

Utjecaj različitih vrsta nanočestica selena na antioksidativni odgovor listova rukole

Djedović, Ivana

Master's thesis / Diplomski rad

2022

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:181:963848>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2023-05-29**



**ODJEL ZA
BIOLOGIJU**
Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

Repository / Repozitorij:

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer znanstveni

Ivana Djedović

**Utjecaj različitih vrsta nanočestica selena na antioksidativni odgovor
listova rukole**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za biologiju

Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer znanstveni

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Biologija

Utjecaj različitih vrsta nanočestica selen na antioksidativni odgovor listova rukole

Ivana Djedović

Rad je izrađen: Laboratorij za biokemiju, Odjel za biologiju, Sveučilište J. J. Strossmayera u Osijeku

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivna Štolfa Čamagajevac

Neposredna voditeljica: dr. sc. Ana Vuković

Kratak sažetak diplomskog rada:

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi postoji li razlika u utjecaju Se u obliku selenata i različitih vrsta nanočestica Se na oksidativni status i antioksidativni odgovor u listovima rukole. Tretmani biljaka nanočesticama Se stabiliziranim polisorbitom i huminskom kiselinom mogu se preporučiti kao najučinkovitiji biofortifikacijski tretmani budući da su uzrokovali smanjenje intenziteta peroksidacije lipida, a u isto vrijeme su povećali koncentraciju askorbinske kiseline u listovima rukole. Daljnja istraživanja potrebna su kako bi se dobio detaljan uvid u mehanizam djelovanja nanočestica Se.

Broj stranica: 44

Broj slika: 7

Broj tablica: 1

Broj literaturnih navoda: 143

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: nanoselen, oksidativni stres, antioksidativni enzimi, rukola

Datum obrane: 10. listopada 2022.

Stručno povjerenstvo za obranu:

doc.dr.sc. Zorana Katanić, predsjednik

izv.prof.dr.sc. Ivna Štolfa Čamagajevac, član

doc.dr.sc. Martina Varga, član

doc.dr.sc. Selma Mlinarić, zamjena člana.

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

BASIC DOCUMENTATION CARD**Master thesis****Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Department of Biology****Graduate university study programme in Biology****Scientific Area:** Natural sciences**Scientific Field:** Biology**Effect of different types of selenium nanoparticles on antioxidative response in arugula leaves****Ivana Djedović****Thesis performed at:** Laboratory of Biochemistry, Department of Biology, J.J. Strossmayer University of Osijek.**Supervisor:** Associate Professor, Ivna Štolfa Čamagajevac, PhD**Assistant Supervisor:** Ana Vuković, PhD**Short abstract:**

This research aimed to determine whether there is a difference in the influence between selenium as selenate and different types of selenium nanoparticles on the oxidative status and antioxidative response in arugula leaves. Plant treatments with Se nanoparticles stabilized with polysorbate and humic acid can be recommended as the most effective biofortification treatments since they cause a decrease in the intensity of lipid peroxidation. At the same time, they increased the concentration of ascorbic acid in arugula leaves. Further research is needed to gain detailed insight into the mechanism of Se nanoparticle's action.

Number of pages: 44**Number of figures:** 7**Number of tables:** 1**Number of references:** 143**Original in:** Croatian**Keywords:** nanoselenium, oxidative stress, antioxidative enzymes, arugula**Date of the thesis defence:** 10th October 2022**Reviewers:**

Assistant Professor Zorana Katanić, PhD, chair

Associate Professor Ivna Štolfa Čamagajevac, PhD, member

Assistant Professor Martina Varga, member

Assistant Professor Selma Mlinarić, member replacement.

Thesis deposited: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

Zahvaljujem se mentorici izv.prof.dr.sc. Ivni Štolfi Čamagajevac što mi je pružila priliku izrade diplomskog rada, na svim savjetima i podršci prilikom pisanja te i samog studiranja.

Neizmjerno sam zahvalna i asistentici dr.sc. Ani Vuković na pristupačnosti, strpljenju i pomoći pri izradi eksperimentalnog dijela rada.

Od srca zahvaljujem svim svojim prijateljima koji su mi uljepšali studentske dane, a posebno hvala Nikoli koji mi je uvijek bio vjetar u leđa i rame za plakanje.

Hvala mojoj najboljoj prijateljici Matei što je uz mene od djetinjstva i što savršeno igra ulogu moje četvrte sestre.

Najveće hvala dugujem svojoj obitelji; roditeljima Ljubanu i Gorani, bratu Ivanu, sestrama Maji, Ani Mariji i Tatjani na podršci, ljubavi i razumijevanju. Bez vas ne bih uspjela.

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1. Biološka uloga selena.....	1
1.2. Nanoselen.....	2
1.3. Akumulacija i metabolizam selena u biljkama	3
1.4. Oksidacijski stres u biljaka.....	4
1.5. Antioksidativni odgovor u biljaka.....	5
1.5.1. Glutation	6
1.5.2. Glutation-reduktaza	6
1.5.3 Glutation-peroksidaza.....	7
1.5.4. Askorbat-peroksidaza	7
1.5.5. Askorbinska kiselina.....	7
1.6. Cilj diplomskog rada	8
2. MATERIJALI I METODE	9
2.1. Opis eksperimenta	9
2.2. Određivanje koncentracije ukupnog glutaciona	10
2.3. Određivanje aktivnosti glutacion-reduktaze	11
2.4. Određivanje aktivnosti glutacion-peroksidaze.....	11
2.5. Određivanje aktivnosti askorbat-peroksidaze	12
2.6. Određivanje koncentracije askorbinske kiseline	12
2.7. Određivanje količine produkata lipidne peroksidacije.....	12
2.8. Statistička obrada podataka.....	13
3. REZULTATI	14
3.1. Utjecaj različitih vrsta nanočestica selena i natrijevog selenata na količinu produkata lipidne peroksidacije u listovima rukole	14
3.2. Utjecaj različitih vrsta nanočestica selena i natrijevog selenata na koncentraciju reduciranog i oksidiranog glutaciona u listovima rukole.....	15
3.3. Utjecaj različitih vrsta nanočestica selena i natrijevog selenata na aktivnost glutacion-reduktaze u listovima rukole	16
3.4. Utjecaj različitih vrsta nanočestica selena i natrijevog selenata na aktivnost glutacion-peroksidaze u listovima rukole.....	17
3.5. Utjecaj različitih vrsta nanočestica selena i natrijevog selenata na koncentraciju askorbinske kiseline u listovima rukole	18
3.6. Utjecaj različitih vrsta nanočestica selena i natrijevog selenata na aktivnost askorbat-peroksidaze u listovima rukole.....	19

4. RASPRAVA.....	21
5. ZAKLJUČCI.....	25
6. LITERATURA.....	26

1. UVOD

1.1. Biološka uloga selen

Selen (Se) je mikroelement koji se nalazi u ljudima, životinjama, biljkama i mikroorganizmima (Germ i sur. 2007). Pripada skupini halkogenih elemenata i ima svojstva metaloida. Sastavna je komponenta enzima glutation-peroksidaze, kao i drugih enzima poput, iodotironin-deiodinaze, tioredoksin-reduktaze te niza selenoproteina (Pallud i sur. 1997; Birringer i sur. 2002). Budući da se većinska količina Se unosi u organizam hranom, iznimno je bitno da biljke sadržavaju dovoljne količine u svojim tkivima. Orašasti plodovi, žitarice i gljive bogati su izvor Se (Chang i sur. 1995). Kao dodatak prehrani dostupan je u raznim oblicima, ubrajajući mineralne i multivitaminske suplemente.

Istraživanja pokazuju da Se može stimulirati rast i razvoj biljaka te povećati otpornost i antioksidativni kapacitet (Chu i sur. 2010). Ima važnu ulogu u smanjenju osjetljivosti biljaka na dehidraciju (Kuznetsov i sur. 2003) i povećanju otpornosti na stres uzrokovan UV zračenjem (Xue i sur. 2001). Se može smanjiti unos i akumulaciju toksičnih metala, povećati sadržaj fotosintetskih pigmenata te povećati stopu fotosinteze (Chauhan i sur. 2017). Postoje tri razine biološkog djelovanja Se u biljkama: male koncentracije su potrebne za rast i razvoj, umjerene koncentracije se mogu skladištiti za održavanje homeostatske ravnoteže, a prekomjerne mogu imati toksični učinak (Hamilton 2004). Budući da Se ima sličnu kemijsku strukturu kao sumpor (S), biljke asimiliraju i metaboliziraju Se koristeći iste puteve kao i za sumpor (Dumont i sur. 2006; Sors i sur. 2005). Dolazi do zamjene S sa Se u proteinima i drugim spojevima koji sadrže S, narušava se funkcija ovih molekula što rezultira toksičnim učinkom (Pilon-Smits i Quinn 2010).

Kao esencijalni element za ljudski organizam, Se ima biološku funkciju u obliku selenoproteina koji djeluju antioksidativno i uklanjanju reaktivne kisikove jedinice (engl. *Reactive Oxygen Species*, ROS) (Pilon-Smits i Quinn 2010). Selenoproteini u sisavaca bitni su za normalni rad štitnjače i spermatogenezu (Rayman 2012). Koncentracija Se je iznimno visoka u tkivu štitne žlijezde jer Se u štitnoj žlijezdi ima bitnu ulogu u sintezi i metabolizmu tiroidnih hormona (Rasmussen i sur. 2011) Kod ljudi, starenjem se koncentracija Se smanjuje što se povezuje s oštećenjima moždanih funkcija vjerojatno zbog smanjenja antioksidativnog učinka Se (Akbaraly i sur. 2007). Budući da je razlika između količine Se potrebne za normalno

funkcioniranje organizma i količine koja dovodi do toksičnosti vrlo mala, nedostatak i toksičnost Se nerijetki su problemi širom svijeta (Terry i sur. 2000). Najčešći znakovi selenoze (kronično trovanje Se) su gubitak i lomljivost kose i noktiju. Uz to, drugi simptomi su umor, kožni osipi, gastrointestinalna iritabilnost, metalni okus u ustima i abnormalna funkcija živčanog sustava (Dodig i Čepelak 2004; Roman i sur. 2014). Preporučena dnevna doza Se za odraslog zdravog čovjeka iznosi 55 μg , a za žene u trudnoći i laktaciji 60 do 70 μg .

Sadržaj Se u biljkama, životinjama i čovjeku u korelaciji je sa sadržajem bioraspoloživog Se u tlu (Durán i sur. 2013). Tla su uglavnom siromašna Se i biljke koje rastu na njima posljedično sadrže male količine sintetiziranog organskog Se što dovodi do nutritivnog deficita tog elementa (Nothstein i sur. 2016). Sukladno tome, danas se sve više podvrgava obogaćivanju tla kako bi se povećala nutritivna vrijednost hrane biljnog podrijetla. Biofortifikacija je proces povećanja koncentracija bioraspoloživih važnih elemenata u jestivim dijelovima kultiviranih biljaka (White i Broadley 2005). Primjenjuje se na dva načina: aplikacijom u tlo radi povećanja koncentracije i raspoloživosti određenog elementa te aplikacijom preko lista (folijarna aplikacija) radi optimiziranja razvoja biljke. Također, postoji i tretman sjemena te predstavlja tretman sjemena (Ducsay i sur. 2016). Folijarna primjena Se efikasna je metoda biofortifikacije usjeva Se. Primjena selenita ili manje topljivih selenata (npr. BaSeO_4) osigurava dugotrajniji učinak u odnosu na Na_2SeO_4 i K_2SeO_4 koji pak predstavljaju glavne bioraspoložive oblike selenata za neposredno primanje od strane usjeva (White i Broadley 2009). Kvalitetno biofortificirani usjev mora imati visoku rodnost i isplativost, znatnu učinkovitost u povećanju količine mikronutrijenata, ali i biti ekonomski prihvatljiv za poljoprivrednike (Bouis i Welch 2010).

1.2. Nanoselen

Nanomaterijali su stekli bitnu ulogu u tehnološkom napretku zahvaljujući poboljšanim i prilagodljivim fizičkim, kemijskim i biološkim svojstvima. Nanočestice Se su nakupine elementarnog Se raznih veličina u različitim alotropskim modifikacijama. Privlače sve više pozornosti u znanosti zahvaljujući svojim apsorpcijskim sposobnostima, poboljšanoj bioraspoloživosti i manjoj toksičnosti u usporedbi s ostalim spojevima Se (Hosnedlova i sur. 2018). Se ima uzak terapijski prostor i granice toksičnosti, dok nanočestice Se pokazuju neobično smanjenu toksičnost (Kondaparthi 2019). Njihova biološka svojstva ovise o veličini – manje čestice imaju veću aktivnost (Torres i sur. 2012). Nanoselen može pomoći biljkama u obrani od štetočina i zaraznih mikroba kao što su bakterije i gljivice (Iqra Bano i sur. 2021).

Radi smanjivanja različitih vrsta abiotičkog stresa, uključujući akumulaciju teških metala i soli, ekstremno visoke temperature, suše, uporaba nanoselena je sve popularnija i važnija. Djanaguiraman i sur. (2018) tvrde da nanočestice selena mogu zaštititi biljke sirka pojačanim antioksidativnim obrambenim sustavom u uvjetima visoke temperature. Što se tiče prinosa u tlu i biljkama te bioloških procesa, primjena Se u standardnom obliku gnojiva smatra se manje učinkovitom od primjene nanoselena (Jain i sur. 2015). Nanoselen ima značajan utjecaj na klijanje i razvoj presadnica rano u procesu ontogeneze (Malagoli i sur. 2015). Sinteza nanočestica Se može se izvesti fizikalnim, kemijskim ili biološkim metodama koristeći mikroorganizme ili ekstrakte biljaka. Različiti mikroorganizmi sadrže različite enzime, većinom reduktaze, koji reduciraju selenit ili selenat u manje toksični elementarni Se⁰. Na primjer, bakterije *Sulfurospirillum barnesii* i *Bacillus selenireducens* u anaerobnim uvjetima reduciraju selenite i selenate u Se⁰ stvarajući time nanočestice (Oremland i sur. 2004). Sukladno tome, bakterije se mogu koristiti za detoksikaciju tla koja sadrže toksične koncentracije Se. Korijen biljke ne može apsorbirati Se⁰ pa biljka ne može akumulirati suvišak (Shoeibi i sur. 2017). Za sintezu nanočestica Se iz biljnih ekstrakata mogu se koristiti vodeni ekstrakt češnjaka (*Allium sativum*), ekstrakt lista arjune (*Terminalia arjuna*) i polisaharidne otopine alge wakame (*Undaria pinnatifida*) (Shen 2007).

Poboljšana svojstva nanomaterijala nerijetko su svojstva izoliranih čestica koja se gube nakon spajanja nanočestica u makroskopski obradak. Oblaganjem svake pojedine čestice drugim slojem keramike ili polimera moguće je izbjeći međudjelovanje čestica (Vollath i Szabo 1999). Oblaganje nanočestica materijalima poput dekstrana, polietilen glikola i polisorbata povećava njihovu bioraspodivnost (Mahadeva Lal i sur. 2021). Huminske tvari se koriste za povećanje stabilnosti čestica, povećanje disperzije i sprječavanje agregacije (Gonçalves i sur. 2020). Polivinilpirolidin (PVP) je pronašao široku primjenu u farmaceutskim i medicinskim primjenama. Topiv je u vodi i nije toksičan (Jaberolansar i sur. 2016). Može poslužiti kao površinski stabilizator, dispergator nanočestica, redukcijski agens i modifikator rasta (Hiremath i sur. 2019).

1.3. Akumulacija i metabolizam selena u biljkama

Se je u prirodi prisutan u dva oblika: anorganskom i organskom. Anorganski oblici Se su selenit (SeO₃²⁻), selenat (SeO₄²⁻), selenid (Se²⁻) i elementarni selen (Se⁰), a za biljke glavni organski oblici su selenocistein (SeCys) i selenometionin (SeMet) (Wu i sur. 2015; Bodnar i sur. 2012; Sors i sur. 2005). Korijen biljke ne može primati metalne selenide ili koloidno vezani

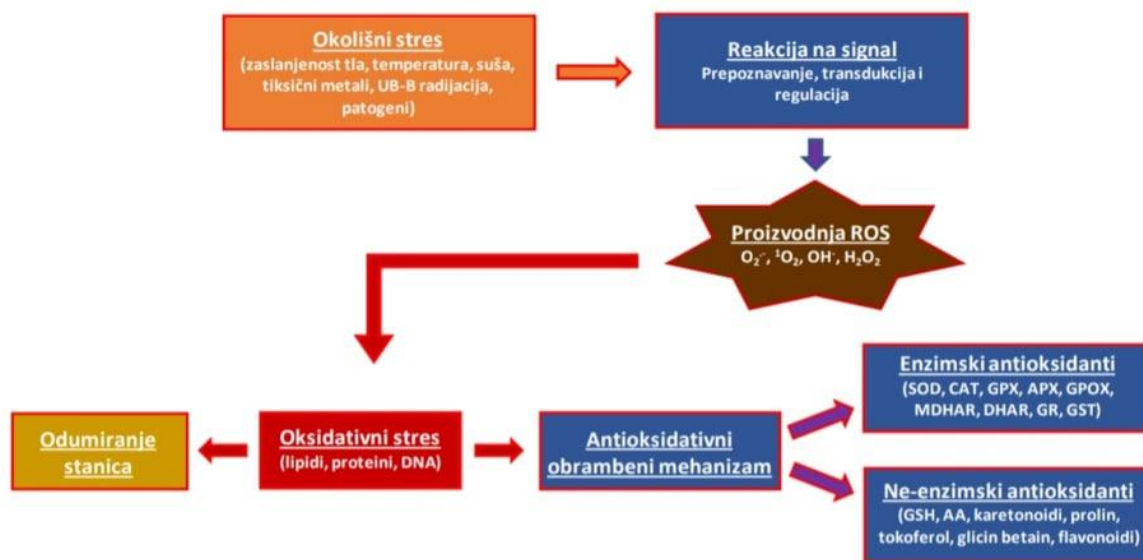
Se⁰ (White i Broadley 2009). Poznato je da selenat prevladava u alkalnim tlima bogatim kisikom i brzo se asimilira. S druge strane, selenit je zastupljen u uvjetima povećane kiselosti, vlažnosti i hipoksije. Akumulacija i metabolizam Se ovise o biljnoj vrsti, razvojnom stadiju biljke, fiziološkim uvjetima u kojima biljka raste, obliku i koncentraciji selena, prisutnosti drugih tvari te aktivnosti membranskih prijenosnika (Gupta i Gupta 2017). Selenat i selenit se ponajviše razlikuju po apsorpciji i pokretljivosti unutar biljke (Li i sur. 2008). Mobilnost iona ili molekule u izbojku biljke ovisi o brzini transpiracije i stopi opterećenja ksilema (Renkema i sur. 2012). Za razliku od selenita koji se lako prenosi od korijena do izdanka, selenat ima tendenciju akumulacije u korijenu. Biljke akumuliraju selenat preko korijena putem visokoafinitetnih prijenosnika za sulfate (Li i sur. 2008). Prema Li i sur. (2008), akumulacija selenita je aktivni proces koji se odvija vjerojatno pomoću fosfatnih transportera. Ako biljka primi Se u obliku selenata, prvo ga pomoću enzima ATP-sulfurilaze (APS) i APS-reduktaze (APR) reducira u selenit. Zatim, enzim sulfit-reduktaza pretvara selenit u selenid koji se povezuje s O-acetilserinom (OAS) i nastaje SeCys. Tu reakciju katalizira enzim cistein-sintaza (CS). Nakon toga, djelovanjem različitih enzima, SeCys se može konvertirati u elementarni selen, metil-SeCys ili SeMet.

S obzirom na kapacitet akumulacije Se, biljke se dijele u tri skupine: primarni akumulatori (hiperakumulatori), sekundarni akumulatori i neakumulatori. Primarni akumulatori (npr. *Astragalus*, *Neptunia*, *Xylorhiza*) imaju sposobnost akumulirati u stanice više od 1000 mg Se/kg suhe tvari, dok sekundarni akumulatori (*Helianthus*, *Aster*, *Brassica*) akumuliraju 100-1000 mg Se/kg suhe tvari. Neakumulatorne vrste mogu akumulirati samo nekoliko mg Se (npr. žitarice i trave) (Gupta i Gupta 2017). Akumulatori translociraju Se u izdanak i pretvaraju ga u organske oblike, dok neakumulatori većinom sadrže anorganske oblike Se (Chauhan i sur. 2019; White 2017). Se se najviše akumulira u vakuolama biljnih stanica i može se izlučivati putem sulfatnih transportera smještenih u tonoplastu (Ximénez-Embún i sur. 2004; Mazej i sur. 2008; Gigolashvili i Kopriva 2014).

1.4. Oksidacijski stres u biljaka

U biljnom organizmu, kao posljedica promjene uvjeta u kojima se biljka nalazi, javlja se oksidacijski stres (Arora i sur. 2002). Oksidacijski stres u biljci može biti izazvan različitim čimbenicima okoliša poput suše, povišene ili snižene temperature, povišenog saliniteta, teškim metalima, infekcijom usjeva patogenima itd. (Balen i sur. 2011; Cvjetko i sur. 2014; Rogić i sur. 2015; Slika 1). U takvim uvjetima dolazi do prekomjerne proizvodnje i akumulacije ROS-

a. U biljkama ROS nastaju kao međuprodukti raznih metaboličkih procesa i lokalizirani su u različitim staničnim organelima. U homeostazi, ROS se eliminiraju različitim antioksidativnim obrambenim mehanizmima (Alscher i sur. 2002). ROS su uglavnom slobodni radikali, tj. sadrže barem jedan nesporeni elektron, a čine ih superoksidni anion (O_2^-), hidroksidni radikal (HO), peroksilni radikal (RO_2) i alkosilni radikal (RO). ROS koje nisu slobodni radikali su jednostavni singletni kisik (1O_2) i vodikov peroksid (H_2O_2) (Sies 1985). ROS su važne kao ključni regulatori rasta, razvoja i obrane u biljnim stanicama. S druge strane, mogu biti vrlo toksični nusproizvodi aerobnog metabolizma (Demidchik 2015). Utječu nepovoljno na rast i metabolizam stanice jer uzrokuju lipidnu peroksidaciju, oksidaciju proteina, oštećenje nukleinskih kiselina i mutaciju DNA (Foyer i Noctor 2005; Mendoza 2011).



Slika 1. Utjecaj okolišnog stresa na biljku (Preuzeto prema Vukadinović 2020).

Višestruko nezasićene masne kiseline (eng. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA) koje grade stanične membrane veoma su osjetljive na napad ROS-a, što posljedi je lipidnom peroksidacijom (Labudda 2013). Oštećenja nastala lipidnom peroksidacijom određuju se mjerenjem količine krajnjih produkata tog procesa. Lipidnom peroksidacijom mogu nastati različiti aldehidi poput malondialdehida (MDA) i 4-hidroksinonenala (4-HNE) koji predstavljaju biomarkere oksidacijskog stresa. Malondialdehid se detektira koristeći tiobarbituratnu kiselinu (TBA). Pri toj reakciji nastaju obojeni produkti nazvani tiobarbiturne reaktivne supstance (TBARS) (Heath i Packer 1968). Produkti lipidne peroksidacije poput malondialdehida smanjuju fluidnost i povećavaju propusnost membrane (Gill i Tuteja 2010).

1.5. Antioksidativni odgovor u biljaka

Pri povećanju koncentracije ROS aktivira se antioksidativni sustav koji sadrži enzimske antioksidanse kao što su peroksidaze (POX), katalaza (CAT), superoksid-dismutaza (SOD) i enzimi askorbat-glutationskog ciklusa. Uz to, glutation, flavonoidi, karoteni, tokoferoli, askorbinska kiselina spadaju u neenzimske antioksidanse (Gupta 2011). Askorbat-glutationski ciklus djeluje u mitohondrijima, plastidima, peroksisomima i citosolu te ga čine enzimi askorbat-peroksidaza (APX), monodehidroaskorbat-reduktaza (MDHAR), dehidroaskorbat-reduktaza (DHAR) i glutation-reduktaza (GR) (Jimenez i sur. 1998; Meyer 2009). Antioksidansi utječu na smanjivanje lokalnih koncentracija kisika, uklanjaju ciljane ROS, uklanjaju metalne ione i slobodne radikale te singletni kisik. Inaktiviraju slobodne radikale donirajući im elektrone čime zaustavljaju lančanu reakciju stvaranja novih slobodnih radikala i sprječavaju njihovo štetno djelovanje (Štefan i sur. 2007). Poznato je da je održavanje što većeg antioksidacijskog kapaciteta u stanici u korelaciji s većom tolerancijom na stres (Dat i sur. 1998; Pedrajas i sur. 1993; Thomas i sur. 1999).

1.5.1. Glutation

Glutation je tiolni tripeptid građen od aminokiselina cisteina, glutamata i glicina. U biljnim tkivima većinom je prisutan u reduciranom obliku (GSH) sa slobodnom tiolnom skupinom, ali pojavljuje se i u oksidiranom obliku (GSSG) s disulfidnom vezom između dvije molekule GSH (Gill i sur. 2013). GSH se koristi kao marker oksidacijskog stresa u biljaka (Tausz i sur. 2004). Tiolna skupina GSH vrlo lako reagira s ROS čime se oksidira i nastaje oksidirani oblik glutaciona (GSSG) (Waśkiewicz 2014a). Redukcija GSSG u GSH se odvija pomoću glutation-reduktaze (GR), u NADPH ovisnoj reakciji. Omjer GSSG/GSH pokazatelj je oksidacijskog stanja i detoksikacijskog kapaciteta stanice (Gill i Tuteja 2010). Terry i sur. (2000) tvrde da GSH reagirajući sa Se može direktno utjecati na formiranje SeMet i SeCys – aminokiseline koje bi se u konačnici ugradile u proteine. Glutation ima važnu ulogu u regulaciji enzima, održavanju stabilnosti proteina, djeluje na ekspresiju gena te diferencijaciju traheja i stanica (Ogawa i sur. 2001; Xiang i sur. 2001; Srivalli i Khanna-Chopra 2008).

1.5.2. Glutation-reduktaza

Glutation-reduktaza je flavoprotein iz skupine oksidoreduktaza. Enzim je koji osigurava dovoljnu količinu reduciranog glutaciona (GSH) za normalno odvijanje askorbat-glutationskog ciklusa (Foyer i Halliwell 1976). Može reducirati GSSG i pomoću NADH, ali ima vrlo nizak afinitet za NADH (Halliwell i Foyer 1978). Glutation-reduktaza ima funkciju

antioksidansa uklanjajući vodikov peroksid i vodikov superoksid. Nalazi se u citosolu, mitohondriju, peroksisomima i kloroplastima gdje joj je najveća aktivnost (Creissen i Mullineaux 1995; Jimenez i sur. 1997). Različiti biotički i abiotički faktori imaju utjecaj na aktivnost glutathion-reduktaze u biljkama. Dokazano je da su biljke izložene teškim metalima poput bakra, željeza, cinka, kadmija pokazale smanjenje aktivnosti GR (Gallego i sur. 1996). Wang i sur. (2011) su utvrdili da selenat uzrokuje povećanje aktivnosti GR u bijeloj djetelini izloženoj suši.

1.5.3 Glutation-peroksidaza

Postoji barem 7 vrsta glutathion-peroksidaza (GPX) sa specifičnim obilježjima, ulogom i sintezom (Rotruck i sur. 1973). Iako su većina GPX homotetrameri, postoje i monomeri (GPX4). GPX4 ima sposobnost reagiranja sa složenim membranskim lipidima zahvaljujući svojoj maloj veličini i vodoodbojnoj površini (Brigelius-Flohe 2007). Sve GPX reduciraju H_2O_2 i alkilne hidroperoksidi na račun glutathiona. GPX sudjeluje u zaštiti od oksidacijskog stresa pri čemu koristi glutathion kao supstrat. Također, GPX se natječe s katalazom za H_2O_2 kao supstrat. U životinjskim stanicama i eritrocitima ljudi, GPX se smatra najutjecajnijim antioksidacijskim enzimom za detoksifikaciju H_2O_2 jer katalaza ima manji afinitet za H_2O_2 nego GPX (Valko i sur. 2006). Mostofa i sur. (2017) ukazuju na povećanje aktivnosti GPX u biljkama riže tretiranim selenatom. Aktivnost GPX mogu pojačati selenidi, diselenidi i ebselen te adenovirusi (Robertson i Harmon 2007; Back i Moussa 2003; Konorev i sur. 1999).

1.5.4. Askorbat-peroksidaza

Askorbat-peroksidaza (APX) katalizira pretvorbu vodikova peroksida (H_2O_2) u H_2O koristeći askorbat kao elektron donora (Gill i Tuteja 2010). U reakciji redukcije jedne molekule H_2O_2 potrebne su dvije molekule askorbata pri čemu nastaju dvije molekule H_2O i dvije molekule monodehidroksiaskorbata (Ambriović Ristov 2007). Postoji nekoliko različitih izoformi askorbat-peroksidaze: tilakoidna (tAPX), citosolna (cAPX), izoforma u membranama glioksisoma (gmAPX) i u stromi kloroplasta (sAPX) (Noctor i Foyer 1998). Ríos i sur. (2008) su utvrdili da selenat uzrokuje porast aktivnosti APX u listovima salate.

1.5.5. Askorbinska kiselina

Askorbinska kiselina ili vitamin C antioksidans je koji se nalazi u voću i povrću. Osim u obrani stanice od oksidativnog oštećenja, sudjeluje u brojnim metaboličkim procesima kao

kofaktor enzima. Uklanja ROS dajući jedan ili dva elektrona i time nastaju slabo reaktivni askorbil-radikal (Ghosh i sur. 1996). Askorbinska kiselina održava vitamin E u aktivnom obliku, reducirajući okoferoksilni radikal koji nastaje oksidacijom vitamina E (Tanaka i sur. 1997). Sudjeluje u hormonskoj signalizaciji, regulira diobu stanica, a ima ulogu i u obrani od patogena te senescenciji (Smirnoff 1996; Gallie 2013). Askorbinska kiselina najviše je lokalizirana u potpuno razvijenim listovima, meristemskim tkivima i plodovima nekih biljaka (Davey i sur. 2000). Huang i sur. (2018) su proveli istraživanje i dokazali da selenat aktivira AsA-GSH ciklus u listovima jagode.

1.6. Cilj diplomskog rada

Cilj ovog istraživanja je odrediti učinak različitih vrsta nanočestica Se na oksidacijski status i enzime antioksidativnog sustava u listovima rukole. Uz to, utvrditi postoji li razlika u utjecaju između nanočestica selena i anorganskog oblika Se na odgovor antioksidativnog sustava kod rukole.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Opis eksperimenta

U istraživanju je korišteno sjeme rukole (*Tricia*, Enza Zaden, Nizozemska). Vrijeme obavljanja sjetve je 1.10.2020. godine. Sjeme je posijano u polistirenske kontejnere s 40 sjetvenih mjesta, a u svakom mjestu je postavljeno po tri sjemenke rukole. Nakon nicanja obavljeno je prorjeđivanje kako bi ostale dvije biljke po sjetvenom mjestu što dovodi do 80 biljaka po kontejneru. Korištena su dva kontejnera te je ukupno bilo 160 biljaka po jednoj varijanti pokusa. Prvotno su polistirenski kontejneri napunjeni vermikulitom koji ima veliku sposobnost upijanja vode. Na dno sjetvenog mjesta dodano je malo komercijalnog supstrata (Klassmann Potgrond P) radi sprječavanja istjecanja vermikulita. Nicanje rukole je trajalo sedam dana. Kontejneri s biljkama su 16. dan nakon sjetve premješteni u bazene s različitim oblicima i različitim koncentracijama selena. Premještanje je obavljeno u cilju biofortifikacije sa selenom i procjene utjecaja različitih kemijskih oblika selena; selenata i nanoselena. Bazeni su bili dimenzija 80 x 120 cm, dubine 30 cm te je visina hranjive otopine iznosila 20 cm. Ukupno je korišteno 200 litara hranjive otopine po jednom bazenu. U eksperimentu je korištena standardna hranjiva otopina prema Hoaglandu (tablica 1), no koncentracija svih esencijalnih elemenata umanjena je za 50% kako se preporučuje za uzgoj lisnatog povrća. Sastav hranjive otopine u svim varijantama pokusa je identičan, samo je mijenjena koncentracija Se. Cijeli vegetacijski pokus je proveden u grijanom plasteniku s kontrolom temperature i prozračivanja. Temperatura je u plasteniku iznosila 19,5-22°C tijekom dana, a 14,5-16°C tijekom noći. Eksperiment je postavljen prema split-plot shemi u 4 ponavljanja (40 biljaka po ponavljanju) kao višefaktorijski. Ukupno je bilo 9 različitih varijanti – 8 različitih strategija biofortifikacije i 1 kontrolna varijanta bez dodatka Se. Se je upotrijebljen u 4 različita kemijska oblika; natrijev selenat (Na_2SeO_4) i 3 vrste selenovih nanočestica koje su bile obložene polisorbitom (PS-SeNPs), huminskom kiselinom (HA-SeNPs) i polivinilpirolidonom (PVP-SeNPs). Biljke su uzorkovane 39. dan nakon sjetve kada su dosegle tehnološku zrelost za berbu. Iz svakog ponavljanja je uzorkovano 20 biljaka za analizu mineralnog sastava, a preostalih 20 biljaka po ponavljanju je uzorkovano za analizu enzimatskih i neenzimatskih pokazatelja oksidativnog stresa. Prethodno su izvršena mjerenja svih morfoloških parametara rasta i razvoja biljke u uvjetima ovoga eksperimenta.

Tablica 1. Recept za hranjivu otopinu korištenu tijekom vegetacijskog pokusa sa rukolom.

Komponenta	Bazna otopina	ml po 1L hranjive otopine
Makroelementi		
1M KNO ₃	202 g/L	2,5
1M Ca(NO ₃) ₂ •4H ₂ O	236 g/0.5L	2,5
Iron (Sprint 138 iron chelate)	15 g/L	0,75
1M MgSO ₄ •7H ₂ O	493 g/L	1
1M NH ₄ NO ₃	80 g/L	0,5
Mikroelementi		
H ₃ BO ₃	2,86 g/L	0,5
MnCl ₂ •4H ₂ O	1,81 g/L	0,5
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,22 g/L	0,5
CuSO ₄ •5H ₂ O	0,051 g/L	0,5
H ₂ MoO ₄ •H ₂ O or	0,09 g/L	0,5
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0,12 g/L	0,5
Fosfor u obliku fosfata		
1M KH ₂ PO ₄ (pH to 6.0)	136 g/L	0,25

Selen je bio primijenjen u sljedećim koncentracijama po varijantama pokusa:

PS-80 – PS-SeNPs – 80 $\mu\text{mol Se/m}^3$

PS-160 – PS-SeNPs – 160 $\mu\text{mol Se/m}^3$

PS-320 – PS-SeNPs – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$

PVP-320 – PVP-SeNPs – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$

K – Kontrola

HA-80 – HA-SeNPs – 80 $\mu\text{mol Se/m}^3$

HA-160 – HA-SeNPs – 160 $\mu\text{mol Se/m}^3$

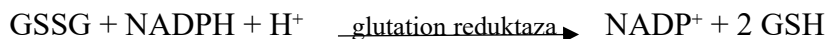
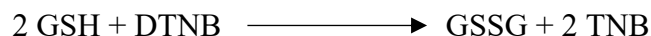
HA-320 – HA-SeNPs – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$

SEL-320 – Na₂SeO₄ – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$

2.2. Određivanje koncentracije ukupnog glutaciona

Koncentracija ukupnog glutaciona (tGSH) mjeri se spektrofotometrijski. Primijenjena je kinetička metoda u kojoj GSH uzrokuje kontinuiranu redukciju 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoične kiseline (DTNB). Kao rezultat, nastaje žuto obojeni produkt 5-tio-2-nitrobenzoična kiselina (TNB) i GSSG koji se reciklira pomoću enzima glutation-reduktaze (GR) i NADPH (Nair i

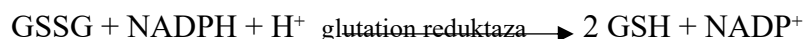
sur. 1991; Akerboom i Sies 1981). Nastankom TNB-a, dolazi do porasta apsorbancije koja se mjeri na 412 nm.



Reakcijska smjesa za mjerenje ukupnog glutaciona ((tGSH=GSH+GSSG) sastojala se od reakcijskog pufera (100 mM kalij-fosfatnog pufera + 1 mM EDTA, Ph 7.0), otopine GR (6U/mL) i otopine DTNB koncentracije $1.5 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$. Reakcijska smjesa je promiješana na vibracijskoj miješalici. U UV kivetu dodano je 750 μL reakcijske smjese i 50 μL uzorka, a zatim je ekvilibrirana na 5 minuta kako bi se otopina stabilizira. Nakon toga dodana je otopina NADPH koncentracije $0.16 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$. Porast apsorbancije pratio se na 412 nm svake minute tijekom 5 minuta. Koncentracija tGSH izražena je kao nmol GSH po g svježe tvari.

2.3. Određivanje aktivnosti glutation-reduktaze

Aktivnost GR određena je metodom koju su opisali Halliwell i Foyer (1978). Metoda se temelji na redukciji oksidiranog oblika glutaciona (GSSG) u prisutnosti GR uz NADPH kao reducens.



Reakcijska smjesa sadržavala je reakcijski pufer (100 mM kalij-fosfatnog pufera + 1 mM EDTA, pH 7.5), 2 mM otopinu GSSG-a, 50 μL enzimskog ekstrakta i 2 mM otopinu NADPH. Oksidacijom NADPH dolazi do pada apsorbancije koja je praćena na 340 nm svakih 10 sekundi tijekom 2 minute. GR je izražena u enzimskim jedinicama (U) koje predstavljaju količinu enzima koji katalizira oksidaciju 1 μmola NADPH po g proteina.

2.4. Određivanje aktivnosti glutation-peroksidaze

Aktivnost GPX određena je modificiranom metodom koju je opisao Wendel (1980), a koristi se H_2O_2 kao supstrat. Metoda je prilagođena za kinetičko mjerenje u mikrotitarskim pločicama s 96 jažica. Metoda se temelji na redukciji H_2O_2 u H_2O pomoću GPX, pri čemu se GSH oksidira u GSSG. Zatim, pomoću GR, GSSG se reducira natrag u GSH pri čemu se NADPH oksidira u NADP^+ . Smanjenjem količine NADPH-a dolazi do smanjenja apsorbancije što se prati na 340 nm. Reakcijska smjesa sadržavala je 0,12 mM NADPH, 3,2 U GR-a, 1 mM GSH i proteinski ekstrakt u 50 mM kalij-fosfatnom puferu s 0,4

mM EDTA (pH 7.0), u ukupnom volumenu od 300 μ l. Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi, reakcija je započeta dodavanjem H₂O₂ konačne koncentracije 0,0007%. Reakcija je praćena spektrofotometrijski na 340 nm. Aktivnost GPX računa se koristeći molarni ekstinkcijski koeficijent za NADPH, a izražena je u jedinicama aktivnosti GPX po gramu proteina.

2.5. Određivanje aktivnosti askorbat-peroksidaze

Za određivanje aktivnosti askorbat-peroksidaze (APX) u ekstraktima korištena je metoda koju su opisali Nakano i Asada (1981). Reakcijska smjesa sastojala se od 50 mM kalij-fosfatnog pufera s 0,1 mM EDTA, 50 mM askorbinske kiseline i 50 μ L proteinskog ekstrakta (razrijeđenog i nerazrijeđenog). Nakon inkubacije na sobnoj temperaturi, reakcija je započeta dodatkom 10 μ L H₂O₂ koncentracije 12 mM. Ukupna aktivnost APX je izmjerena spektrofotometrijski prateći pad apsorbancije na 290 nm svake sekunde tijekom 2 minute. APX je izražena kao količina (μ mol) razgrađenog askorbata po minuti po miligramu proteina, odnosno u jedinicama aktivnosti APX po miligramu proteina.

2.6. Određivanje koncentracije askorbinske kiseline

Koncentracija askorbinske kiseline određena je metodom koju su opisali Benderitter i sur. (1998). Askorbinska kiselina se određuje u svježe pripremljenim vodenim ekstraktima biljnog tkiva. U usitnjeno tkivo (0,2 g) dodano je 1 ml dH₂O. Homogenati su centrifugirani 5 minuta pri 6000 g na temperaturi 4°C. U dobiveni supernatant (300 μ l) dodana je 13%-tna otopina trikloroetene kiseline (TCA), dH₂O i 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) reagens. Reakcijska smjesa je inkubirana 60 minuta u vodenoj kupelji na temperaturi 37 °C. Nakon inkubacije, u reakcijsku smjesu dodana je 65%-tne H₂SO₄. Apsorbancija dobivene otopine mjerena je pri valnoj duljini od 520 nm. Koncentracija askorbinske kiseline određena je pomoću jednadžbe pravca standardnog dijagrama u kojem su kao standardi korištene rastuće koncentracije askorbinske kiseline. Rezultati su izraženi u mg AA po 100 grama svježe tvari (mg /100 g svježe tvari).

2.7. Određivanje količine produkata lipidne peroksidacije

Za određivanje količine produkata LPO korištena je metoda koju su opisali Verma i Dubey (2003), mjerenjem TBARS-a, uglavnom MDA. Usitnjeno tkivo je ekstrahirano s 1 ml 0,1%-tne otopine TCA. Homogenati su inkubirani 10 minuta na ledu te potom centrifugirani 5 minuta pri 6000 g na temperaturi 4°C. Dobivenom supernatantu (0,5 ml) dodan je 1 ml otopine

0,5%-tne tiobarbiturne kiseline u 20%-tnoj otopini TCA. Reakcijska smjesa je promiješana na vibracijskoj miješalici i stavljena u vodenu kupelj na 95°C. U reakcijskoj smjesi dolazi do raspada lipidnih peroksida te nastaju produkti (većinom MDA) koji reagiraju s tiobarbiturnom kiselinom. Nakon 30 minuta inkubacije, reakcija je zaustavljena držanjem 10 minuta na ledu. Reakcijska smjesa je zatim centrifugirana 10 minuta pri 22 000 g na temperaturi 4°C. Apsorbancija je mjerena pri valnim duljinama na 532 nm i 600 nm, pri čemu se apsorbancija pri 600 nm oduzima od apsorbancije pri 532 nm zbog korekcije za nespecifičnu reakciju. Količina TBARS-a, to jest MDA, određena je pomoću jednadžbe pravca standardnog dijagrama, a kao standard korišten je 1,1,3,3-tetrametoksipropan. Rezultati su izraženi kao nmol po gramu svježe tvari.

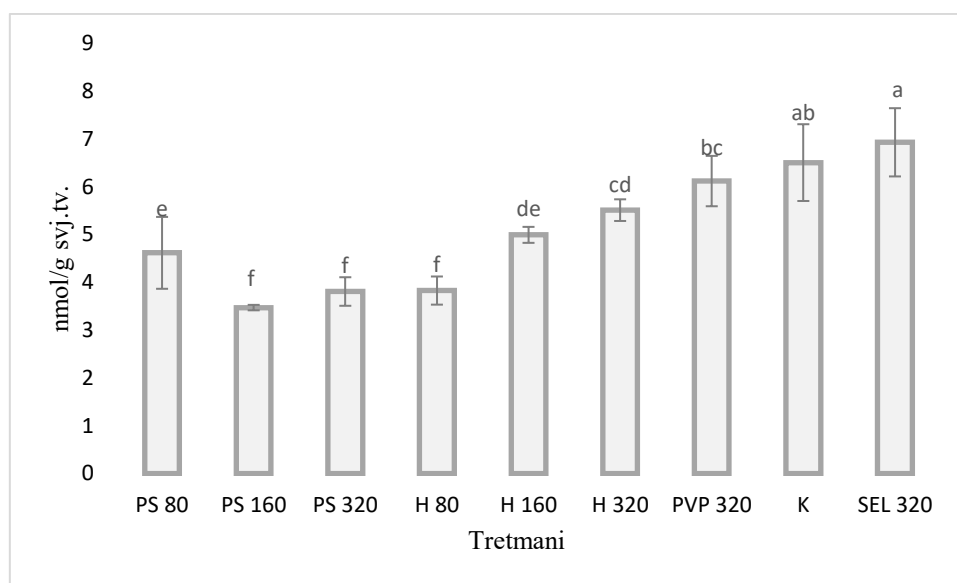
2.8. Statistička obrada podataka

Podaci dobiveni ovim istraživanjem obrađeni su u statističkom programu Statistica 14.0.0.15 (TIBCO Inc., SAD), a rezultati su izraženi kao srednje vrijednosti \pm standardna devijacija (SD). Normalnost distribucije testirana je Shapiro-Wilksovim testom, a s obzirom na normalnu distribuciju i homogenost varijanci korištena je jednofaktorska analiza varijance (engl. *One-way ANOVA*). Nakon jednofaktorske analize, proveden je LSD post hoc test kako bi se odredilo između kojih skupina postoji razlika. Svi testovi provedeni su na razini značajnosti od 5% ($p < 0,05$).

3. REZULTATI

3.1. Utjecaj različitih vrsta nanočestica selen a i natrijevog selenata na količinu produkata lipidne peroksidacije u listovima rukole

Razina lipidne peroksidacije u listovima rukole praćena je mjerenjem kolićine reaktivnih vrsta tiobarbituratne kiseline (TBARS). Rezultati su pokazali statistiĉki znaćajno smanjenje lipidne peroksidacije kod tretmana PS 80, PS 160, PS 320, H 80, H 160 i H 320 u odnosu na kontrolu (Slika 8). Kolićina TBARS-a u listovima rukole se smanjila, u odnosu na kontrolu, za 29,01% kod tretmana PS 80, za 46,63% kod tretmana PS 160, za 41,45% kod tretmana PS 320, za 41,14% kod tretmana H 80, za 23,23% kod tretmana H 160 i za 15,28% kod tretmana H 320. Tretmani PVP 320 i SEL 320 nisu uzrokovali statistiĉki znaćajnu promjenu vrijednosti lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu.

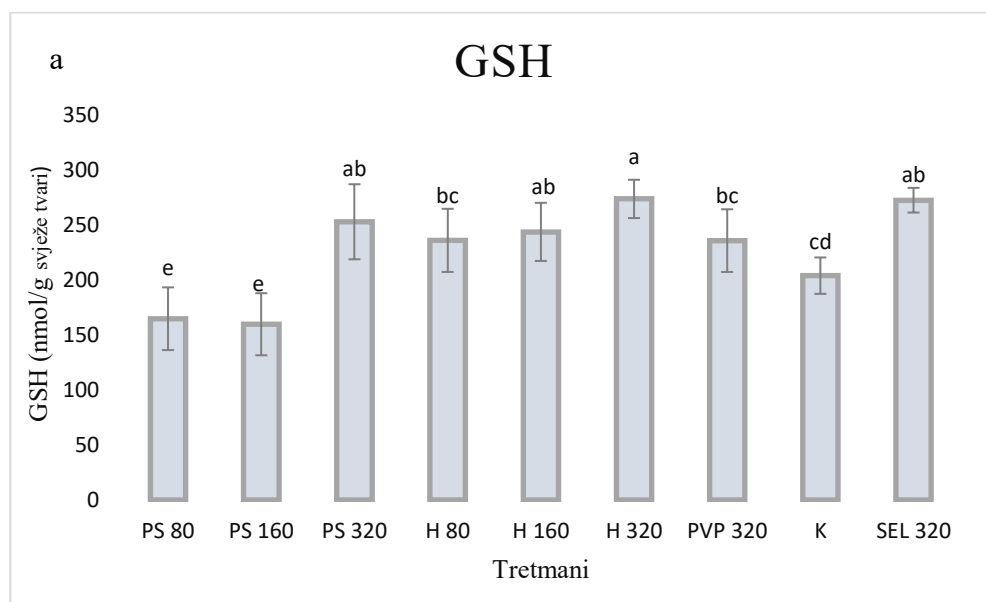


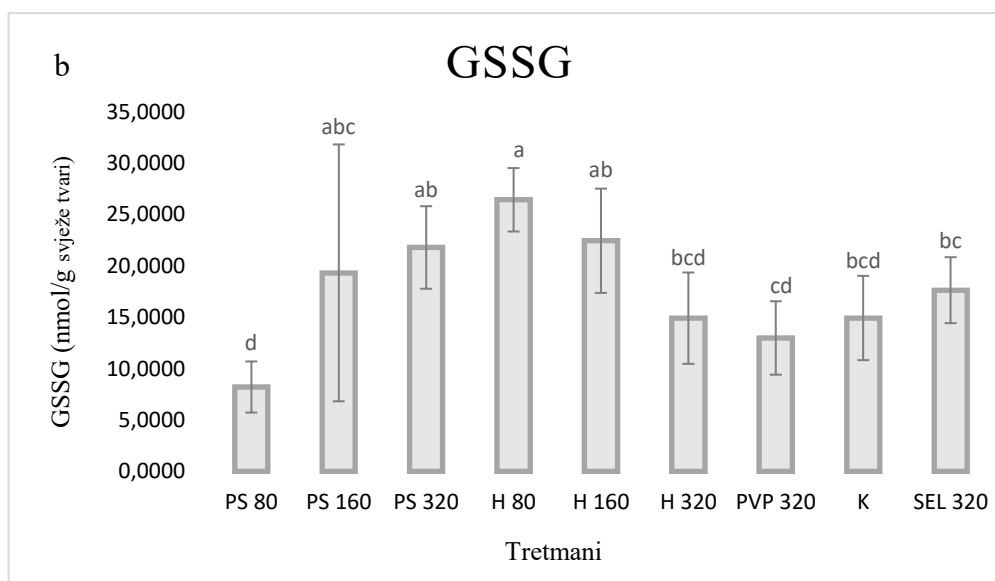
Slika 2. Kolićina TBARS-a u listovima rukole nakon tretmana razliĉitim vrstama nanoćestica selen a. Nanoćestice Se stabilizirane s polisorbatom (PS80 – 80 $\mu\text{mol Se/m}^3$, PS160 – 160 $\mu\text{mol Se/m}^3$, PS320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$), s huminskom kiselinom (H80 – 80 $\mu\text{mol Se/m}^3$, H160 – 160 $\mu\text{mol Se/m}^3$, H320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$), s polivinilpirolidonom (PVP320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$) i s natrijevim selenatom (SEL320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$), K – kontrola. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Razlike izmeću skupina testirane su Duncan post hoc testom. Razliĉita slova (a,b,c) oznaćavaju statistiĉki znaćajne razlike izmeću pojedinih skupina ($p < 0,05$).

3.2. Utjecaj različitih vrsta nanočestica seleni i natrijevog selenata na koncentraciju reduciranog i oksidiranog glutationa u listovima rukole

U listovima rukole, koncentracija reduciranog glutationa (GSH) u odnosu na kontrolu, značajno se smanjila uslijed tretmana PS 80 i PS 160, dok su tretmani PS 320, H 160, H 320 i SEL 320 rezultirali povećanjem koncentracije GSH (Slika 4, a). Koncentracija GSH u listovima rukole se smanjila, u odnosu na kontrolu, za 19,21% kod tretmana PS 80 i za 21,66% kod tretmana PS 160. Koncentracija GSH u listovima rukole se povećala, u odnosu na kontrolu, za 24,02% kod tretmana PS 320, za 19,50% kod tretmana H 160, za 34,22% kod tretmana H 320 i za 33,64% kod tretmana SEL 320. Tretmani H 80 i PVP 320 također su uzrokovali povećanje koncentracije GSH, ali povećanje nije bilo statistički značajno.

Rezultati mjerenja oksidiranog glutationa (GSSG) u listovima rukole, pokazali su statistički značajno povećanje, u odnosu na kontrolu, samo kod H 80 tretmana (Slika 4, b). Koncentracija GSSG u listovima rukole nakon H 80 tretmana iznosila je $26,452 \pm 3,09 \text{ nmol g}^{-1}$ svježe tvari, odnosno povećala se, u odnosu na kontrolu, za 77,04%. Tretmani PS 160, PS 320, H 160 i SEL 320 također su uzrokovali povećanje koncentracije GSSG, ali povećanje nije bilo statistički značajno. S druge strane, tretmani PS 80, PVP 320 i H 320 su uzrokovali smanjenje koncentracije GSSG, ali smanjenje nije bilo statistički značajno.

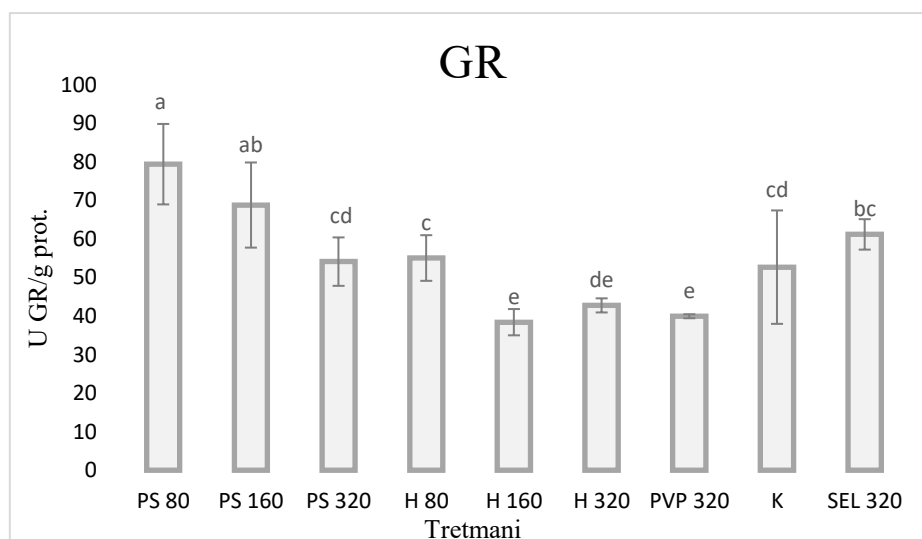




Slika 3. Koncentracija reduciranog (a) i oksidiranog (b) glutaciona u listovima rukole nakon tretmana različitim vrstama nanočestica selen. Nanočestice Se stabilizirane s polisorbatom (PS80 – 80 $\mu\text{mol Se/m}^3$, PS160 – 160 $\mu\text{mol Se/m}^3$, PS320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$), s huminskom kiselinom (H80 – 80 $\mu\text{mol Se/m}^3$, H160 – 160 $\mu\text{mol Se/m}^3$, H320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$), s polivinilpirolidonom (PVP320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$) i s natrijevim selenatom (SEL320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$), K – kontrola. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova (a,b,c) označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).

3.3. Utjecaj različitih vrsta nanočestica selen i natrijevog selenata na aktivnost glutation-reduktaze u listovima rukole

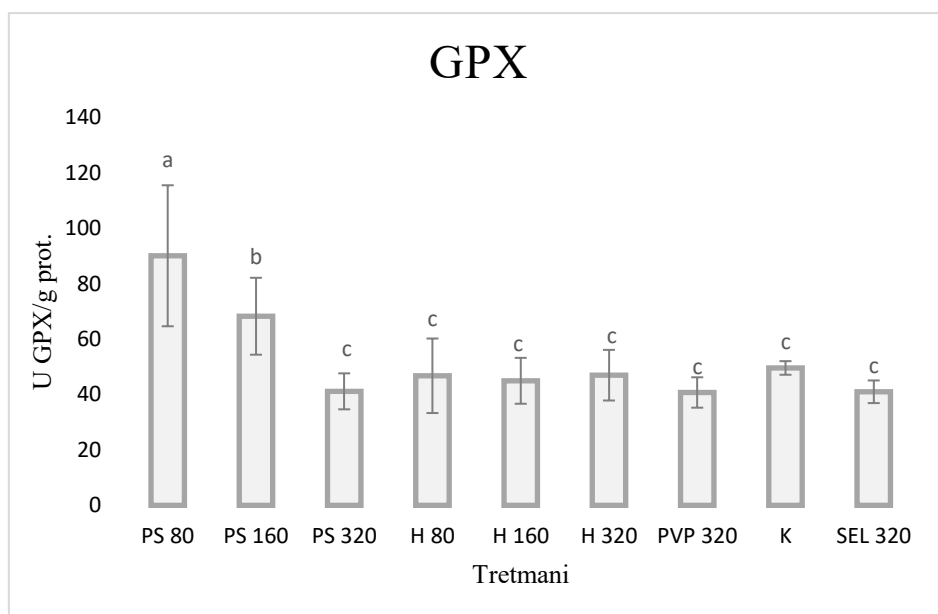
U listovima rukole, aktivnost glutation-reduktaze (GR) u odnosu na kontrolu, značajno se smanjila uslijed tretmana H 160 i PVP 320, dok su tretmani PS 80 i PS 160 rezultirali povećanjem aktivnosti GR (Slika 5). Aktivnost GR u listovima rukole se smanjila, u odnosu na kontrolu, za 27,11% kod tretmana H 160 i za 24,18% kod tretmana PVP 320. Uz to, pri tretmanu H 320 aktivnost GR se također smanjila, ali ne statistički značajno. Aktivnost GR u listovima rukole se povećala, u odnosu na kontrolu, za 50,7% kod tretmana PS 80 i za 30,58% kod tretmana PS 160. Tretmani PS 320, H 80 i SEL 320 također su uzrokovali povećanje aktivnosti GR, ali povećanje nije bilo statistički značajno.



Slika 4. Aktivnost glutation-reduktaze (GR) u listovima rukole nakon tretmana različitim vrstama nanočestica selen. Nanočestice Se stabilizirane s polisorbatom (PS80 – 80 $\mu\text{mol Se/m}^3$, PS160 – 160 $\mu\text{mol Se/m}^3$, PS320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$), s huminskom kiselinom (H80 – 80 $\mu\text{mol Se/m}^3$, H160 – 160 $\mu\text{mol Se/m}^3$, H320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$), s polivinilpirolidonom (PVP320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$) i s natrijevim selenatom (SEL320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$), K – kontrola. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova (a,b,c) označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).

3.4. Utjecaj različitih vrsta nanočestica selen i natrijevog selenata na aktivnost glutation-peroksidaze u listovima rukole

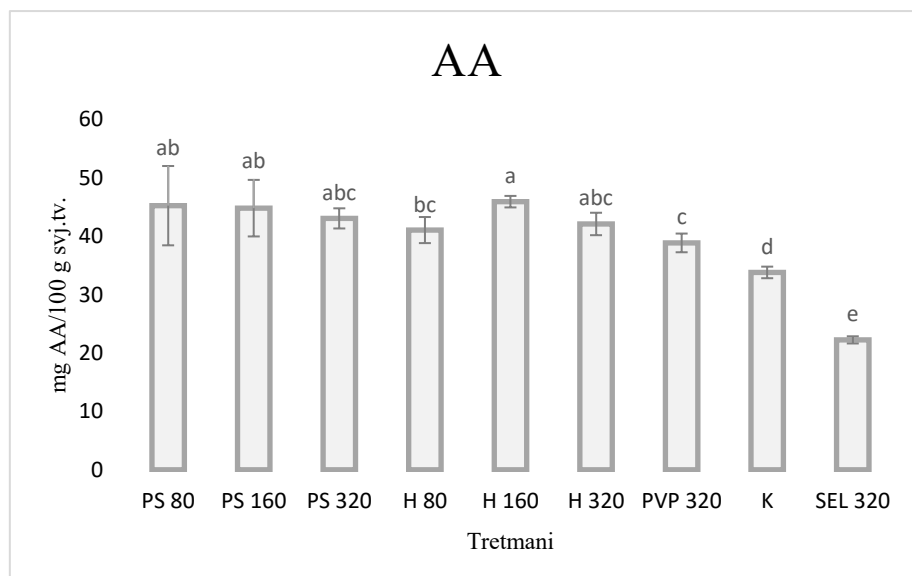
Rezultati mjerenja aktivnosti glutation-peroksidaze (GPX) u listovima rukole pokazali su statistički značajno povećanje, u odnosu na kontrolu, kod tretmana PS 80 i PS 160 (Slika 6). Aktivnost GPX je nakon PS 80 tretmana iznosila $90,111 \pm 25,454 \text{ U g}^{-1} \text{ prot.}$, odnosno povećala se, u odnosu na kontrolu, za 81,66%. Tretman PS 160 uzrokovao je povećanje aktivnosti GPX od 37,65% ($68,279 \pm 13,886 \text{ U g}^{-1} \text{ prot.}$), u odnosu na kontrolu. Ostali tretmani (PS 320, H80, H160, H320, PVP 320 i SEL 320) su uzrokovali smanjenje aktivnosti GPX, ali smanjenje nije bilo statistički značajno.



Slika 5. Aktivnost glutation-peroksidaze (GPX) u listovima rukole nakon tretmana različitim vrstama nanočestica selen. Nanočestice Se stabilizirane s polisorbatom (PS80 – 80 $\mu\text{mol Se/m}^3$, PS160 – 160 $\mu\text{mol Se/m}^3$, PS320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$), s huminskom kiselinom (H80 – 80 $\mu\text{mol Se/m}^3$, H160 – 160 $\mu\text{mol Se/m}^3$, H320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$), s polivinilpirolidonom (PVP320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$) i s natrijevim selenatom (SEL320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$), K – kontrola. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova (a,b,c) označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).

3.5. Utjecaj različitih vrsta nanočestica selen i natrijevog selenata na koncentraciju askorbinske kiseline u listovima rukole

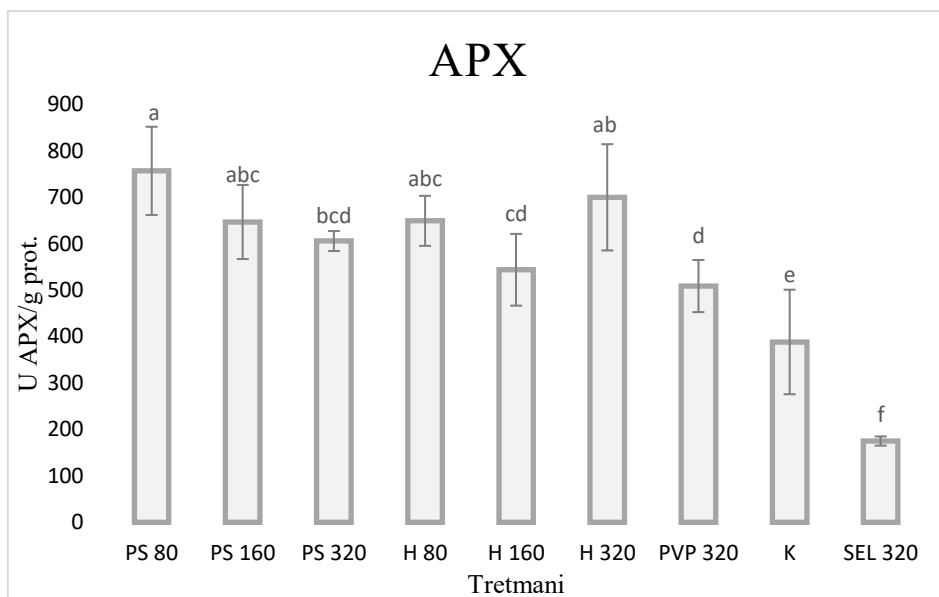
Koncentracija askorbinske kiseline (AA) u listovima rukole se značajno smanjila, u odnosu na kontrolu, samo kod tretmana SEL 320 (Slika 9). Koncentracija AA u listovima rukole tretirane SEL 320 tretmanom iznosila je $22,261 \pm 0,615$ mg AA/100 g svježe tvari, odnosno koncentracija se smanjila za 34,18% u odnosu na kontrolu. Koncentracija AA u listovima rukole se povećala, u odnosu na kontrolu, za 33,83% kod tretmana PS 80, za 32,56% kod tretmana P 160, za 27,38% kod tretmana PS 320, za 21,46% kod tretmana H 80, za 35,85% kod tretmana H 160, za 24,56% kod tretmana H 320, za 14,96% kod tretmana PVP 320.



Slika 6. Koncentracija askorbinske kiseline (AsA) u listovima rukole nakon tretmana različitim vrstama nanočestica selen. Nanočestice Se stabilizirane s polisorbatom (PS80 – 80 $\mu\text{mol Se/m}^3$, PS160 – 160 $\mu\text{mol Se/m}^3$, PS320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$), s huminskom kiselinom (H80 – 80 $\mu\text{mol Se/m}^3$, H160 – 160 $\mu\text{mol Se/m}^3$, H320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$), s polivinilpirolidonom (PVP320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$) i s natrijevim selenatom (SEL320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$), K – kontrola. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova (a,b,c) označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).

3.6. Utjecaj različitih vrsta nanočestica selen i natrijevog selenata na aktivnost askorbat-peroksidaze u listovima rukole

Nakon tretmana rukole s natrijevim selenatom, aktivnost askorbat-peroksidaze (APX) u listovima se statistički značajno smanjila, u odnosu na kontrolu (Slika 7). pri čemu se aktivnost APX smanjila za 54,92% u odnosu na kontrolu. S druge strane, aktivnost APX u listovima rukole se povećala, u odnosu na kontrolu, za 94,84% kod tretmana PS 80, za 66,51% kod tretmana PS 160, za 55,95% kod tretmana PS 320, za 67,14% kod tretmana H 80, za 40,02% kod tretmana H 160, za 80,19% kod tretmana H 320 i za 30,99% kod tretmana PVP 320.



Slika 7. Aktivnost askorbat-peroksidaze (APX) u listovima rukole nakon tretmana različitim vrstama nanočestica selen. Nanočestice Se stabilizirane s polisorbatom (PS80 – 80 $\mu\text{mol Se/m}^3$, PS160 – 160 $\mu\text{mol Se/m}^3$, PS320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$), s huminskom kiselinom (H80 – 80 $\mu\text{mol Se/m}^3$, H160 – 160 $\mu\text{mol Se/m}^3$, H320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$), s polivinilpirolidonom (PVP320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$) i s natrijevim selenatom (SEL320 – 320 $\mu\text{mol Se/m}^3$), K – kontrola. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna devijacija. Razlike između skupina testirane su Duncan post hoc testom. Različita slova (a,b,c) označavaju statistički značajne razlike između pojedinih skupina ($p < 0,05$).

4. RASPRAVA

Nanočestice selena privlače pozornost mnogih istraživača zbog svoje niske toksičnosti, biokompatibilnosti i bioraspoloživosti (Bisht i sur. 2021). Međutim, uska granica između učinkovite i toksične doze ograničila je upotrebu Se (Zhai i sur. 2017). Ovisno o koncentraciji, trajanju i stupnju oksidacije, Se ima antioksidativno i prooksidativno djelovanje (Khurana i sur. 2019). Ramos i sur. (2010) tvrde da aplikacija Se u obliku selenata i selenita ima dva učinka na zelenu salatu; pri niskim koncentracijama (2, 4, 8 i 16 $\mu\text{mol/l}$) djeluju kao antioksidansi i pojačavaju rast biljke, dok pri visokim koncentracijama (32 i 64 $\mu\text{mol/l}$) smanjuju prinos. Sve je više znanstvenih istraživanja koja ukazuju na zaštitnu ulogu različitih kemijskih oblika Se protiv oksidativnog stresa u biljkama. Nekoliko je studija izvijestilo o blagotvornim učincima nižih koncentracija Se na povećanje antioksidativne aktivnosti što dovodi do boljeg prinosa biljaka (Lyons i sur. 2003). Jiang i sur. (2017) utvrdili su da je Se značajno ublažio posljedice povišenog saliniteta u biljkama kukuruza putem poboljšanja fotosintetskog kapaciteta i antioksidativnog obrambenog sustava povećanjem aktivnosti enzima APX i SOD. Pri povećanim razinama stresa (suša), dodavanje Se značajno je povećalo razinu i aktivnost antioksidativnog sustava, kao i prinos zrna kukuruza (Sajedi i sur. 2011). Nanočestice selena djeluju kao stimulator antioksidativnog obrambenog sustava u kultivarima kikirija što dovodi do poboljšanja tolerancije biljaka u pjeskovitom tlu (Hebat-Allah i sur. 2019). Xu i sur. (2003) utvrdili su da je antioksidativna aktivnost zelenog čaja obogaćenog Se uvelike povećana u usporedbi s običnim zelenim čajem. Prema Ekanayake i sur. (2015) selenat i selenit dovode do povećanja antioksidativne aktivnosti leće u usporedbi s kontrolom. Selen znatno povećava aktivnost enzimatskih (CAT, SOD i APX) i neenzimatskih (glutathion i AsA) antioksidansa u listovima i lukovicama luka pri povišenom salinitetu (Semida i sur. 2021). Antioksidativno svojstvo nanočestica Se uglavnom je povezano sa selenoenzimima, tioredoksin-reduktazom (TrxR) i obitelji enzima GPX (Zhang i sur. 2001). Nanočestice Se također imaju sposobnost stvaranja ROS (prooksidativni učinak) (Zhao i sur. 2018). Kondaparthi (2019) objašnjava prooksidativni mehanizam nanočestica Se na način da se nanoselen reducira putem TrxR/GSH/GR/GRx i dovodi do stvaranja selenidnog aniona (Se^-) korištenjem $\text{NAPDH}+\text{H}^+$, pri čemu dolazi do stvaranja slobodnih radikala i ROS-a.

Peroksidacija lipida može se opisati kao proces u kojem slobodni radikali napadaju lipide, posebno višestruko nezasićene masne kiseline (Ayala i sur. 2014). Količina produkata LPO jedan je od glavnih pokazatelja oksidativnog stresa. Rezultati ovog istraživanja pokazuju

statistički značajno smanjenje količine produkata LPO kod svih tretmana nanočesticama Se (Slika 2), osim PVP320 koji nije uzrokovao statistički značajnu razliku, u odnosu na kontrolu. Što se tiče djelovanja selenata, pokazano je kako selenat ne utječe značajno na količinu TBARS-a u listovima rukole. Pozitivno djelovanje Se na stanične membrane pokazala su i druga istraživanja. Tako su Djanaguiraman i sur. (2018) utvrdili su da nanočestice Se održavaju fluidnost i lipidni dvosloj u uvjetima visoke temperature u biljkama sirka. Kod ječma uzgajanog u uvjetima povišenog saliniteta tretman nanoselenom je uzrokovao smanjenje oštećenja staničnih membrana posredovanih ROS-om (Garza-García i sur. 2021). Hartikainen i sur. (2000) u svom istraživanju povezuju primjenu Se sa smanjenom peroksidacijom lipida i samim time pospješenim rastom biljke ljulja. U izdanku ljulja, peroksidacija lipida smanjila se pri niskim koncentracijama Se (Cartes i sur. 2005). S druge strane, u listovima ječma izloženim povećanim koncentracijama selenata (2-16 ppm) povećava se intenzitet lipidne peroksidacije (Akbulut i Çakir 2010).

Glavni neenzimatski antioksidansi određivani u okviru ovog istraživanja su glutation i askorbinska kiselina. Glutation se u biljnoj stanici pojavljuje u relativno visokim razinama (Alscher 1989). Glutation i njegovi pojačivači – lipoična kiselina, metilsulfonilmetan, l-cistein – tiolni su spojevi koji hvataju slobodne radikale (Abel 2018). Rezultati ovog istraživanja pokazuju da niske koncentracije nanoselena (PS80 i PS160) uzrokuju smanjenje koncentracije GSH (Slika 3). U istraživanju Mroczek-Zdyrska i Wójcika (2011) na korijenu boba, rezultati pokazuju da je izloženost teškim metalima i niskoj koncentraciji Se dovela do povećane koncentracije GSH, dok je tretman visokim koncentracijama Se doveo do nakupljanja $O_2^{\bullet-}$ i smanjenje koncentracije GSH. U našem istraživanju, smanjenje koncentracije GSH može biti povezano s povećanom aktivnosti GPX koja katalizira redukciju peroksida uz pomoć GSH pri čemu GSH prelazi iz svog reduciranog u oksidirano stanje (Feng i sur. 2013). Posljedično, to bi trebalo rezultirati visokim koncentracijama GSSG što u našem istraživanju nije slučaj. Povećanje koncentracije GSSG uočeno je samo kod tretmana H80 koje također uzrokuje povećanje koncentracije GSH. Reagirajući s reaktivnim elektrofilima ili djelovanjem kao proton donor u prisutnosti ROS-a, GSH može zaštititi makromolekule u stanici pri čemu nastaje GSSG (Sharma i sur. 2012), što bi moglo objasniti dobivene rezultate. Jedan od mogućih razloga zašto se pri tretmanu H80 nije smanjila koncentracija GSH je povećana aktivnost GR (Slika 4). Djelovanjem GR, GSSG se reducira u GSH. Uloga GR u biljnoj stanici je održavanje visokih razina GSH radi normalnog funkcioniranja stanice (Waskiewicz 2014b). Veće koncentracije nanoselena (H160, H320 i PS320) uzrokuju povećanje koncentracije GSH.

PS160 uzrokuje smanjenje koncentracije GSH, dok H160 dovodi do njegova povećanja, iako je u pitanju ista koncentracija nanoselena (160 $\mu\text{mol/l}$). Rezultate također prate i vrijednosti aktivnosti enzima GR. Moguće objašnjenje ovih rezultata je da na antioksidativni odgovor ne utječe samo koncentracija nanoselena nego i čime su nanočestice obložene, odnosno stabilizirane. Hernández-Hernández i sur. (2019) tvrde da nanoselen uzrokuje povećanje količine GSH u listovima rajčice kao posljedicu veće aktivnosti GR i asimilacije sumpora. Niske koncentracije nanoselena (PS80 i PS160) uzrokovale su povećanje koncentracije GR, dok su visoke koncentracije (H160 i PVP320) uzrokovale smanjenje koncentracije GR. Santosh i sur. (1999) su kod vrste *Trigonella foenum-graecum* L. Izložene Se utvrdili smanjenje aktivnosti GR za 50-60%. Što se tiče GPX, statistički značajnu razliku u listovima rukole tretirane nanoselenom, u odnosu na kontrolu, pokazali su samo PS80 i PS160 tretmani kod kojih je došlo do povećanja aktivnosti GPX (Slika 5). Folijarna primjena Se na listove vrste *Fagopyrum esculentum* nije pokazala značajan efekt na aktivnost GPX (Germ i sur. 2007). Xue i sur. (2001) tvrde da je antioksidativni učinak selena u biljkama zelene salate povezan s povećanom aktivnošću GPX. U istraživanju Zhu i sur. (2017) utvrđeno je da je primjena Se povećala aktivnost GPX u biljkama rajčice.

Osim antioksidativne obrane i hvatanja slobodnih radikala, glutation regenerira važne antioksidanse kao što su vitamini C i E (Drisko, 2018). Hasanuzzaman i Fujita (2011) navode askorbinsku kiselinu (AsA) kao najvažnijeg čistača ROS-a. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da sve koncentracije nanoselena uzrokuju povećanje koncentracije AsA (Slika 6). Istraživanje Islam i sur. (2020) pokazuje značajno povećanje bioaktivnih spojeva kao što su fenoli, flavonoidi, AsA i antocijanini u ekstraktima pšenice obogaćenim Se. S druge strane, selenat (320 $\mu\text{mol/l}$) u našem istraživanju dovodi do smanjenja količine AsA. Wang i sur. (2021) navode da su nanočestice selena manje toksične i biokompatibilnije od drugih oblika Se. Smanjena količina AsA može biti povezana s aktivnošću APX koja potiče oksidaciju AsA do dehidroaskorbinske kiseline (Agar i sur. 1997). APX je enzim koji veže H_2O_2 i neophodan je za zaštitu sastavnih dijelova stanice od oštećenja uzrokovanih hidroksilnim radikalim i peroksidima (Gangwar i sur. 2014). Rezultati istraživanja Sardar i sur. (2022) ukazuju na to da je tretiranje sjemena korijandra nanočesticama selena pospješilo antioksidativni odgovor povećanjem aktivnosti APX i CAT te uklanjanjem slobodnih radikala i ROS. Primjena Se je povećala aktivnost APX u biljkama rotkvice izloženim arsenu (Hu i sur. 2020). U listovima rukole, samo je selenat uzrokovao statistički značajno smanjenje aktivnosti APX, u odnosu na kontrolu budući da je u tim uzorcima i izmjerena najveća koncentracija Se u tkivu (neobjavljeni

rezultati). Sve ostale korištene koncentracije nanoselena uzrokovale su statistički značajno povećanje APX, u odnosu na kontrolu (Slika 7). APX koristi AsA kao elektron donor u svojim reakcijama te time utječe na njenu koncentraciju. U ovom istraživanju, povećanje aktivnosti APX bilo je praćeno s povećanom koncentracijom AsA (Slika 6). Povećane koncentracije AsA upućuju na pojačani rad AsA-GSH ciklusa budući da se ona obnavlja kroz njega (Caverzan i sur. 2012).

5. ZAKLJUČCI

- Utjecaj selena na antioksidativni odgovor u listovima rukole ovisi o kemijskom obliku i primijenjenoj koncentraciji selena.
- Postoji razlika u koncentraciji mjerenih pokazatelja oksidacijskog stresa u listovima rukole tretirane različito stabiliziranim česticama nanoselena pri istim koncentracijama što ukazuje na važnu ulogu tvari za stabilizaciju nanočestice u njenom djelovanju na biljku.
- Tretmani biljaka nanočesticama selena stabiliziranim polisorbatom i huminskom kiselinom mogu se preporučiti kao najučinkovitiji biofortifikacijski tretmani budući da su uzrokovali smanjenje intenziteta peroksidacije lipida, a u isto vrijeme su povećali koncentraciju askorbinske kiseline u listovima rukole.
- Daljnja istraživanja ostalih parametara uključenih u antioksidativni i detoksifikacijski odgovor biljke potrebna su kako bi se dobio detaljan uvid u mehanizam djelovanja nanočestica Se.

6. LITERATURA

Abel, R. Jr. (2018) Cataracts. U: Rakel, D. (ur.) Integrative Medicine. Elsevier, New Mexico, 830-837.

Agar, I. T., Streif, J., Bangerth, F. (1997) Effect of high CO₂ and controlled atmosphere (CA) on the ascorbic and dehydroascorbic acid content of some berry fruits. *Postharvest Biology and Technology* 11: 47-55.

Alscher, R. G. (1989) Biosynthesis and Antioxidant Function of Glutathione in Plants. *Physiologia Plantarum* 77: 457-464.

Alscher, R. G., Erturk, N., Heath, L. S. (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1331-134.

Akbaraly, T. N., Hininger-Favier, I., Arnaud, J., Gourlet, V., Roussel A. M. (2007) Plasma selenium over time and cognitive decline in the elderly. *Epidemiology* 18: 52-58.

Akbulut, M., Çakir, S. (2010) The effects of Se phytotoxicity on the antioxidant systems of leaf tissues in barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings. *Plant Physiology Biochemistry* 48:160166.

Akerboom T. P. M., Sies, H. (1981) Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods in Enzymology* 77: 373-382.

Ambriović Ristov, A., Brozović, A., Bruvo Mađarić, B., Četković, H., Herak Bosnar, M., Hranilović, D., Katusić Hećimović, S., Meštrović Radan, N., Mihaljević, S., Slade, N., Vukajlija, D. (ur.) (2007) Metode u molekularnoj biologiji. Institut Ruđer Bošković, Zagreb.

Arora, A., Sairam, R. K., Srivastava, G. C. (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 82: 1227–1234.

Ayala, A., Muñoz, M. F., Argüelles, S. (2014) Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014: 1-31.

Back, T. G., Moussa, Z. (2003) Diselenides and Allyl Selenides as Glutathione Peroxidase Mimetics. Remarkable Activity of Cyclic Seleninates Produced in Situ by the Oxidation of Allyl ω -Hydroxyalkyl Selenides. *Journal of the American Chemical Society* 125: 13455-13460.

- Balen, B., Tkalec, M., Sikić, S., Tolić, S., Cvjetko, P., Pavlica, M., Vidaković-Cifrek, Z. (2011) Biochemical responses of *Lemna minor* experimentally exposed to cadmium and zinc. *Ecotoxicology*, 20(4): 815-826.
- Bano, I., Skalickova, S., Sajjad, H., Skladanka, J., Horkey, P. (2021) Uses of Selenium Nanoparticles in the Plant Production. *Agronomy* 11.
- Benderitter, M., Maupoil, V., Vergely, C., Dalloz, F., Briot, F., Rochette, L. (1998) Studies by Electron Paramagnetic Resonance of the Importance of Iron in the Hydroxyl Scavenging Properties of Ascorbic Acid in Plasma: Effects of Iron Chelators. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 12: 510-516.
- Birringer, M., Pilawa, S., Flohe, L. (2002) Trend sin selenium biochemistry. *Natural Product Reports* 19: 693-718.
- Bisht, A., Kiran, K.R., Qi, Y., Hickman, J., Mishin, Y., Rabkin, E. (2021) The impact of alloying on defect-free nanoparticles exhibiting softer but tougher behavior. *Nature communications* 12: 2515.
- Bodnar, M., Konieczka, P., Namiesnik, J. (2012) The properties, functions, and use of selenium compounds in living organisms. *Journal of Environmental Science and Health. Part C: Environmental Carcinogenesis Reviews* 30: 225-252.
- Bouis, H., Welch, R. (2010) Biofortification – A Sustainable Agricultural Strategy for Reducing Micronutrient Malnutrition in the Global South. *Crop Science* 50: 20-32.
- Brigelius-Flohé, R. (2006) Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Journal of Biological Chemistry* 387(10-11): 1329-1335.
- Cartes, P., Gianfreda, L., Mora, M.L. (2005) Uptake of selenium and its antioxidant activity in ryegrass when applied as selenate and selenite forms. *Plant Soil* 276:359-367.
- Castegna, A., Drake, J., Pocernich, C., Butterfield, DA (2003) Protein carbonyl levels-An assessment of protein oxidation. U: Hensley K, Floyd RA (ur.) *Methods in Pharmacology and Toxicology: Methods in Biological Oxidative Stress*. Totowa, Human Press Inc., pp 161-168.
- Caverzan, A., Passaia, G., Barcellos Rosa, S., Werner Ribeiro, C., Lazzarotto, F., MargisPinheiro, M. (2012) Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology* 35(4): 1011-1019.

- Chang, J. C., Gutenmann, W. H., Reid, C. M., Lisk, D. J. (1995) Selenium Content of Brazil Nuts from Two Geographic Locations in Brazil. *Chemosphere* 30: 801–802.
- Chauhan, R., Awasthi, S., Tripathi, P., Mishra, S., Dwivedi, S., Niranjana, A., Mallick, S., Tripathi, P., Pande, V., Tripathi, R. D. (2017) Selenite modulates the level of phenolics and nutrient element to alleviate the toxicity of arsenite in rice (*Oryza sativa*, L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 138: 47–55.
- Chauhan, R., Awasthi, S., Srivastava, S., Dwivedi, S., Pilon-Smits, E., Dhankher, O. P., Tripathi, D. (2019) Understanding selenium metabolism in plants and its role as a beneficial element. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 49(21): 1937-1958.
- Chu, J., Yao, X., Zhang, Z. (2010) Responses of wheat seedlings to exogenous selenium supply under cold stress. *Biological Trace Element Research* 136: 355-363.
- Creissen, G.P., Mullineaux, P.M. (1995) Cloning and characterization of glutathione reductase cDNAs and identification of two genes encoding the tobacco enzyme. *Planta* 197: 422-425.
- Cvjetko P., Balen B., Peharec Štefanić P., Debožović L., Pavlica M., Klobučar G. I. V. (2014) Dynamics of heat-shock induced DNA damage and repair in senescent tobacco plants. *Biologia Plantarum*, 58(1): 71-79.
- Dat, J. F., Foyer, C. H., Scott, I. (1998) Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. *Plant Physiology*, 118: 1455–1461
- Davey, M. W., Van Montagu, M., Inze, D., Sanmartin, M. (2000): Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 825-860.
- Demidchik, V. (2015) Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany* 109: 212-228.
- Djanaguiraman, M., Belliraj, N., Stefan H., Bossmann, Vara Prasad P. V. (2018) High-Temperature Stress Alleviation by Selenium Nanoparticle Treatment in Grain Sorghum. *ACS Omega* 3(3): 2479-2491.
- Dodig, S., Čepelak I. (2004) The facts and controversies about selenium. *Acta Pharmaceutica* 54: 261-276.

- Drisko, J. A. (2018) Chelation Therapy. U: Rakel, D. (ur.) Integrative Medicine. Elsevier, New Mexico.
- Ducsay, L., Ložek, O., Marček, M., Varényiová, M., Hozlár, P., Lošák, T. (2016) Possibility of selenium biofortification of winter wheat grain. *Plant, Soil and Environment* 62(8): 379-383.
- Dumont, E., Vanhaecke F., Cornelis, R. (2006) Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. *Analytical and Bioanalytical chemistry* 385: 1304-1323.
- Durán, P., Acuña, J. J., Jorquera, M. A., Azcón, R., Borie, F., Cornejo, P., Mora, M. L. (2013) Enhanced selenium content in wheat grain by co-inoculation of selenobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi: a preliminary study as a potential Se biofortification strategy. *Journal of Cereal Science* 57: 275-280.
- Ekanayake, L. J., Thavarajah, D., Vial, E. (2015) Selenium fertilization on lentil (*Lens culinaris*, Medikus) grain yield, seed selenium concentration, and antioxidant activity. *Field Crops Research* 177: 9-14.
- Feng, R., Wei, C., Tu, S. (2013) The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany*. 87: 58–68.
- Foyer, C. H., Halliwell, B. (1976) The Presence of Glutathione and Glutathione Reductase in Chloroplasts: A Proposed Role in Ascorbic Acid Metabolism. *Planta* 133: 21-25.
- Foyer, C. H., Noctor, G. (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell* 17: 1866-1875.
- Gallego, S. M., Benavides, M. P., Tomaro, M. L. (1996) Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science* 121: 151-159.
- Gallie, D. R. (2013): L-ascorbic acid: a multifunctional molecule supporting plant growth and development. *Scientifica*.
- Gangwar, S., Singh, V. P., Tripathi, D. K., Chauhan, D. K., Prasad, S. M., Maurya, N. J. (2014) Plant Responses to Metal Stress: The Emerging Role of Plant Growth Hormones in Toxicity Alleviation. U: Ahmad, P., Rasool, S. (ur.) *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance 2*. Academic Press, USA, str. 215-248.

- Garza-García, J. J. O., Hernández-Díaz, J. A., Zamudio-Ojeda, A. (2022) The Role of Selenium Nanoparticles in Agriculture and Food Technology. *Biological Trace Element Research* 200(5): 2528-2548.
- Gautam, P. K., Kumar, S., Tomar, M. S., Singh, R. K., Acharya, A., Kumar, S. (2017) Selenium Nanoparticles Induce Suppressed Function of Tumor Associated Macrophages and Inhibit Dalton's Lymphoma Proliferation. *Biochemistry and Biophysics Reports* 12: 172–184.
- Germ, M., Stibilj V., Kreft, I. (2007) Metabolic Importance of Selenium for Plants. *European Journal of Plant Science and Biotechnology* 1: 91-97.
- Ghosh, M. K., Chattopadhyay, D. J., Chatterjee, I. B. (1996) Vitamin C prevents oxidative damage. *Free Radical Research* 25: 173-179.
- Gigolashvili, T., Kopriva, S. (2014) Transporters in plant sulphur metabolism. *Frontiers in Plant Science* 5: 422.
- Gill, S. S., Anjum, N. A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D. K., Ahmad, I., Pereira, E., Tuteja, N. (2013) Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry* 70: 204–212.
- Gill, S. S., Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.
- Gonçalves N. P. F., Minella M., Fabbri D., Calza P., Malitesta C., Mazzotta E., Prevot A. B. (2020) Humic acid coated magnetic particles as highly efficient heterogeneous photo-Fenton materials for wastewater treatments. *Chemical Engineering Journal* 390.
- Gupta Dutta, S. (ur.) (2011) *Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Higher Plants*. CRC Press, USA.
- Gupta, M., Gupta, S. (2017) An Overview of Selenium Uptake, Metabolism, and Toxicity in Plants. *Frontiers in Plant Science* 7: 2074.
- Halliwell, B., Foyer, C. H. (1978) Properties and physiological function of glutathione reductase purified from spinach leaves by affinity chromatography. *Planta* 139: 9-17.
- Hamilton, S. J. (2004) Review of selenium toxicity in the aquatic food chain. *Science of Total Environment* 326: 1-31.

Hartikainen, H., Xue, T., Piironen, V. (2000) Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. *Plant and Soil* 225: 193-200.

Hasanuzzaman, M., Fujita, M. (2011) Selenium pretreatment upregulates the antioxidant defense and methylglyoxal detoxification system and confers enhanced tolerance to drought stress in rapeseed seedlings. *Biological Trace Element Research* 143: 1758-1776.

Heath, R. L., Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.

Hebat-Allah, A. M., Osama, M. D., Bilal Haider, M. (2019) Environmentally friendly nano-selenium to improve antioxidant system and growth of groundnut cultivars under sandy soil conditions. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 18.

Hernández-Hernández, H., Quiterio-Gutiérrez, T., Cadenas-Pliego, G., Ortega-Ortiz, H., Hernández-Fuentes, A. D., Cabrera de la Fuente, M., Valdés-Reyna, J., Juárez-Maldonado, A. (2019) Impact of Selenium and Copper Nanoparticles on Yield, Antioxidant System, and Fruit Quality of Tomato Plants. *Plants* 8(10): 355.

Hiremath, P., Nuguru, K., Agrahari, V. (2019) Material Attributes and Their Impact on Wet Granulation Process Performance. U: Narang A.S., Badawy S. I. F. (ur.) *Handbook of Pharmaceutical Wet Granulation*. Academic Press, USA, str. 263-315.

Hosnedlova, B., Kepinska, M., Skalickova, S., Fernandez, C., Ruttikay-Nedecky, B., Peng, Q., Bjørklund, G. (2018) Nano-selenium and its nanomedicine applications: a critical review. *International Journal of Nanomedicine* 13: 2107.

Hu, L., Fan, H., Wu, D., Liao, Y., Shen, F., Liu, W., Huang, R., Zhang, B., Wang, X. (2020) Effects of selenium on antioxidant enzyme activity and bioaccessibility of arsenic in arsenic-stressed radish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 200.

Huang, C., Qin, N., Sun, L., Yu, M., Hu, W., Qi, Z. (2018) Selenium improves physiological parameters and alleviates oxidative stress in strawberry seedlings under lowtemperature stress. *International Journal of Molecular Sciences* 19(7): 1913.

Islam, M. Z., Park, B. J., Kang, H. M., Lee, Y. T. (2020) Influence of selenium biofortification on the bioactive compounds and antioxidant activity of wheat microgreen extract. *Food chemistry* 309.

- Iqra Bano, E. Š. K., Hira Sajjad, H., Reza, R. (2021) Importance of Micro-nutrient Supplementation for Livestock a Mini-Review. *Acta Scientific Veterinary Sciences* 3: 54-57.
- Jaberolansar, E., Kameli, P., Ahmadvand, H., Salamati, H. (2016) Synthesis and characterization of PVP-coated $\text{Co}_{0.3}\text{Zn}_{0.7}\text{Fe}_2\text{O}_4$ ferrite nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 404: 21-28.
- Jain, R., Seder-Colomina, M., Jordan, N., Dessi, P., Cosmidis, J., van Hullebusch, E. D., Weiss, S., Farges, F., Lens, P. N. L. (2015) Entrapped elemental selenium nanoparticles affect physicochemical properties of selenium fed activated sludge. *Journal of Hazardous Materials* 295: 193-200.
- Jiang, C., Zu, C., Lu, D., Zheng, Q., Shen, J., Wang, H., Li, D. (2017) Effect of exogenous selenium supply on photosynthesis, Na^+ accumulation and antioxidative capacity of maize (*Zea mays* L.) under salinity stress. *Scientific reports* 7.
- Jiménez, A., Hernández, J. A., del Río, L. A., Sevilla, F. (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology* 114: 175-284.
- Khurana, A., Tekula, S., Saifi, M. A., Venkatesh, P., Godugu, C. (2019) Therapeutic applications of selenium nanoparticles. *Biomedicine&Pharmacotherapy* 111: 802-812.
- Kondaparthi, P. (2019) Selenium nanoparticles: An insight on its Pro-oxidant and antioxidant properties. *Frontiers in Nanoscience and Nanotechnology* 6: 5-5.
- Konorev, E. A., Kennedy, C. M., Kalyanaraman, B. (1999) Cell-Permeable Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase Mimetics Afford Superior Protection against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: The Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Intermediates. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 368: 421-428.
- Kuznetsov, V. V., Khlodova, V. P., Yagodin, B. A. (2003) Selenium regulates the water status of plants exposed to drought. *Doklady Biological Sciences* 390: 266-268.
- Labudda, M. (2013) Lipid peroxidation as a biochemical marker for oxidative stress during drought. An effective tool for plant breeding. Department of Biochemistry, Warsaw University of Life Sciences, Poland.
- Li, H. F., McGrath, S. P., Zhao, F. J. (2008) Selenium uptake, translocation and speciation in wheat supplied with selenate or selenite. *New Phytologist* 178: 92-102.

- Lyons, G., Stangoulis, J., Graham, R. (2003) High-selenium wheat: biofortification for better health. *Nutrition Research Reviews* 16(1): 45-60.
- Mahadeva, Lal S., Kamath, A., Parida, A., Shenoy, S. (2021) Nanopharmacokinetics assessment. U: Thorat N.D., Kumar N. (ur.) *Nano-Pharmacokinetics and Theranostics*. Academic Press, USA, str. 171-192.
- Malagoli, M., Schiavon, M., dall'Acqua, S., Pilon-Smits, E.A.H. (2015) Effects of selenium biofortification on crop nutritional quality. *Frontiers in Plant Science* 6: 280.
- Mazej, D., Osvald, J., Stibilj, V. (2008). Selenium species in leaves of chicory, dandelion, lamb's lettuce and parsley. *Food Chemistry* 107: 75–83.
- Mendoza, M. (2011) Oxidative burst in plant-pathogen interaction. *Biotecnología Vegetal* 11: 67-75.
- Meyer, A. (2009) The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *Journal of Plant Physiology* 165: 1390-1403.
- Mostofa, M. G., Hossain, M. A., Siddiqui, M. N., Fujita, M., Tran, L. S. (2017) Phenotypical, physiological and biochemical analyses provide insight into selenium-induced phytotoxicity in rice plants. *Chemosphere* 178: 212-223.
- Mroczek-Zdyrska, M., Wójcik, M. (2012) The influence of selenium on root growth and oxidative stress induced by lead in *Vicia faba* L. Minor plants. *Biological Trace Element Research* 147: 320-328.
- Nair, S., Singh, S. V., Krishan, A. (1991) Flow cytometric monitoring of glutathione content and anthracycline retention in tumor cells. *Journal of Quantitative Cell Science* 12: 336-342.
- Nakano, Y., Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22: 867-880.
- Noctor, G., Foyer, C. H. (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Plant Molecular Biology* 49: 249-279.
- Nothstein, A. K., Eiche, E., Riemann, M., Nick, P., Winkel, L. H. E., Göttlicher, J., Steininger, R., Brendel, R., Von Brasch, M., Konrad, G., Neumann, T. (2016) Tracking Se assimilation and speciation through the rice plant – Nutrient competition, toxicity and distribution. *Plos One* 11, 1–15.

- Ogawa, K., Tasaka, Y., Mino, M., Tanaka, Y., Iwabuchi, M. (2001) Association of glutathione with flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 42(5): 524–530.
- Oremland, R. S., Herbel, M. J., Blum, J. S., Langley, S., Beveridge, T. J., Ajayan, P. M., Sutto T., Ellis, A. V., Curran, S. (2004) Structural and spectral features of selenium nanospheres produced by Se-respiring bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 52–60.
- Pallud, S., Lennon, A.M., Ramauge, M., Gavaret, J. M., Croteau, W., Pierre, M., Courtin, F., St. Germain, D. L. (1997) Expression of the type II iodothyronine deiodinase in culture rat astrocytes is selenium-dependent. *Journal of Biology and Chemistry* 272: 18104-18110.
- Pedrajas, R. J., Peinado, J., Lopez-Barea, J. (1993) Purification of Cu-Zn superoxide dismutase isoenzymes from fish liver: appearance of new isoforms as a consequence of pollution. *Free Radical Research Community* 19: 29–41.
- Pilon-Smits, E. A. H., Quinn, C. F. (2010) Selenium Metabolism in Plants. U: Hell, R., Mendel, R. R. (ur.) *Cell Biology of Metals and Nutrients. Plant Cell Monographs* 17. Springer, Berlin, Heidelberg, str. 225-241.
- Ramos, S. J, Faquin, V., Guilherme, L. R. G., Castro, E. M., Ávila, F. W., Carvalho, G. S., Bastos, C. E. A., Oliveira, C. (2010) Selenium biofortification and antioxidant activity in lettuce plants fed with selenate and selenite. *Plant, Soil and Environment* 56: 584-588.
- Rasmussen, L. B., Schomburg, L., Köhrle, J. (2011) Selenium status, thyroid volume and multiple nodule formation in an area with mild iodine deficiency. *European Journal of Endocrinology* 164: 585-590.
- Rayman, M. P. (2012) Selenium and human health. *The Lancet* 379: 1256-1268.
- Renkema, H., Koopmans, A., Kersbergen, L., Kikkert, J., Hale, B., and Berkelaar, E. (2012) The effect of transpiration on selenium uptake and mobility in durum wheat and spring canola. *Plant and Soil* 354: 239–250.
- Rezvanfar, M. A., Rezvanfar, M. A., Shahverdi, A. R., Ahmadi, A., Baeri, M., Mohammadirad, A. (2013) Protection of Cisplatin-Induced Spermatotoxicity, DNA Damage and Chromatin Abnormality by Selenium Nano-Particles. *Toxicology and Applied Pharmacology* 266 (3): 356–365.

- Ríos, J. J., Rosales, M. A., Blasco, B., Cervilla, C. M., Romero, L., Ruiz, J. M. (2008) Biofortification of Se and induction of the antioxidant capacity in lettuce plants. *Horticultural Science* 116: 248-255.
- Robertson, P. R., Harmon, J. S. (2007) Pancreatic islet β -cell and oxidative stress: The importance of glutathione peroxidase. *FEBS Letters* 581: 3743-3748.
- Rogić, T., Horvatić, A., Tkalec, M., Cindrić, M., Balen, B. (2015) Proteomic analysis of *Mammillaria gracilis* Pfeiff. In vitro-grown cultures exposed to iso-osmotic NaCl and mannitol. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 122(1): 127-146.
- Roman, M., Jitaru, P., Barbante, C. (2014) Selenium biochemistry and its role for human health. *Metallomics* 6: 25-54.
- Rotruck, J. T., Pope, A. L., Gauther, H. E., Swanson, A. B., Hofeman, D. G., Hoekstra, W. J. (1973) Selenium: Biochemical Role as a Component of Glutathione Peroxidase. *Science* 179(4073): 588-90.
- Sajedi, N. A., Ardakani, M. R., Madani, H., Naderi, A., Miransari, M. (2011) The effects of selenium and other micronutrients on the antioxidant activities and yield of corn (*Zea mays* L.) under drought stress. *Physiology and molecular biology of plants: on international journal of functional plant biology* 17(3): 215-22.
- Santosh, T. R., Sreekala, M., Lalitha, K. (1999) Oxidative stress during selenium deficiency in seedlings of *Trigonella foenum-graecum* and mitigation by mimosine – Part II. Glutathione metabolism. *Biol Trace ElemRes*70: 209-222.
- Sardar, R., Ahmed, S., Shah, A. A., Yasin, N. A. (2022) Selenium nanoparticles reduced cadmium uptake, regulated nutritional homeostasis and antioxidative system in *Coriandrum sativum* grown in cadmium toxic conditions. *Chemosphere* 287.
- Semida, W. M., Ali, T., Abdelkhalik, A., Rady, M. (2021) Selenium Modulates Antioxidant Activity, Osmoprotectants, and Photosynthetic Efficiency of Onion under Saline Soil Conditions. *Agronomy* 11(5): 855.
- Sharma, P., Bhushan Jha, A., Shanker Dubey, R., Pessarakli, M. (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* 2012: 1-26.

- Shen, Y. H., Xie, A. J., Yu, X. R., Zhang, X. Z., Yang, L.B., Li, C.H. (2007) Rapid, room-temperature synthesis of amorphous selenium/protein composites using *Capsicum annuum* L. Extract. *Nanotechno* 18: 405101-405109.
- Shoeibi, S., Mozdziak, P., Golkar-Narenji, A. (2017) Biogenesis of Selenium Nanoparticles Using Green Chemistry. *Topics in Current Chemistry* 375: 1–21.
- Sies, H. (1985) Oxidative stress, introductory remarks. U: Sies H (ur.) *Oxidative Stress*. London, Academic Press, 1-8.
- Smirnoff, N. (1996) The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany* 78: 661-669.
- Sors, T. G., Ellis, D. R., Na, G. N., Lahner, B., Lee, S., Leustek, T., Pickering, I. J., Salt, D. E. (2005) Analysis of sulfur and selenium assimilation in *Astragalus* plants with varying capacities to accumulate selenium. *The Plant Journal* 42: 785-797.
- Sotoodehnia-Korani, S., Iranbakhsh, A., Ebadi, M., Majd, A. Oraghi Ardebili, Z. (2020) Selenium nanoparticles induced variations in growth, morphology, anatomy, biochemistry, gene expression, and epigenetic DNA methylation in *Capsicum annuum*; an in vitro study. *Environmental Pollution* 265: 1-11.
- Srivalli, S., Khanna-Chopra, R. (2008) Role of glutathione in abiotic stress tolerance. U: Khan, N.A., Singh, S., Umar, S. (you're.) *Sulfur Assimilation and Abiotic Stress in Plants*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, str. 207–225.
- Štefan, L., Tepšić, T., Zavidic, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R. (2007) Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina* 43:84-93.
- Tanaka, K., Hashimoto, T., Tokumara, S., Iguchi, H., Kojo, S. (1997) Interactions between Vitamin C and vitamin E are observed in tissues of inherently scorbutic rats. *The Journal of Nutrition* 127: 2060-2064.
- Tausz, M., Sircelj, H., Grill, D. (2004) The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *Journal of Experimental Botany* 55: 1955-1962.
- Terry, N., Zayed, A. M., De Souza, M. P., Tarun, A. S. (2000) Selenium in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 401-432.

- Thomas, D. J., Thomas, J. B., Prier S. D., Nasso, N. E., Herbert, S. K. (1999) Iron superoxide dismutase protects against chilling damage in the cyanobacterium *Synechococcus* species PCC7942. *American Science of Plant Physiologists. Plant Physiology*, 120: 275–282.
- Torres, S. K., Campos, V. L., Leon, C. G., Rodriguez-Lamazares, S. M., Rojas, S. M. (2012) Biosynthesis of selenium nanoparticles by *Pantoea agglomerans* and their antioxidant activity. *Journal of Nanoparticle Research* 14.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160: 1-40.
- Verma, S., Dubey, R. S. (2003) Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164: 645-655.
- Vollath, D., Szabó, D. V. (1999) Coated Nanoparticles: A New Way to Improved Nanocomposites. *Journal of Nanoparticle Research* 1(2): 235-242.
- Vukadinović, V. (2020) Utjecaj okolišnih faktora na oksidacijski stres biljaka. *Okolišni stres*.
- Zhai, X., Zhang, C., Zhao, G., Stoll, S., Ren, F., et al. (2017) Antioxidant capacities of the selenium nanoparticles stabilized by chitosan. *Journal of Nanobiotechnology* 15: 4.
- Zhang, J. S., Gao, X. Y., Zhang, L. D., Bao, Y. P. (2001) Biological effects of a nano red elemental selenium. *Biofactors* 15: 27-38.
- Zhao, G., Wu, X., Chen, P., Zhang, L., Yang, C. S. (2018) Selenium nanoparticles are more efficient than sodium selenite in producing reactive oxygen species and hyper-accumulation of selenium nanoparticles in cancer cells generates potent therapeutic effects. *Free Radical Biology&Medicine* 126: 55-66.
- Zhu, Z., Chen, Y., Shi, G., Zhang, X. (2017) Selenium delays tomato fruit ripening by inhibiting ethylene biosynthesis and enhancing the antioxidant defense system. *Food Chemistry* 219: 179-184.
- Wang, C. Q., Xu, H. J., Liu, T. (2011) Effect of selenium on ascorbate-glutathione metabolism during PEG-induced water deficit in *Trifolium repens* L. *Journal of Plant Growth Regulation* 30.

- Wang, T., Zhao, H., Bi, Y., Fan, X. (2021) Preparation and antioxidant activity of selenium nanoparticles decorated by polysaccharides from *Sargassum fusiforme*. *Food Science* 86: 977-986.
- Waśkiewicz, A., Beszterda, M., Goliński, P. (2014a) Nonenzymatic Antioxidants in Plants. U: Ahmad, P. (ur.) *Oxidative Damage to Plants. Antioxidant Networks and Signaling*. Elsevier, USA, str. 201-234.
- Waśkiewicz, A., Gładysz, O., Szentner, K., Goliński, P. (2014b) Role of Glutathione in Abiotic Stress Tolerance. U: Ahmad, P. (ur.) *Oxidative Damage to Plants. Antioxidant Networks and Signaling*. Elsevier, USA, str. 149-181.
- Wendel, A. (1980) Glutathione Peroxidase. *Enzymatic basis of detoxification* 1: 333–353.
- White, P. J., Broadley, M. R. (2005) Biofortifying crops with essential mineral elements. *Trend in Plant Science* 10: 586-593.
- White, P. J., Broadley, M. R. (2009) Biofortification of crops with seven mineral elements often lacking in human diets - iron, zinc, copper, calcium, magnesium, selenium and iodine. *New Phytologist* 182: 49-84.
- White, P. J. (2017) The Genetics of Selenium Accumulation by Plants. U: Pilon-Smits, E.A.H., Winkel, L.H.E., Lin, Z.Q. (ur.) *Selenium in plants. Plant Ecophysiology*, vol 11., Springer International Publishing, Cham, str. 143-163.
- Wu, Z., Bañuelos, G. S., Lin, Z. Q., Liu, Y., Yuan, L., Yin, X., Li, M. (2015) Biofortification and phytoremediation of selenium in China. *Frontiers in Plant Science* 6: 136.
- Xiang, C., Werner, B. L., Christensen, E. M., Oliver D. J. (2001) The biological functions of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiology* 126(2): 564–574.
- Ximénez-Embún, P., Alonso, I., Madrid-Albarrán, Y., Cámara, C. (2004) Establishment of selenium uptake and species distribution in lupine, Indian mustard, and sunflower plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 832–838.
- Xu, J., Zhu, S., Yang, F., Cheng, L., Hu, Y., Pan, G., Hu, Q. (2003) The influence of selenium on the antioxidant activity of green tea. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83: 451-455.

Xue, T. L., Hartikainen, H., Piironen, V. (2001) Antioxidative and growth-promoting effect of selenium on senescing lettuce. *Plant and Soil* 237(1): 55-61.