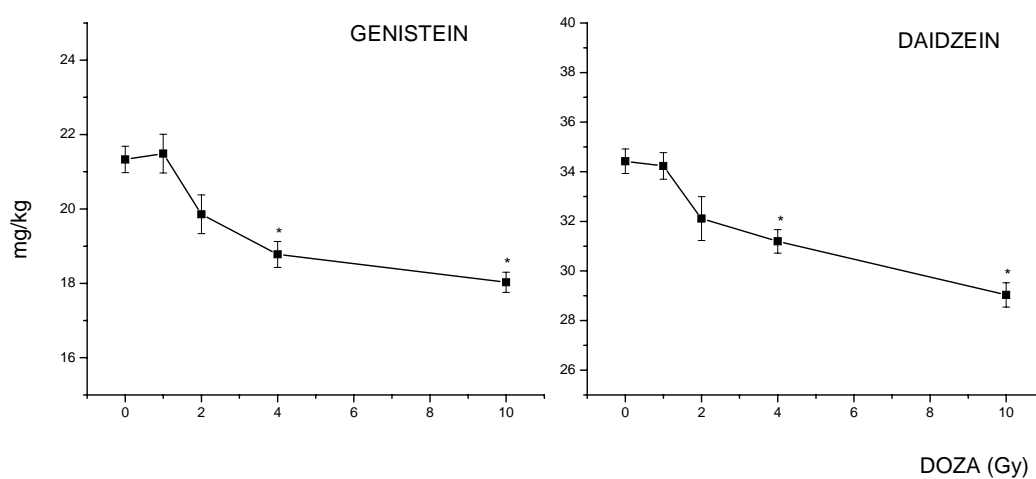
Slika 40. HPLC hromatogram semena soje ozračenog dozom od 2 kGy

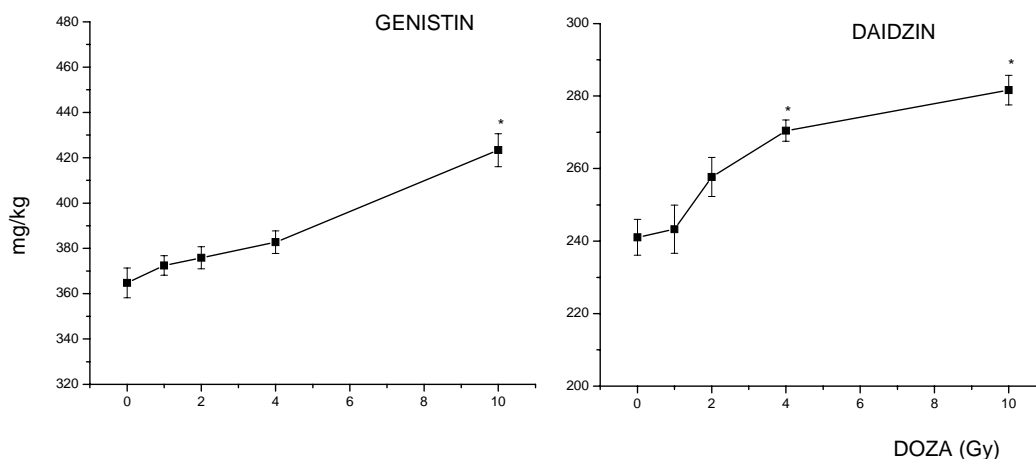


Slika 41. HPLC hromatogram semena soje ozračenog dozom od 4 kGy



Slika 42. HPLC hromatogram semena soje ozračenog dozom od 10 kGy

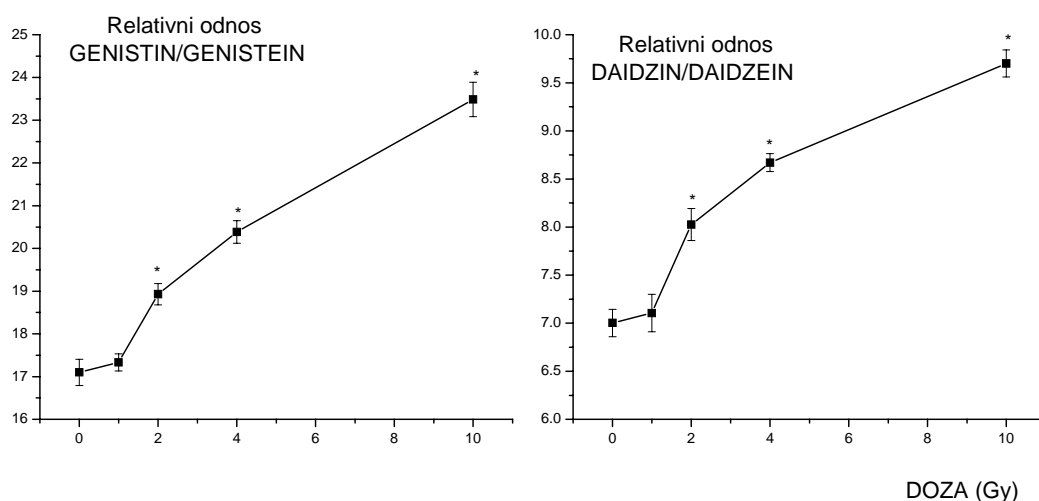
Grafikon 59. Uticaj srednjih doza γ -zračenja na sadržaj izoflavonskih aglikona genisteina i daidzeina u semenu soje



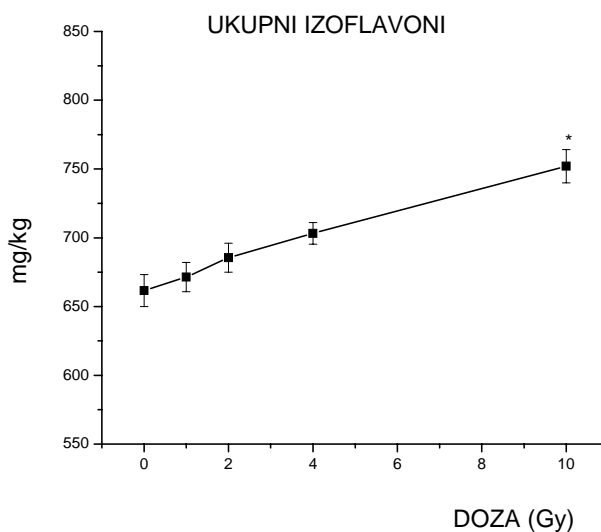
Grafikon 60. Uticaj srednjih doza γ -zračenja na sadržaj izoflavonskih glikozida genistina i daidzina u semenu soje

Sadržaj pojedinačnih izoflavona u kontroli je iznosio: 21,3 mg/kg genisteina, 34,4 mg/kg daidzeina, 364 mg/kg genistina i 241 mg/kg daidzina. Pod uticajem γ -zračenja sadržaj izoflavona se menjao u rasponu od 18,0-21,5 mg/kg (genistein), 29,0-34,2 mg/kg (daidzein), 372-423 mg/kg (genistin) i 243-281 mg/kg (daidzin). Na grafikonima 59. i 60. vidi se da sa povećanjem doze γ -zračenja dolazi do smanjenja sadržaja izoflavonskih aglikona i do povećanja odgovarajućih izoflavonskih glikozida. Pri dozi od 10 kGy uočeno je najveće smanjenje sadržaja genisteina (15,5%) i daidzeina (15,7%) i najveći porast sadržaja genistina (16,2%) i daidzina (16,6%).

Na grafikonima 61. i 62. prikazani su relativni odnosi odgovarajućih glikozida i njihovih aglikona kao i sadržaj ukupnih izoflavona (zbir aglikona i glikozida) u semenu ozračene i neozračene soje.



Grafikon 61. Uticaj srednjih doza γ -zračenja na relativni odnos glikozida i odgovarajućeg aglikona u semenu soje



Grafikon 62. Uticaj srednjih doza γ -zračenja na sadržaj ukupnih izoflavona (zbira aglikona i glikozida) u semenu soje

U neozračenju kontroli relativni odnos genistin/genistein iznosio je 17,1, a relativni odnos daidzin/daidzein iznosio je 7,00. Pod uticajem γ -zračenja, sa povećanjem doze oba relativna odnosa su se povećavala (Grafikon 61) Tako da se pri dozi od 10 kGy odnos genistin/genistein povećao za 37,4% u odnosu na kontrolu, a odnos daidzin/daidzein povećao za 38,6%.

Sadržaj ukupnih izoflavona (genisteina, daidzeina, genistina i daidzina) je u kontroli iznosio 661,5 mg/kg. U ozračenju soji je zabeležen porast sadržaja ukupnih izoflavona sa povećanjem doze zračenja. Najveći porast sadržaja ukupnih izoflavona i jedina značajna razlika uočena je pri dozi od 10 kGy i iznosila je 13,7% u odnosu na kontrolu.

Naši rezultati očigledno ukazuju da doze γ -zračenja do 10 kGy dovode do konverzije izoflavonskih aglikona u glikozide. Poznato je da ozračivanjem polisaharida dolazi do raskidanja glikozidnih veza i oslobađanja monosaharidnih rezidua, kao i do naknadnih reakcija oslobođenih monosaharidnih jedinica (Farkas, 2004). Uočeno je da jonizujuće zračenje izaziva oksidativnu degradaciju prostih šećera, glukoze i fruktoze, kada kao krajnji proizvod nastaje MDA slično kao i kod lipida (Fan, 2003). Poznat je takođe i mehanizam oksidativne degradacije dezoksiriboze koji započinje napadom hidroksil-radikala i uključuje niz slobodno-radikalnih intermedijera izvedenih iz dezoksiriboze (Cheesman, 1988). Zielonka i saradnici (2003) su utvrdili da je genistein moćan skevindžer hidroksil-radikala. Njegova antiradikalna aktivnost zasnovana je na reakciji jednoelektronske oksidacije kada gradi relativno stabilne fenoksi-radikale. Može se pretpostaviti da je povećanje glikozid/aglikon odnosa u ozračenju soji rezultat reakcije molekula (ili radikala) glukoze nastalih radiolitičkom razgradnjom polisaharida semena soje sa molekulima (ili radikalima) izoflavonskih aglikona kada nastaju glikozidi kao njihovi adukti.

Lee i saradnici (2005) su ispitivali antioksidantnu aktivnost izoflavonoida soje i njihovih glikozida. Utvrđeno je da svi izoflavoni soje poseduju DPPH antiradikalnu aktivnost i veliku antioksidantnu aktivnost određenu FRAP metodom. Najveću antioksidantnu aktivnost pokazao je genistin, a zatim daidzin i ostali izoflavoni koji se nisu puno razlikovali među sobom. S` obzirom na pomenuto, povećanje glikozid/aglikon odnosa kod ozračenju soje može se smatrati jednim od uzroka

povećanja DPPH skevindžer aktivnosti koje je utvrđeno kod ozračene soje što predstavlja pozitivnu nutritivnu implikaciju. Povećenje sadržaju ukupnih fenola i izoflavona u semenu ozračene soje doprinosi dodatnoj zaštiti semena od mikroorganizama i insekata (Variyar i sar., 2004).

5. ZAKLJUČAK

Upoređivanjem antioksidantnih statusa ozračenih i neozračenih genotipova soje može se zaključiti da je γ -zračenje, kojim je bilo izloženo seme, dovelo do stimulacije antioksidantnog sistema soje u različitim fazama razvoja kroz dve generacije, G1 i G2. Do značajne indukcije aktivnosti ispitivanih antioksidantnih parametara došlo je u sledećim slučajevima:

- aktivnost SOD povećavala se kod genotipa Venera u listu G1, kod genotipa Meli listu G1 i G2, kod genotipa Ana u poniku i kod genotipa Novosađanka u nakvašenom semenu i poniku;
- aktivnost CAT povećavala se kod genotipa Venera u nakvašenom semenu i poniku, kod genotipa Meli u listu G2 i kod genotipa Novosađanka u poniku;
- aktivnost GPx povećavala se kod genotipa Venera u nakvašenom semenu i listu G1, kod genotipa Ana u listu G1 i kod genotipa Novosađanka u nakvašenom semenu i listu G2;
- aktivnost GSH-Px povećavala se kod genotipa Venera u listu G1 i G2 i kod genotipa Meli u listu G2;
- količina GSH povećavala se kod genotipa Venera u nakvašenom semenu, poniku i listu G1, kod genotipa Meli u listu G1 i kod genotipa Novosađanka u listu G2;
- ukupna antioksidantna aktivnost određena FRAP metodom povećavala se kod genotipova Venera i Meli u svim fazama razvoja, kod genotipa Ana u poniku i kod genotipa Novosađanka u poniku i listu G1;
- DPPH skevindžer aktivnost povećavala se kod genotipova Venera i Meli u svim fazama razvoja i kod genotipa Ana u poniku;
- inhibicija NO povećavala se kod genotipova Venera, Ana i Novosađanka u poniku i kod genotipa Meli u listu G2.

Na osnovu uporedne analize uticaja γ -zračenja na antioksidantne sisteme različitih genotipova soje može se zaključiti sledeće:

- postoji uzročno-posledična veza između radijacionog stresa izazvanog delovanjem γ -zračenja, oksidativnog stresa i antioksidantnog odgovora biljke;
- promene aktivnosti pojedinih komponenti antioksidantnog sistema zavise od doze primenjenog zračenja, genotipa kao i od faze razvoja biljke;
- ni jedan od ispitivanih antioksidanata ne može se izdvojiti kao univerzalni indikator radijacionog stresa za sve genotipove i u svim fazama razvoja;
- u mehanizam antioksidantne zaštite podjednako su uključeni neenzimski antioksidanti kao i antioksidantni enzimi;
- u slučaju smanjenja aktivnosti neke komponente antioksidantnog sistema, ostale komponente preuzimaju ulogu u sistemu antioksidantne zaštite tako da se antioksidantni sistem ponaša kao neraskidiva celina čije su pojedine komponente povezane u svojoj aktivnosti;
- u slučajevima značajnog povećanja ukupne antioksidantne aktivnosti pojedine komponente antioksidantnog sistema deluju sinergistički;
- antioksidantni sistem je dinamički sistem u kome se aktivnosti pojedinih komponenti neprestano menjaju tokom razvoja i u zavisnosti od spoljnih uticaja;

- u nekim slučajevima je utvrđeno da se indukcija određene antioksidantne aktivnosti kao fenotipska karakteristika stečena u G1 generaciji (u listu) prenosi i u drugu, G2 generaciju;
- u većini slučajeva je utvrđeno da postoji razlika između efekata nižih doza (100 i 120 Gy) i većih doza (140 i 200 Gy) zračenja na aktivnost pojedinih antioksidanata.

Ovim je hipoteza postavljena u uvodnom delu disertacije da γ -zračenje utiče na antioksidantni sistem izazivajući indukciju aktivnosti pojedinih antioksidanata u potpunosti verifikovana. Naša istraživanja i rezultati do kojih smo došli ukazuju da su genotipovi soje razvijeni iz ozračenog semena stimulirani da sintetizuju različite vrste enzimskih i neenzimskih antioksidanata. Naša dalja istraživanja će biti usmerena ka detaljnijem analitičkom ispitivanju antioksidanata za koje smo pokazali da se pojačano sintetizuju u ozračenju soji. Ovakva ispitivanja bi mogla voditi i ka identifikaciji novih antioksidantnih jedinjenja kao, na primer, fenolnih struktura ili izoformi antioksidantnih enzima nastalih radijacionom stimulacijom. Ozračivanje semena niskim dozama γ -zračenja mogla bi postati metoda od većeg tehnološkog značaja, naročito ako se dokaže da vodi ka dobijanju strukturno novih jedinjenja sa mogućnošću primene.

Na osnovu uporedne analize uticaja γ -zračenja na parametre oksidativnog stresa kod različitih genotipova soje tokom razvoja može se zaključiti sledeće:

- kod genotipova Venera i Ana utvrđeno je da dolazi do povećanja intenziteta lipidne peroksidacije i količine hidroksil-radikala u svim fazama razvoja a najviše u listu G1 pa se može zaključiti da su u ovoj fazi razvoja ispitivani genotipovi soje bili najosetljiviji na delovanje oksidativnog i radijacionog stresa;
- kod genotipova Meli i Novosađanka intenzitet LP i količina hidroksil-radikala se nisu menjali u značajnoj meri ili su se smanjivali tokom razvoja.

Na osnovu LP kao kriterijuma (biomarkera) osetljivosti na radijacioni i oksidativni stres ispitivani genotipovi se mogu svrstati u dve grupe:

- radiosenzitivni genotipovi Venera i Ana za koje je utvrđena izražena osetljivost na oksidativni i radijacioni stres i
- radiorezistentni genotipovi Meli i Novosađanka za koje je utvrđena otpornost na delovanje oksidativnog i radijacionog stresa.

Ovim je takođe ostvaren jedan od ciljeva postavljenih u uvodnom delu disertacije, da se izdvoji parametar koji bi sa visokom verovatnoćom ukazivao na osetljivost i rezistentnost soje na delovanje γ -zračenja.

Rezultati ESR spektroskopije su potvrdili da su genotipovi Ana i Venera osetljiviji na radijacioni i oksidativni stres od genotipova Meli i Novosađanka. Relativni intenziteti ESR signala DMPO-OH spin-addukata u prisustvu fosfatno-puferskih ekstrakata lista G1 generacije ozračenju soje povećali su se u odnosu na kontrolu za 62,3% kod genotipa Venera i za 84,0% kod genotipa Ana.

Utvrđeno je takođe da indukcija antioksidantnog sistema nije jedini uzrok pojave rezistencije na radijacioni stres. Može se pretpostaviti da važnu ulogu u

razvoju rezistencije genotipova Meli i Novosađanka na radijacioni stres ima i sistem za reparaciju DNK, što će biti predmet daljeg istraživanja.

Ispitivanjem uticaja srednjih doza γ -zračenja na parametre oksidativnog stresa i neke antioksidantne parametre u semenu soje može se zaključiti sledeće:

- srednje doze γ -zračenja ne izazivaju signifikantne promene intenziteta LP i sadržaja rastvorljivih proteina;
- količina karbonil-grupa u oksidativno modifikovanim proteinima se u značajnoj meri smanjila pri dozi od 10 kGy;
- sve primenjene doze γ -zračenja dovele su do povećanja sadržaja ukupnih fenola taninske grupe;
- ukupna antioksidantna aktivnost određena FRAP-metodom se značajno povećala jedino pri dozi od 1 kGy dok se DPPH skevindžer aktivnost povećavala sa povećanjem doze γ -zračenja;
- povećanje skevindžer aktivnosti etil-acetatnih ekstrakata semena ozračene (10 kGy) soje u odnosu na neozračenu kontrolu utvrđeno je i ESR metodom;
- gama zračenje dovodi do konverzije izoflavonskih aglikona u glikozide. Sadržaj ukupnih izoflavona (zbir aglikona i glikozida) se u maloj meri povećavao sa povećanjem doze γ -zračenja.

Naši rezultati ukazuju da srednje doze γ -zračenja poseduju izvesno „antioksidantno dejstvo“ koje se manifestuje povećanjem DPPH skevindžer aktivnosti i smanjenjem intenziteta oksidacije proteina. Nije utvrđena ni jedna negativna posledica na ispitivane nutritivne karakteristike semena soje. Time je potvrđena bezbednost ozračivanja semena soje srednjim dozama γ -zračenja.

Kako bi se objasnio antioksidantni efekat srednjih doza γ -zračenja planiramo detaljnije analitičko ispitivanje fenolnih struktura koje su nastale u semenu ozračene soje. Jedan od naših ciljeva u daljem radu biće i ispitivanje estrogenog i antikancerogenog delovanja ekstrakata semena ozračene soje s` obzirom da je utvrđen uticaj srednjih doza γ -zračenja na relativni odnos izoflavonskih glikozida i aglikona u semenu.

6. CONCLUSION

By comparing antioxidant statuses of irradiated and nonirradiated soy genotypes, it can be concluded that γ -radiation of soybean seed produces stimulation of antioxidant system in different phases of development through two generations, G1 and G2. Significant induction of investigated antioxidant activity parameters was observed in next cases:

- SOD activity increased in leaf G1 of genotype Venera, in leaf G1 and G2 of genotype Meli, in seedling of genotype Ana, and in moistured seed and seedling of genotype Novosađanka;
- CAT activity increased in moistured seed and seedling of genotype Venera, in leaf G2 of genotype Meli and in seedling of genotype Novosađanka;
- GPx activity increased in moistured seed and leaf G1 of genotype Venera, in leaf G1 of genotype Ana and in moistured seed and leaf G2 of genotype Novosađanka;
- GSH-Px activity increased in leaf G1 and G2 of genotype Venera and in leaf G2 of genotype Meli;
- glutathione quantity increased in moistured seed, seedling and leaf G1 of genotype Venera, in leaf G1 of genotype Meli and in leaf G2 of genotype Novosađanka;
- total antioxidant activity determined by FRAP method increased in all phases of development of genotypes Venera and Meli, in seedling of genotype Ana and in seedling and leaf G1 of genotype Novosađanka;
- DPPH scavenger activity increased in all phases of development of genotypes Venera and Meli, and in seedling of genotype Ana;
- NO inhibition increased in seedling of genotypes Venera, Ana and Novosađanka and in leaf G2 of genotype Meli.

Summarizing the results obtained through comparison of the influence of γ -radiation on antioxidant systems of different soybean genotypes, it can be concluded:

- there is a causal-sequent link between radiation stress provoked by γ -radiation, oxidative stress and antioxidant response of the plant;
- changes of the activity of different components of the antioxidant system depend on γ -radiation dose, genotype and stage of the development of soy;
- none of the investigated antioxidants can be separated as a universal indicator of the radiation stress for all antioxidants in all stages of development;
- nonenzymatic and enzymatic antioxidants are equally included in the mechanism of antioxidant defence;
- when some of the antioxidant activity decreases, other components of antioxidant system undertake the role in the system of antioxidant defence, so antioxidant system represents the inseparable unit whose some parts are bound in their activity;
- in the cases of significant increase of total antioxidant activity, there are synergistic effects between some antioxidant components in the system;

- antioxidant system acts as a dynamic system in which the activity of different components are permanently changed through the development and depending on environmental factors;
- in some cases, it was established that induction of some antioxidant activity as a phenotype characteristic acquired in G1 generation transfers into second, G2 generation;
- in majority cases, it was established that there exists the difference between the effects of low doses (100 and 120 Gy) and higher doses (140 and 200 Gy) of radiation on different antioxidant activities.

This completely verified the hypothesis mentioned in the introduction that γ -radiation influence on antioxidant system provoked the induction of specific antioxidant activities. Our research and results show that soy genotypes developed from irradiated seeds are stimulated to synthesise different enzymatic and nonenzymatic antioxidants. Our further investigations will be focused on the detailed analytical investigation of antioxidants whose production is stimulated in irradiated soybean. Kind of research as this one could lead to identification of new antioxidant compounds, such as phenol structures or isoforms of antioxidant enzymes produced by radiation stimulation. Irradiation of soybean seed with low level doses of γ -radiation may become a method with a higher technological importance, especially if it is proved that it leads to structurally new compounds with a possibility of application.

By a comparative analysis of the influence of γ -radiation on oxidative stress parameters of different soybean genotypes during the development, it can be established:

- lipid peroxidation and hydroxyl radical quantity increased in all stages of development of genotypes Venera and Ana, especially in leaf G1, so it can be concluded that the investigated genotypes were the most sensitive on oxidative and radiation stress in this stage of development;
- lipid peroxidation and hydroxyl radical quantity didn't significantly change or decrease through development of genotypes Meli and Novosađanka.

On the basis of lipid peroxidation as a criterion (biomarker) of sensitivity on radiation and oxidative stress, investigated genotypes can be classified into the two groups:

- radiosensitive genotypes Venera and Ana which showed sensitivity on oxidative and radiation stress and
- radioresistant genotypes Meli and Novosađanka which showed resistance on oxidative and radiation stress.

With this we also realised one of the aims which were mentioned in the introduction of the dissertation, to separate the parameter which would point out sensitivity and resistance of soy on the influence of γ -radiation with high probability.

Results of ESR spectroscopy confirmed that genotypes Ana and Venera were more sensitive on radiation and oxidative stress than genotypes Meli and Novosađanka. Relative intensities of ESR signals of DMPO-OH spin adducts

increased by 62,3% for genotype Venera and 84,0% for genotype Ana in the presence of irradiated soybean extracts.

We also concluded that the induction of antioxidant system is not the only cause of appearance of resistance on radiation stress. It can be hypothesized that the system for reparation DNA could play the important role. This will be the subject for our further investigation.

Investigating the influence of middle doses of γ -radiation on oxidative stress parameters and some antioxidant parameters in soybean seed, it can be concluded:

- middle doses of γ -radiation did not provoke significant changes in LP intensity and soluble protein content;
- carbonil-group quantity in oxidatively modified proteins significantly decreased by dose of 10 kGy;
- all applied doses of γ -radiation caused the increase in total phenol content of tannin group;
- total antioxidant activity determined by FRAP method significantly increased only by dose of 1 kGy, but DPPH scavenger activity increased with increase of γ -radiation dose;
- ESR investigation showed that scavenger activity of ethyl-acetate extract of irradiated soybean (10 kGy) was higher than nonirradiated control;
- gamma radiation causes the conversion of isoflavone aglycones into the glycosides. Total isoflavone content (sum of aglycones and glycosides) slightly increased with dose of γ -radiation.

Our results indicated that the middle doses of γ -radiation possess certain „antioxidant activity“ which is manifested with the increase in DPPH scavenger activity and decrease in oxidation protein intensity. We did not establish any negative implication on investigated nutritive characteristics of soybean seed. This confirmed the safety of irradiation of soybean with middle doses of γ -radiation.

We are planning a detailed analytical investigation of phenol structures which were produced in irradiated soybean seed in order to explain the antioxidant effect of the middle doses of γ -radiation. One of our future intentions will also be to investigate estrogenic and anticancerogenic effect of the irradiated soybean extracts because it was already established that middle doses of γ -radiation influence the relative ratio of isoflavone glycosides and aglycones in soybean seed.

7. LITERATURA

1. Almansa, M. S., Del Rio, L. A., Sevilla, F., Characterization of an iron-containing superoxide dismutase from higher plant, *Citrus limonum*. *Physiol. Plant.* **90** (1994), 339-347.
2. Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L., S., Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants, *J. Exp. Bot.*, **53** (2002), 1331-1341.
3. Ambasht, N.K., Agrawal, M., Physiological and biochemical responses of *Sorghum vulgare* plants to supplemental ultraviolet-B radiation, *Can. J. Bot.* **76** (1998), 1290-1294.
4. Angel, P., Poting, A., Mallick, U., Rahmsdorf, H.J., Schorpp, M., Herrlich, P., Induction of metal-lothionein and other mRNA species by carcinogens and tumor promoters in primary human skin fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* **6** (1986), 1760-1766.
5. Arjmandi, B.H., Alekel, L., Hollis, B.W., Amin, D., Stacewicz-Sapuntzakis, M., Guo, P., Kukreja, S.C., Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis, *J. Nutr.*, **126** (1996), 161-167.
6. Auclair, C., Voisin, E., Nitroblue tetrasolium reduction, In: *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* (Ed. Greenwald R.A.), New York (1985), 123-132.
7. Baxter-Burrell, A., Yang, Z., Springer, P.S., Bailey-Serres, J., RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of *Arabidopsis* oxygen deprivation tolerance, *Science* **296** (2002), 2026-2028.
8. Beak, M., Kim, J.H., Chung, B., Kim, J.S., Lee, I., Alleviation of salt stress by low dose γ -irradiation in rice, *Biol. Plant.* **49** (2), (2005), 273-276.
9. Beligni, M.V., Lamattina, L., Is nitric oxide toxic or protective? *Trends Plant Sci.* **4** (1999), 299.
10. Benzie, I.F.F., Strain, J.J., Ferric reducing antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration, *Methods Enzymol.* **299** (1999), 15-27.
11. Berghofer, E., Grzeskowiak, B., Mundigler, N., Sentall, W.B., Walack, J., Antioxidative properties of faba bean, soybean and oat tempeh, *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **49** (1998), 45-54.
12. Berlett, B.S., Stadtman, E.R., Protein Oxidation in Aging, Disease and Oxidative stress, *J. Biol. Chem.* **272** (1997), 20313-20316.
13. Bernhard, W.A., Close, D.M., DNA Damage Dictates the Biological Consequences of Ionizing Irradiation: The Chemical Pathways, In: *Charged Particle and Photon Interactions with Matter*, (Eds. Mozumder, A., Hatano, Y.), Marcel Dekker, New York, 2004.
14. Bielski, B.H.J., Preparation of aqueous superoxide solutions at alkaline pH by high-energy ionizing radiation, In: *CRC Handbook of Methods for Oxygen Radical Research* (Ed. Greenwald, R.A.), Boca Raton, Florida (1985), 277-280.
15. Bieza, K., Lois, R., An *Arabidopsis* mutant tolerant to lethal ultraviolet-B levels shows constitutively elevated accumulation of flavonoids and other phenolics, *Plant Physiol.* **126** (2001), 1105-1115.
16. Blakely, E.A. Cell inactivation by heavy-charged particles. *Radiat. and Environ. Biophys.* **31** (1992), 181-196.

16. Bolwell, G.P., Bindschedler, L.V., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.R., Gerrish, C., Minibayeva, F., The apoplastic oxidative burst response to biotic stress in plants: a three component system. *J. Exp. Bot.* **53** (2002), 1367-1376.
17. Božović, I, Škodljivi sastojci u zrnavlju sirove soje i načini njihove eliminacije, Doktorska disertacija, Sarajevo, 1988.
18. Breslavets, L.B., Plants and X-rays, Acid Sci USSR Press, Moscow, 1946, (Translation American Institute of Biological Sciences 1960).
19. Breusegem, F.V., Vranova, E., Dat, J.F., Inze, D., The role of active oxygen species in plant signal transduction, *Plant science* **161** (2001), 405-414.
20. Buxton, G.V., The Radiation Chemistry of Liquid Water: Principles and Applications, In: *Charged Particle and Photon Interactions with Matter*, (Eds. Mozumder, A., Hatano, Y.), Marcel Dekker, New York, 2004.
21. Byun, M., Kang, I., Mori, T., Effect of γ -irradiation on the water soluble components of soybeans, *Radiat. Phys. Chem.* **47** (1996), 155-160.
22. Byun, M.W., Kang, I.J., Kwon, J.H., Hayashi, Y., Mori, T., Physicochemical properties of soybean oil extracted from γ -irradiated soybeans, *Radiat. Phys. Chem.* **46** (1995), 659-662.
23. Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., Hormesis as a Biological Hypothesis, *Environmental Health Perspectives Supplements* **106** (1998), 357-362.
24. Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., Hormesis: A Generalizable and Unifying Hypothesis, *Critical Reviews in Toxicology* **31** (2001), 353-424.
25. Calabrese, E.J., Paradigm lost, paradigm found: The re-emergence of hormesis as a fundamental dose response model in toxicological sciences, *Environmental Pollution* **138** (2005), 379-412.
26. Carbonaro, M, Virgili, F., Carnovale, E., Evidence for Protein-Tannin Interactions in Legumes: Implications in the Antioxidant Properties of Faba Bean Tannins, *Lebensm. -Wiss. u. - Technol.* **29** (1996), 743-750.
27. Cassidy, A., Bingham, S., Setcheel, K.D.R., Biological effect of a diet of soy protein rich in isoflavones on the cycle of premenopausal women, *Amer. J. Clin. Nutr.* **60** (1994), 333-340.
28. Chasseaud, L.F. The role of glutathione and glutathione-S-transferase in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents, *Adv. Cancer Res.* **29** (1979), 175-274.
29. Cheesman, K. H., Beavis, A., Esterbauer, H., Hydroxyl-radical-induced iron-catalysed degradation of 2-deoxyribose, *Biochem. J.* **252** (1988), 649-653.
30. Cheftel, J.C., Cuq, J.L., Lorient, D., Amino acids, peptides and proteins. In: *Food Chemistry* (Ed. Fennema, O.R.), Marcel Dekker, New York (1985) 279-343.
31. Chen, Z., Silva, H., Klessig, D.F., Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid, *Science* **262** (1993), 1883.
32. Choi, J.S., Kwon, T.W., Kim, J.S., Isoflavone contents in some varieties of soybean, *Foods Biotechnol.* **5** (1996), 167-169.
33. Chow, C.K., Drapper, H.H, Oxidative stability and antioxidant activity of the tocopherols in corn and soybean oils, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **44** (1974), 396-403.
34. Cooper, B., Creeth, J.M., Donald, A.S.R., Studies of the limited degradation of mucus glycoproteins. The mechanism of the peroxide reaction. *Biochem. J.* **228** (1985), 615-626.

35. Cosgrove, D.J., Physiology of inositol phosphates, In: *Inositol Phosphates. Their Chemistry, Biochemistry and Physiology* (Eds. Cosgrove, D.J., Irving, G.C.J.), Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam (1980), 139-156.
36. Coward, L., Barnes, N.C., Setcheel, K.D.R., Barnes, S. Genistein, daidzein and their β -glucoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods of America and Asian diets, *J. Agric. Food Chem.* **41** (1993), 1961-1967.
37. Croci, C.A., Argüello, N.R., Curvetto, N.R., Orioli, G.A., Changes in peroxidase associated with radiation-induced sprout inhibition in garlic (*Allium sativum* L.), *Int. J. Radiat. Biol.* **59** (1991), 551-557.
38. Čanadanovic-Brunet, J.M., Djilas, S.M., Cetkovic, G.S., Tumbas, V.T., Free radical scavenging activity of wormwood (*Artemisia absinthium* L) extracts, *J. Sci. Food Agric.* **85** (2005), 265-272.
39. Čanadanović-Brunet, Jasna, Kiseonikovi slobodni radikali i prirodni antioksidanti, Zadužbina Andrejević, Beograd, 1998.
40. Dadayli, D., Sunnetcioglu, M.M., Koksel, H., Celik, S., Detection of irradiated wheat using the electron paramagnetic resonance. *Cereal Chem.* **74** (1997), 375-378.
41. Dat, J., Van Breusegem, F., Vandenamele, S., Vranova, E., Van Montagu, M., Inze, D., Active oxygen species and catalase during plant stress responses, *Cell. Mol. Life Sci.* **57**, 779.
42. Del Rio, A.L., Corpas, F.J., Barroso, J.B., Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants, *Phytochemistry* **65** (2004), 783-792.
43. Delaunau, A., Isnard, A.D., Toledano, M.B., H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap 1 transcription factor, *EMBO J* **19** (2000), 5157-5166.
44. Delledone, NO news is good news for plants, *Current Opinion in Plant Biology* **8** (2005), 390-396.
45. Demirevska-Kepova, K., Bakardijeva, N., Pencheva, N., Molecular and physiological aspects of plant peroxidase, (Eds. Greppin, H., Penel, C., Gasper, Th.), Universite de Genove (1986), 105.
46. Dhindsa, R.S., Plump-Dhindsa, P., Thorpe, T.A., Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation and decreased levels of superoxide dismutase and catalase, *J. Exp. Bot.* **32** (1981), 93-101.
47. Dīaa El-Dīn M., Farag, H., The nutritive value for chicks of full-fat soybeans irradiated at up to 60 kGy, *Animal Feed Science and Technology* **73** (1998), 319-328.
48. Diehl, J.F., Safety of Irradiated Foods, 2nd Ed., Marcel Dekker, New York, 1995.
49. Dixon, R.A., Ferreira, D., Molecules of Interest Genistein, *Phytochemistry* **60** (2002), 205-211.
50. Durner, J., Klessig, D. F., Nitric oxide as a signal in plants, *Curr. Opin. Plant. Biol.* **2** (1999), 369-374.
51. Đorđević, V.B., Pavlović, D.D., Kocić, G.M., Biohemija slobodnih radikala, Niš, 2000.
52. Ebel, J., Grisebach, H., Defence strategies of soybean against the fungus *Phytophthora megasperma f. sp. glycinea*: a molecular analysis, *Trends Biochem. Sci.*, **13** (1988), 23-27.
53. Eldridge, A.C., Kwolek, W.F., Soybean isoflavones: effect of environment and variety on composition, *J. Agric. Food Chem.*, **31** (1983), 394-396.

54. Elstner, E.F., Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells In: *Active oxygen/oxidative stress and plant metabolism*. (Eds. Pell, E.J., and Steffen, K.L.), American Soc. Plant. Physiol. Rockville. (1991), 13-25.
55. Elstner, F. E., Schemp, H., Preibisch, G., Hippeli, S., Osswald, W., Biological sources of free radicals. In: *Free radicals in the environment, medicine and toxicology* (Eds. H. Nohl, H. Esterbauer, C. Rice-Evans), Richelieu Press, London, UK, (1994), 13-45.
56. Fan, X., Antioxidant capacity of fresh-cut vegetables exposed to ionizing radiation, *J. Sci. Food Agric.* **85** (2005), 995-1000.
57. Fan, X., Ionizing Radiation Induces Formation of Malondialdehyde, Formaldehyde And Acetaldehyde From Carbohydrates, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003), 5946-5949.
58. Fan, X., Thayer, D.W., Sokorai, K.J.B., Changes in Growth and Antioxidant Status of Alfalfa Sprouts during Sprouting as Affected by Gamma Irradiation of Seeds, *Journal of Food Protection* **67** (2004), 561-566.
59. Fan, X., Thayer, D.W., γ -Radiation Influences Browning, Antioxidant Activity and Malondialdehyde Level of Apple Juice, *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002), 710-715.
60. Farkas, J., Food Irradiation, In: *Charged Particle and Photon Interactions with Matter* (Eds. MozmdrA., Hatano, Y.), Marcel Dekker, New York, 2004.
61. Ferrat, L., Pergent-Martini, C., Romeo, M., Assessment of the use of biomarkers in aquatic plants for the evaluation of environmental quality: application to seagrasses, *Aquatic Toxicology* **65** (2003), 187-204.
62. Ferrer, M. A., Ros Barcelo, A., Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H₂O₂ production by the xylen of *Zinnia elegans*, *Plant, Cell and Environment* **22** (1999), 891-897.
63. Fukuzawa, K., Seko, T., Minami, K., Terao, J., Dynamics of iron-ascorbate induced lipid peroxidation in charged and uncharged phospholipid vesicles, *Lipids* **28** (1993), 497-503.
64. GAO (General Accounting Office), Report to Congressional Requesters, Food Irradiation, Washington, 2000.
65. Gao, G., Tian, B., Liu, L., Sheng, D., Shen, B., Hua, Y., Expression of *Deinococcus radiodurans* PprI enhances the radioresistance of *Escherichia coli*, *DNA repair* **2** (2003), 1419-1428.
66. Gardner, W.H., Decomposition of linoleic acid hydroperoxides enzymatic reactions compared with nonenzymic, *J. Agric. Food Chem.* **23** (1975), 129-136.
67. Goodhead, D.T., "Radiation effects in living cells," *Can. J. Phys.* **68** (1990), 872-886.
68. Gorlanov, N.A., Kokorev, Y.M., Influence of gamma irradiation of seeds on the ultra weak chemiluminescence and antioxidant activity of wheat, corn and buckwheat seedlings. *Radiobiology* **13** (1973), 201-205.
69. Goth, H., Oxygen Free Radicals and the Tissue Injuru, (Ed. Matkovic, B., Boda, D., Kalasz, H.), Akademiai Kiado, Budapest (1988), 111.
70. Graf, E., Eaton, J.W, Antioxidant functions of phytic acid, *Free Radical Biol. Med.*, **8** (1990), 61-69.
71. Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., Jiang, Y., Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay, *Nutrition Research* **23** (2003), 1719-1726.
72. Guo, C.J., Cao, G.H., Sofic, E., Prior, R.L., High performance liquid chromatography coupled with coulometric array detection of electroactive

components in fruits and vegetables: relationship to oxygen radical absorbance capacity. *J. Agric Food Chem.* **45** (1997), 1787-1796.

73. Halliwell B., Gutteridge, J.M.C., Free radicals in Biology and Medicine, Science Publications, Oxford, 1989.

74. Halliwell, B., Structure, function and isolation of chloroplasts. In: *Chloroplast Metabolism* (Ed. Halliwell, B.), Clarendon Press, Oxford, 1984.

75. Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. D. G., Resistance gene-dependent plant defense responses, *Plant Cell* **8** (1996), 1773-1791.

76. Harborn, J.B., Dey, P.M., Plant Biochemistry, Academic Press, London, 1997.

77. Harper, D.B., Harvey, B.M.R., Mechanism of paraquat tolerance in perennial ryegrass. II. Role of superoxide dismutase, catalase and peroxidase, *Plant Cell Environ.* **1** (1978), 211.

78. Hartl, P.M., Tan-Wilson, A.L., Wilson, K.A., Proteolysis of Kunitz trypsin inhibitor during germination. *Phytochemistry* **26** (1986), 23-26.

79. Hayashi, K., Noguchi, N., Niki, E., Action of nitric oxide as an antioxidant against oxidation of soybean phosphatidylcholine liposomal membranes, *FEBS Letters* **370** (1995), 37-40.

80. Hildebrand, F.D., Lipoxygenases, *Physiologia Plantarum* **76** (1989), 249-253.

81. Ho, H.M., Chan, R.Y., Leung, K. L., Chan, F.L., Huang, Y., Chen, Z., Difference in flavonoid and isoflavone profile between soybean and soy leaf, *Biomed. Pharmacother.* **56** (2002), 289-295.

82. Holland, D., Faltin, Z., Perl, A., Ben-Hayyim, G., Eshdat, Y., A novel plant glutathione peroxidase-like protein provides tolerance to oxygen radicals generated by paraquat in *Escherichia coli*, *FEBS Letters*, **337** (1994), 52-55.

83. Hopia, A., Heinonen, M. Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate, *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **76** (1999), 139-144.

84. Hrustić, M., Vidić, M., Jocković, Đ., *Soja*, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Novi Sad, 1998.

85. Huang, Y., Hua, Y., Qui, A., Soybean protein aggregation induced by lipoxygenase catalyzed linoleic acid oxidation, *Food Research International* **39** (2006), 240-249.

86. Huie, R.E., Padmaja, S., The reaction of NO with superoxide, *Free radical research communications* **18** (1993), 195-199.

87. Jones, P., Catalases and ironporphyrin model systems: Roles of the coordination environment of iron catalytic mechanism, *The Biological Chemistry of Iron*, (1982), 427.

88. Josimović, Lj., Tretiranje hrane i prehrambenih proizvoda zračenjem (*Radijacione tehnologije-status i perspektive*), I Jugoslovenski seminar o radijacionim tehnologijama, Institut za nuklearne nauke-Vinča, Beograd, 1990.

89. Jovanović Aleksandra, Uticaj selena na antioksidantni sistem eritrocita i jetre šarana (*Cyprinus carpio* L.), Magistarska teza, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, 1993.

90. Jovanović, S.V., Clements, D., MacLeod, K., Biomarkers of oxidative stress are significantly elevated in Down syndrome, *Free Rad. Biol. Med.* **25** (1998), 1044-1048.

91. Kanazawa, K., Yamashita, T., Ashida, H., Danno, G. Antimutagenicity of flavones and flavonols to heterocyclic amines by specific and strong inhibition of the cytochrome P450 1A family. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62** (1998), 970-977.

92. Korystov YN., Narimanov, AA., Low doses of ionizing radiation and hydrogen peroxidase stimulate plant growth. *Biologia* (Bratislava), **52** (1997), 121-124.
93. Kudou, S., Shimoyamada, M., Imura, T., Uchida, T., Okubo, K., A new isoflavone glycoside in soybean seeds (*Glycine max* Merrill), glycitein 7-O- β -D-(6"-O-acetyl)-glucopyranoside, *Agr. Biol. Chem.* **55** (1991), 559-560.
94. Kumagai, J., Katoh, H., Miyazaki, T., Hidema, J., Kumagai, T., Differences in the sensitivity to UVB radiation of two cultivars of rice (*Oryza sativa* L.) based on observation of long-lived radicals. *J. Radiat. Res.* **40** (1999), 303.
95. Kumagai, J., Katoh, H., Kumada, T., Tanaka, A., Tano, S., Miyazaki, T., Strong resistance of *Arabidopsis thaliana* and *Raphanus sativus* seeds for ionizing radiation as studied by ESR, ENDOR, ESE spectroscopy and germination measurement: Effect of long-lived and super-long-lived radicals, *Radiat. Phys. Chem.* **57** (2000), 75-83.
96. Kwak, S.S., Kim, S.K., Park, I.H., Jang, R.L., Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato, *Phytochemistry*, **43** (1996), 565-568.
97. Laloi, C., Apel, K., Danon, A., Reactive oxygen signalling: the latest news, *Curr. Opin. Plant Biol.* **7** (2004), 323-328.
98. Lamoureaux G.L., Rusness, D.G., Catabolism of glutathione conjugates of pesticides in higher plants, In: *Sulfur in Pesticide Action and Metabolism* (Eds. Rosen, J.D., Magee, P.S., Casica, J.E.), ACS Symp. Ser. 158, American Chemical Society, Washington, D.C., 1981.
99. Larson, R. A., The antioxidants of higher plants, *Phytochemistry* **27** (1988), 969-978.
100. LaVere, T., Becker, D., Sevilla, M.D., Yields of OH in gamma-irradiated DNA as a function of DNA hydration: Hole transfer in competition with OH formation. *Radiat. Res.* **145** (1996), 673-680.
101. Lee, C.H., Yang, L., Xu, J.Z., Yeung, S.Y.V., Huang, Y., Chen, Z.Y., Relative antioxidant activity of soybean isoflavones and their glycosides, *Food Chemistry* **90** (2005), 735-741.
102. Lee, E.J., Volkov, V.I., Byun, M.W., Lee, C.H., Detection of free radicals in gamma-irradiated soybean paste and model system by electron spin resonance spectroscopy, *Radiat. Phys. Chem.* **64** (2002), 61-66.
103. Leshem, Y. Y., Nitric oxide in biological systems, *Plant Growth Regulation* **18** (1996), 155-169.
104. Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins, *Methods in Enzymology* **186** (1990), 464-478.
105. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Rondall, R.J., Protein measurement with folin-phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193** (1951), 265-275.
106. Luckey, T.D., Radiation Hormesis Overview, *RSO Magazine* **8** (2003), 22-40.
- Luckey, T.D., Radiation hormesis, CRC Press Inc., US, 1991.
107. Lyons, T.J., Jenkins, A.J., Lipoprotein glycation and its metabolic consequences. *Curr. Opin. Lipidol.* **8** (1997), 174-180.
108. Lytle, J.S., Lytle, T.F., Atrazine effects on Estuarine Macrophytes *Spartina-Alterniflora* and *Juncus-Roemerianus*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **17** (1998), 1972-1978.

109. Macklis, R.M., Bresford, B., Radiation hormesis, *J. Nucl. Med.* **32** (1991), 350-359.
110. Makkar, H.P.S., Bluemmel, M., Borowy, N.K., Becker, K. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods, *J. Sci. Food Agric.* **61** (1993), 161-165.
111. Malenčić, Đ., Popović, M., Miladinović, J., Stress tolerance parameters in different genotypes of soybean, *Biol. Plant.* **46** (2003), 141-143.
112. Marinković, B., Grigorev, V.S., Slavić, R., Aleksandrovna, T.Č., Grujić, M., Milošević, M., Orbović, B., Konstantinović, B., Primena metode rezonantno impulsne elektromagnetne stimulacije u biljnoj proizvodnji, Zbornik radova Naučnog instituta za ratarstvo i povrtarstvo **6** (1997), 103-122.
113. Matkovics, B., Novak, R., Honag Duc Hahn, Szabo, L., Varga, Sz.I., Zalesna, G., A comparative study of some more important experimental animal peroxide metabolism enzymes, *Comp. Biochem. Physiol.* **56** (1977), 31-34.
114. Matkovics, B., Szabo, L., Varga, I., Sz., Barabas, K., Berencsi, G., Nemcsok, J., Effects of a herbicide on the peroxide metabolism enzymes and lipid peroxidation in carp fish (*Hypophthalmichthys molitrix*), *Acta Biologica Hungarica* **35** (1984), 91-96.
115. Matsuda, H., Marikawa, T., Ando, S., Toguchida, I., Yoshikawa, M., Structure Requirements of Flavonoids for Nitric Oxide Production Inhibitory Activity and Mechanism of Action, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **11** (2003), 1915-2000.
116. Matsukawa, Y., Marui, N., Sakai, T., Satome, Y., Yoshida, M., Matsumoto, K., Nishimo, H., Aoike, A., Genistein arrests cell cycle progression at G₂-M, *Cancer Res.* **53** (1993), 1328-1331.
117. McCord, J.M., Fridovich, Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte/hemocytin, *J. Biol. Chem.* **244** (1969), 6049.
118. Merritt, C.Jr., Qualitative and quantitative aspects of trace volatile components in irradiated foods and food substances, *Rad. Res. Rev.* **3** (1972), 353.
119. Mijatović, Z., Pojam elektrona i princip e-zaprašivanja, U: Biofizika u poljoprivrednoj proizvodnji (Ur. Marinković, B.J.), Novi Sad, 2002.
120. Miladinović, Dragoljub, Antioksidanti samoniklih biljaka. *Doktorska disertacija*, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, 2000.
121. Mitchell, J.H., Gardner, P.T., McPhail, D.B., Morrice, P.C., Collins, A.R., Duthie, G.G. Antioxidant efficacy of phytoestrogens in chemical and biological model systems, *Arch. Biochem. Biophys.* **360** (1998), 142-148.
122. Morse, W.J., Cartter, J.L., Williams, L.F., Soybeans: culture and varieties, U.S. Government Printing Office, 1949.
123. Mozumder, A., Hatano, Y., Introduction, In: *Charged Particle and Photon Interactions with Matter*, (Eds. Mozumder, A., Hatano, Y.), Marcel Dekker, New York, 2004.
124. Mozumder, A., Interaction of Fast Charged Particles with Matter, In: *Charged Particle and Photon Interactions with Matter*, (Eds. Mozumder, A., Hatano, Y.), Marcel Dekker, New York, 2004.
125. Murkies, A.L., Lombard, C., Strauss, B.J.G Dietary flour supplementation decreases post-menopausal hot flashes: effect of soy and wheat, *Maturitas* **21** (1995), 189-195.
126. Murthy, N.U.M, Sun, Q.W., Protein modification by Amadori and Maillard reactions during seed storage: Roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation, *J. Exp. Bot.* **51** (2000), 348-354.

127. Naim, M., Gestetner, B., Kirson, I., Birk, Y., Bondi, A., A new isoflavone from soya beans, *Phytochemistry* **12** (1973), 169-170.
128. Navari-Izzo, F., Meneguzzo, S., Longgini, B., Vazzona, C., Sgherri, C.L.M., The role of glutathione system during dehydration of *Boea hygroskopica* L., *Physiol. Plant.* **99** (1997), 23-30.
129. Navari-Izzo, F., Pinzino, C., Quartacci, M.F., Sgherri, C., Superoxide and hydroxyl radical generation, and superoxide dismutase in PS II membrane fragments from wheat, *Free. Radic. Res.* **31** (1999), Suppl: S3-9.
130. Nawar, W.W., Radiolytic changes in fats, *Rad. Res. Rev.* **3** (1972), 327.
131. Neill, S., Desikan, R., Hancock, J., Hydrogen peroxide signaling, *Curr. Opin. Plant Biol.* **5** (2002), 388-395.
132. Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R.D., Hancock, J.T., Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants, *J. Exp. Bot.* **53** (2002), 1237-1247.
133. Nomura, T., Yamaoka, K., Low-dose γ -ray irradiation reduces oxidative damage induced by CCl_4 in mouse liver, *Free Rad. Biol. Med.*, **27** (1999), 1324-1333.
134. Noritake, T., Kawakita, K., Doke, N., Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissue, *Plant Cell Physiol.* **37** (1996), 113-116.
135. Ohta, N., Kuwata, G., Akahori, H., Watanabe, T., Isoflavonoid constituents of soybeans and isolation of a new acetylaidzin, *Agr. Biol. Chem.* **43** (1979), 1415-1419.
136. Palmer, R. M., Ferrige, A. G., Moncada, S., Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor, *Nature* **327** (1987), 524-526.
137. Park, H.H., Hakamatsuka, T., Noguchi, H., Sankawa, U., Ebizuka, Y., Isoflavone glucosides exist as their 6''-O-malonyl esters in *Pueraria lobata* and its cell supresion cultures, *Chem. Pharm. Bull.*, **40** (1992), 1978-1980.
138. Patskevich, VM., Conference on seed irradiation prior to sowing, *Sov. J. At. Energy*, **10** (1961), 549-551.
139. Paxton, J., Soybean phytoalexins: elicitation nature, mode of action and role, In: *Handbook of Phytoalexins Metabolism and Action* (Eds. Daniel, M., Purkayastha, R.P.), Marcel Dekker, New York, 69-83, 1995.
140. Petrović, N., Marinković, J., Marinković, B., Uticaj rezonantno impulsne elektromagnetne stimulacije na neke pokazatelje vodenog režima šećerne repe u uslovima različite mineralne ishrane, U: *Biofizika u poljoprivrednoj proizvodnji* (Ur. Marinković, B.J.), Novi Sad, 2002.
141. Placer, Z. A., Cushman, L. L., Johnson, B. C., Estimation of product of lipid peroxidation (malonyldialdehyde) in biochemical systems, *Anal. Biochem.* **16** (1966), 359-364.
142. Planel, H., Soleilhavoup, J.P., Tixador, A., Richoilley, G., Conter, A., Croute, F., Cartero, C., Gaubin, Y.R., Influence on cell proliferation of background radiation or exposure to very low chronic gamma radiation, *Health Phys.* **52**, (1987), 571-578.
143. Pratt, D.E., Natural antioxidants of soybeans and other oil-seeds, In: *Antioxidation in Food and Biological Systems* (Eds. Simić, M.G., Karel, M.), Plenum Press, New York (1980), 283-293.
144. Quaggiotti, S., Trentin, A.R., Vecchia, F.D., Ghisi, R., Response of maize (*Zea mays* L.) nitrate reductase to UV-B radiation, *Plant Science* **167** (2004), 107-116.

145. Quy Hai, D., Kovacs, K., Matkovics, I., Matkovics, B. Properties of enzymes X., Peroxidase and superoxide dismutase contents of plant seeds, *Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP)* **167** (1975), 357-359.
146. Raffi, J., Yordanow, N., Chabane, S., Douifi, L., Grancheva, V., Ivanova, S., Detection of irradiated aromatic herbs and spices by ESR and TL. *Spectrochimica Acta (A)* **56** (2000), 409-416.
147. Ranade S., Feierabend, J., Comparison of light-induced stress reactions in susceptible and paraquat-tolerant green cell cultures of *Chenopodium rubrum* L., *J. Plant Physiol.* **137** (1991), 749.
148. Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P., Ultraviolet-B and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiol.* **110** (1996), 125-136.
149. Reblova, Z., Pokorný, J., Panek, J., Autooxidation of stored soybean lecithin, *Nahrung* **35** (1991), 665-666.
150. Rechner, A., Einfluss der Verarbeitung technik auf die Polyphenole and antioxidative Kapazität von Apfel und Beerenobstsäften, PhD Thesis, Justus, Liebig, Universität, Giessen, (2000), 46-48.
151. Record, I.R., Dreosti, I.E., McInerney, J.K., The antioxidant activity of genistein *in vitro*, *J. Nutr. Biochem.*, **6** (1995), 481-485.
152. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Rad. Biol. Med.* **20** (1996), 933-956.
153. Robards, K., Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables, *J. Chromatogr. A* **1000** (2003), 657-691.
154. Röder, O., Schaller, H., Göts, F., Tretiranje elektronima u službi poljoprivrede, U: *Biofizika u poljoprivrednoj proizvodnji* (Ur. Marinković, B.J.), Novi Sad, 2002.
155. Rubel, A., Rinne, R.W., Canvin, D.T., Protein, oil and fatty acid in developing soybean seeds, *Crop. Sci.* **12** (1972), 739-741.
156. Sagan, LA., What is hormesis and why haven't we heard it before? *Health Phys* **52** (1987), 521-525.
157. Sagi, M., Fluhr, R., Superoxide production by plant homologues of the gp91^{phox} NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant. Physiol.* **126** (2001), 1281-1290.
158. Sakač, M., Antioksidanti u zrnu soje i njegovim proizvodima, Doktorska disertacija, Tehnološki fakultet, Novi Sad, 2000.
159. Salin, M. L., Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast, *Physiol. Plant.* **72** (1988), 681-689.
160. Salunkhe, D.K., Chavan, J.K., Kadam, S.S., Dietary tannins: Consequences and remedies, CRC Press, Boca Raton, 1990.
161. Santos, I., Almeida, J.M., Salema, R., The influence of UV-B radiation on the superoxide dismutase of maize, potato, sorghum and wheat leaves, *Can. J. Bot.* **77** (1999), 70-76.
162. Santos, I., Fidalgo, F., Almeida, J.M., Salema, R., Biochemical and ultrastructural changes in leaves of potato plant grown under supplementary UV-B radiation, *Plant Science* **167** (2004), 925-935.
163. Scandalios, J. G., Oxygen stress and superoxide dismutases, *Plant Physiol.* **101** (1993), 7-12.

164. Scheel, D., Wasternack, C., Signal transduction in plants: Cross-talk with the environment, In: *Plant signal transduction*, (Eds. Scheel, D., Wasternack, C.), Oxford University Press, New York, 2002.
165. Schmidt H.H.H.W., Kelm, M., Determination of Nitrite and Nitrate by the Griess Reaction. In: *Methods in Nitric Oxide Research* (Eds. Feelisch, M., Stamler, J.S.), John Wiley & Sons, New York (1996), 491-497.
166. Schuessler, H., Schilling, K., Oxygen effect in the radiolysis of proteins. *Int. J. Radiat. Biol.* **45** (1984), 267-281.
167. Sedlak, J., Lindsay, H., Estimation of total protein bound and non protein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent, *Anal. Biochem.* **25** (1968), 192-205.
168. Sevilla, M.D, Becker, D., Yan, M., Summerfield, S., Relative abundances of primary ion radicals in γ -irradiated DNA: cytosine vs Thymine anions and Guanine vs Adenine cations. *J. Phys. Chem.* **95** (1991), 3409-3415.
169. Shaaltiel, Y. and Gressel, J., Multienzyme oxygen radical detoxifying system correlated with paraquat resistance in *Conyza bonariensis*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **26** (1986), 22-28.
170. Sies, H., Biochemistry of oxidative stress, *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* **25** (1986), 1058-1071.
171. Simon, L. M., Fatrai, Z., Jonas, D. E., Matkovic, B., Study of metabolism enzymes during the development of *Phaseolus vulgaris*, *Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP)* **166** (1974), 387-392.
172. Singh, P.K., Chandra, P., Singh, J., Singh, D.N., Effect of gamma ray on physio-biochemical parameters of sugarcane, *J. Nucl. Agric. Biol.* **22** (1993), 65-69.
173. Slupphaug, G., Kavli, B., Krokan, H.E., The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage, *Mutation Research* **531** (2003), 231-251.
174. Soler-Rivas, C., Espin, J.C., Wichers, H.J., An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs, *Phytochemica Analysis* **11** (5), (2000), 330-338.
175. Spaink, H.P., The molecular basis of infection and nodulation by *Rhizobia*- the ins and outs of symphatogenesis, *Annu. Rev. Phytophatol.* **33** (1995), 345-368.
176. Stadtman, E.R., Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Rad Biol Med Biochemistry* **9** (1990), 315-325.
177. Strid, A., Chow, W.S., Anderson, J.M., UV damage and protection at the molecular level in plants, *Photosynth. Res.* **39** (1994), 475-489
178. Sun, J., Chen, Y., Li, M., Ge, Z., Role of antioxidant enzymes on ionizing radiation resistance, *Free Radical Biology & Medicine*, **24** (1997), 586-593.
179. Swern, D., Industrijski proizvodi ulja i masti po Bailey-ju. Nakladni zavod znanje, Zagreb, 1972.
180. Szkudelski, T., Phytic acid-its influence on organism, *J. Anim. Feed Sci.* **6** (1997), 427-438.
181. Štajner, Dubravka, Prilog proučavanju antioksidantnih jedinjenja pšenice, Doktorska disertacija, Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, 1990.
182. Tagawa, S., Seki, S., Kozawa, T., Charged Particle and Photon- Induced Reactions in Polymers, In: *Charged Particle and Photon Interactions with Matter*, (Eds. Mozumder, A., Hatano, Y.), Marcel Dekker, New York, 2004.

183. Talalay, P., Mechanisms of induction of enzymes that protect against chemical carcinogenesis. *Adv. Enzyme Regul.* **28** (1989), 237-250.
184. Temler, R.S., Dormond, C.A., Simon, A., Moret, B., The effect of feeding soybean trypsin inhibitor and repeated initiations of cholecystokinin in rat pancreas. *J. Nutr.* **114** (1984), 1083-1091.
185. Tham, D.M., Gardner, C.D., Haskell, W.L., Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83** (1998), 2223-2235.
186. Tieppo, M., Porawski, M., Salvador, M., Moreira, A.J., Collado, P.S., Gonzalez-Gallego, J., Marroni, N.P., *Croton Cajucera* Benth. Leaf Extract Scavenges the Stable Free Radical DPPH and Protects Against Oxidative Stress Induced by Paraquat, *Biol. Pharm. Bull.* **29** (2006), 161-165.
187. Tikkanen, M.J., Wahala, K., Ojala, S., Vihma, V., Adlercreutz, Heffect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **95** (1998), 3106-3110.
188. Torreilles J., Nitric oxide: One of the more conserved and widespread signaling molecules, *Frontiers in Bioscience* **6** (2001), 1161-1172.
189. Totani, Y., Antioxidatve effects of pospholipids in an emulsifying system, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **46** (1997), 21-27.
190. UNSCEAR Report, Sources and Effects of Ionizing Radiation, United Nations, New York, 1993.
191. Vaijapurkar, S.G., Agarwal, D., Chaudhuri, S.K., Senwar, K.R., Bhatnagar, P.K., Gamma-irradiated onions a a biological indicator of radiation dose, *Radiation Measurements* **33** (2001), 833-836.
192. Variyar, P.S., Limaye, A., Sharma, A., Radiation-Induced Enhancement of Antioxidant Contents of Soybean (*Glycine max* Merrill), *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004), 3385-3388.
193. Verma, S., Dubey, R.S., Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants, *Plant Science* **164** (2003), 645-655.
194. Villano, D., Fernández-Pachón, M.S., Moyá, M.L., Troncoso, A.M., Gracia-Parrilla, Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical, *Talanta* (2006), *In press*.
195. Von Sonntag, C., The Chemical Basis of Radiation Biology, Taylor and Francis, New Yorka, 1987.
196. Vranová, E., Van Breusegem, F., Dat, J., Belles-Boix, E., Inzé, D., The role of active oxygen species in plant signal transduction, In: *Plant signal transduction*, (Eds. Scheel, D., Wasternack, C.), Oxford University Press, New York, 2002.
197. Wada, H., Koshiha, T., Matsui, T., Sato, M., Involvement of peroxidase in differential sensitivity to γ -radiation in seedlings of two *Nicotina* species, *Plant Science* **132** (1998), 109-119.
198. Walter, E.D, Genistin (an isoflavone glucoside) and its aglucone, genistein, from soybeans, *J. Amer. Chem. Soc.* **63** (1941), 3273-3276.
199. Wang, G., Kuan, S.S., Francis, O.J., Ware, G.M., Carman, A.S, A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products, *J. Agric. Food Chem.* **38** (1990), 185-190.
200. Wang, G., Murphy, P.A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effect of variety, crop year and location, *J. Agric. Food Chem.* **42** (1994), 1674-1677.

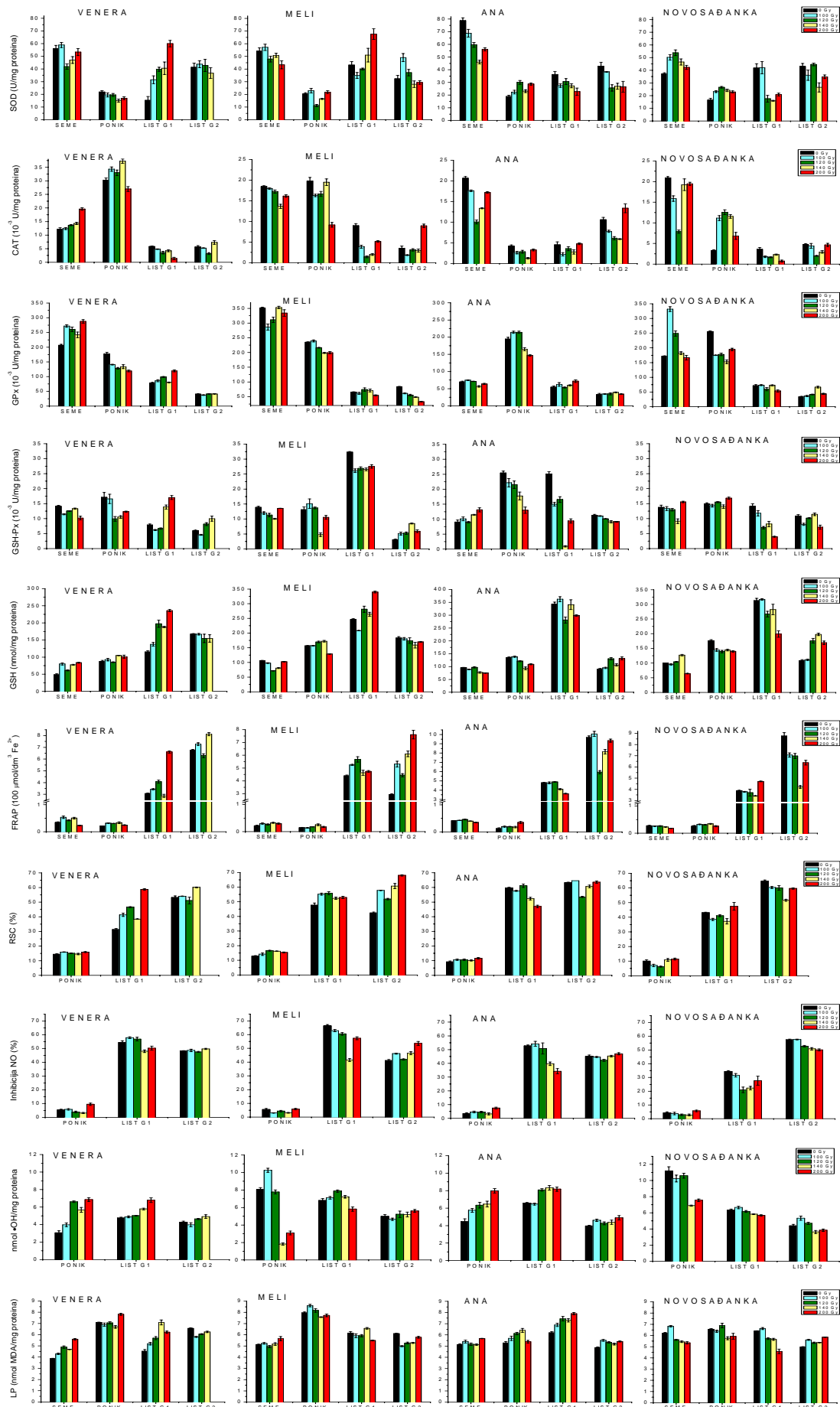
201. Wang, G., Murphy, P.A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing, *J. Agric. Food Chem.* **44** (1996), 2377-2383.
202. Wang, H., Murphy, P.A., Isoflavone content in commercial soybean foods, *J. Agric. Food Chem.* **42** (8), (1994), 1665-1673.
203. Wang, W., Yan, M., Becker, D., Sevilla, M.D., The influence of hydration on the absolute yields of primary free radicals in gamma-irradiated DNA at 77 K. II. Individual radical yields. *Radiat. Res.* **137** (1994), 2-10.
204. Wang, X.M., Hildebrand, D.F., Biosynthesis and regulation of linoleic acid in higher plants, *Plant Physiol. Biochem.* **26** (1988), 777-792.
205. Wells, P.G., Bhuller, Y., Chen, C.S., Jeng, W., Kasapinović, S., Kennedy, J.C., Kim, P.K., Laposa, R.R., McCallum, G.P., Nicol, C.J., Parman, T., Wiley, M.J., Wong, A.W., Molecular and biochemical mechanisms in teratogenesis involving reactive oxygen species, *Toxicology and Applied Pharmacology* **207** (2005), 354-366.
206. WHO, WHO Technical Report Series 659, Report of a Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee, Wholesomeness of Irradiated Food, Geneva, 1981.
207. Wierbicki, E., In: *Proceedings of the 26th European Meeting of Meat Research Workers*, Colorado Springs (1980), 194.
208. Willavicencio, A., Araujo, M., Baldasso, J.G., Aquino, S., Konietznz, U., Greiner, R., Irradiation influence on the detection of genetic-modified soybeans, *Phys. Chem.* **71** (2004), 489-492.
209. Williams-Brand, W., Cuvelier, M.E., Berset, C., Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity *Lebensm-Wiss U-Technol* **28** (1995), 25-30.
210. Wong, P.S., Leong, L.P., Koh, J.H.W., Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants, *Food Chemistry* (2006), In press.
211. World Health Organisation, Health and Safety Guide: Magnetic Fields Health and Safety Guide, Geneva, 1989.
212. Wu, K., Zhang, W.B., Addis, P.B., Epley, R.J., Salih, A.M., Lehrfeld, J., Antioxidant properties on wild rice, *J. Agric. Food Chem.*, **41** (1994), 34-37.
213. Wu, Q., Wang, J.E., Simon, Determination of isoflavones in red clover and related species by high-performance liquid chromatography combined with ultraviolet and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* **1016** (2003), 195-209.
214. Wu, Q., Wang, M., Simon, E.J., Analytical methods to determine phytoestrogenic compounds, *J. Chromatogr. B* **812** (2004), 325-355.
215. Yang, T., Poovaiah, B.W., Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin, *Plant Biology.* **99** (2002), 4097-4102.
216. Yanqun, Z., Yuan, L., Haiyan, C., Jianjun, C., Intraspecific differences in physiological response of 20 soybean cultivars to enhanced ultraviolet-B radiation under field conditions, *Environmental and Experimental Botany* **50** (2003), 87-97.
217. Yoshimura, Y., Lijima, T., Waranabe, T., Nakazawa, H., Antioxidative effect of Maillard reaction products using glucose-glycine model system, *J. Agric. Food Chem.* **45** (1997), 4106-4109.
218. Yukawa, O., Nakajima, T., Yukawa, M., Ozawa, T., Yamada, T., Induction of radical scavenging ability and protection against radiation-induced damage to microsomal membranes following low-dose irradiation. *International Journal of Radiation Biology* **75** (1999), 1189-1199.
219. Zaka, R., Vandcasteele, C.M., Misset, M.T., Effects of low doses of ionizing radiation on antioxidant enzymes and G₆PDH activities in *Stipa capillata* (Poaceae), *J. Exp. Bot.* **53** (376), (2002), 1979-1987.

220. Zarkades, C.G., Yu, Z., Voldeng, H.D., Minero-Amador, H., Assessment of the protein quality of the protein quality of new high protein soybean cultivar by amino acid analysis. *J. Agric. Food Chem.* **41** (1993), 1562-1565.

221. Zielonka, J., Gebicki, J., Gryniewicz, G., Radical Scavenging properties of Genistein, *Free Rad. Biol. Med.* **35** (2003), 958-965.

222. Žilić, S., Nutritivne karakteristike sojinog zrna i sojinih proizvoda, Magistarska teza, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2004.

9. PRILOG



Grafikon 63. Uporedni prikaz promena u antioksidantnom sistemu odabranih genotipova ozračene i neozračene soje tokom razvika kroz dve generacije

BIOGRAFIJA



Rodjen sam u Novom Sadu 20.01.1975. godine. Osnovnu školu i gimnaziju (prirodno-matematički smer, „J. J. Zmaj“) završio sam u Novom Sadu kao nosilac diplome „Vuk Karadžić“. Studije hemije na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu završio sam 13.10.2000. sa prosečnom ocenom 9,92 (ocena na diplomskom 10).

Poslediplomske magistarske studije upisao sam na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu novembra 2000. godine iz oblasti hemija, disciplina-biohemija. Magistarske studije završio sam sa prosečnom ocenom 10,00, a 14. jula 2004. godine odbranio sam magistarsku tezu pod nazivom: „Oksidativni stres i rezistentnost nekih korova na delovanje atrazina i metolahlora“ i stekao akademski naziv magistra biohemijskih nauka.

U vremenu od juna 2001. do juna 2002.godine preko Republičke berze rada bio sam angažovan na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu u svojstvu istraživača pripravnika. Od aprila meseca 2003.godine stipendista sam Ministarstva za nauku, tehnologiju i razvoj Republike Srbije, a od aprila 2006. godine zaposlio sam se na Poljoprivrednom fakultetu u Novom Sadu kao asistent na prdmetu Hemija.

Sekretar sam Hemijskog društva Vojvodine.

Govorim, čitam i pišem engleski jezik.

Koautor sam u sedam naučnih radova i trinaest saopštenja na domaćim i međunarodnim naučnim skupovima.

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO - MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj:

RBR

Identifikacioni broj:

IBR

Tip dokumentacije: Monografska dokumentacija

TD

Tip zapisa: Tekstualni Štampani materijal

TZ

Vrsta rada: Doktorska disertacija

VR

Autor: Boris Popović

AU

Mentor: dr Dubravka Štajner, redovni profesor Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu i dr Mira Popović, redovni profesor PMF-a u Novom Sadu

MN

Naslov rada: Uticaj γ -zračenja na antioksidantni sistem odabranih genotipova soje i pojava oksidativnog stresa

MR

Jezik publikacije: Srpski (latinica)

JP

Jezik izvoda: s / e

JI

Zemlja publikovanja: Srbija

ZP

Uže geografsko područje: Vojvodina

UGP

Godina: 2006.

GO

Izdavač: Autorski reprint

IZ

Mesto i adresa: Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 3.

MA

Fizički opis rada: broj poglavlja/ broj strana/ broj lit. citata/ broj tabela/ broj slika/ broj grafika:

8/136/222/2/42/63.

FO

Naučna oblast: Hemija

NO

Naučna disciplina:

ND

Ključne reči: soja, antioksidanti, oksidativni stres, γ -zračenje

PO

UDK:

Čuva se: Biblioteka Departmana za hemiju, Trg D. Obradovića 3, Novi Sad

ČU

Važna napomena:

VN

Izvod:

IZ U radu su prikazani rezultati ispitivanja uticaja niskih doza γ -zračenja (do 200 Gy) na antioksidantne osobine i parametre oksidativnog stresa u različitim fazama razvoja soje i uticaja srednjih doza γ -zračenja (1-10 kGy) na neke antioksidantne osobine semena soje. Vršena su određivanja aktivnosti antioksidantnih enzima (SOD, CAT, GPx, GSH-Px), količine hidroksil radikala, malonildialdehida i redukovano glutatona, sadržaja rastvorljivih proteina, ukupnih fenola i tanina, intenziteta oksidacije proteina, ukupne antioksidantne aktivnosti FRAP metodom, DPPH-skevindžer aktivnosti i inhibicije NO radikala. ESR spektroskopijom praćen je uticaj ekstrakata ozračene i neozračene soje na količinu hidroksil radikala u Fentonovom model sistemu. Pomoću HPLC analize određen je sadržaj izoflavona u semenu ozračene i neozračene soje.

Upoređivanjem antioksidantnih statusa ozračenih i neozračenih genotipova soje može se zaključiti da je γ -zračenje, kojim je bilo izloženo seme, dovelo do stimulacije antioksidantnog sistema soje u različitim fazama razvoja kroz dve generacije. Utvrđeno je da promene aktivnosti pojedinih komponenti antioksidantnog sistema zavise od doze primenjenog zračenja, genotipa kao i od faze razvoja biljke.

Na osnovu lipidne peroksidacije kao kriterijuma (biomarkera) osetljivosti na radijacioni i oksidativni stress, ispitivani genotipovi se mogu svrstati u dve grupe: radiosenzitivni genotipovi Venera i Ana i radiorezistentni genotipovi Meli i Novosađanka. Rezultati ESR spektroskopije su potvrdili da su genotipovi Ana i Venera osetljiviji na radijacioni i oksidativni stres od genotipova Meli i Novosađanka. Naši rezultati ukazuju da srednje doze γ -zračenja poseduju izvesno „antioksidantno dejstvo“ koje se manifestuje povećanjem DPPH skevindžer aktivnosti i smanjenjem intenziteta oksidacije proteina u semenu soje. Nije utvrđena ni jedna negativna posledica na ispitivane nutritivne karakteristike semena soje.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća: 20.04.2006.

DP

Datum odbrane:

DO

Članovi komisije:

KO

Predsednik: dr Vukadin Leovac, redovni profesor, PMF, Novi Sad

Član: dr Dubravka Štajner, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

Član: dr Mira Popović, redovni profesor, PMF, Novi Sad

Član: dr Mirjana Milošević, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad

UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCE KEY
WORDS DOCUMENTATION

Accession number:

ANO

Identification number:

INO

Document type: Monograph type

DT

Type of record: Printed text

TR

Contents Code: PhD. Dissertation

CC

Author: Boris Popović

AU

Mentor: Dr Dubravka Štajner, Professor, Faculty of Agriculture in Novi Sad and dr Mira Popović,
Professor, Faculty of Science in Novi Sad

MN

Title: Influence of γ -radiation on antioxidant system of selected genotypes of soybean and oxidative stress
appearance

XI

Language of text: Serbian

LT

Language of abstract: Serb./Engl.

LA

Country of publication: Serbia

CP

Locality of publication: Vojvodina

LP

Publication year: 2006.

PY

Publisher: Author's reprint

PU

Publ. place: Novi Sad, Trg D. Obradovića 3

PP

Physical description: broj poglavlja, broj strana, broj lit. citata, broj tabela, broj slika, broj grafika:
8/136/222/2/42/63.

PD

Scientific field: Chemistry

SF

Scientific discipline:

SD

Key words: soybean, antioxidant, oxidative stress, γ -radiation

KW:

UC:

Holding data: Institute of Chemistry (Library), Trg D. Obradovića 3, Novi Sad

HD

Note:

N

Abstract:

AB The results obtained through the investigation about the influence of low level doses of γ -radiation (up to 200 Gy) on the antioxidant properties and oxidative stress parameters in different phases of soy development and the influence of the middle level doses of γ -radiation (from 1 kGy to 10 kGy) on some antioxidant parameters of soybean seed were presented in this paper. The investigation of the antioxidant enzymes (SOD,CAT,GPx,GSH-Px), hydroxyl-radical, malonyldialdehyde and reduced glutathione quantities, soluble protein and total phenol and tannin content, protein oxidation intensity, total antioxidant activity by FRAP-method, DPPH scavenger ability and NO radical inhibition was performed. ESR spectroscopy was used to follow the change of hydroxyl radical quantities in the Phenton model system. HPLC was used to analyse the isoflavone content in the irradiated and nonirradiated soybean.

By comparison of antioxidant statuses of irradiated and nonirradiated soy, it was established that the γ -irradiation of soybean stimulated the antioxidant system of soy during the development through two generations. It was observed that the changes in antioxidant activities of different components of antioxidant system of soybean depend on dose of radiation, genotype and phase of the development.

On the basis of lipid peroxidation as criterion (biomarker) of sensitivity on radiation and oxidative stress, investigated genotypes can be classified into two groups: radiosensitive genotypes Venera and Ana and radioresistant genotypes Meli and Novosađanka. Results of ESR spectroscopy confirmed that genotypes Ana and Venera are more sensitive to radiation and oxidative stress than genotypes Meli and Novosađanka.

Our results indicate that middle doses of γ -radiation possess such „antioxidant activity“ which is manifested with the increase of DPPH scavenger activity and decrease of protein oxidation intensity in soybean seed. We did not establish any negative implication on investigated nutritive characteristics of soybean seed.

Accepted by the Scientific Board on: 20.04.2006.

Defended:

Thesis defend board:

President: dr Vukadin Leovac, Prof., Faculty of Sciences, Novi Sad

Member: dr Dubravka Štajner, Prof., Faculty of Agriculture, Novi Sad

Member: dr Mira Popović, Prof., Faculty of Sciences, Novi Sad

Member: dr Mirjana Milošević, Prof., Faculty of Agriculture, Novi Sad