

Učinak nanočestica srebra na antioksidacijski odgovor alge *Chlorella vulgaris*

Terlević, Katarina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:136696>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Katarina Terlević

Učinak nanočestica srebra na antioksidacijski odgovor alge *Chlorella vulgaris*

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

Ovaj rad, izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju, pod vodstvom dr. sc. Biljane Balen, prof, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

Zahvaljujem se mentorici, prof. dr. sc. Biljani Balen, na pomoći, strpljenju i profesionalnosti, te na svim danim savjetima vezanih uz eksperimentalni dio pokusa i uz pisanje samog diplomskog rada. Uz to, iznimno hvala dr. sc. Petri Cvjetko na velikoj pomoći u provođenju svih eksperimenata, na savjetima i za izvođenje eksperimenata i za pisanje samog diplomskog rada, te uz mnogo strpljenja hvala na poučavanju mene novim vještinama.

Zahvaljujem se također doktorandici Renati Bibi te svim ostalim profesorima, asistentima, kolegicama i kolegama u laboratoriju koji su pomogli u svakoj situaciji te bili podrška i ugodno društvo kroz svo vrijeme provedeno u laboratoriju.

Zahvaljujem se najviše mojim roditeljima na bezuvjetnoj podršci i pomoći, što financijskoj što psihičkoj, koji su omogućili da studiram u Zagrebu. Osim toga, zahvaljujem se babi i didu na brizi i pomoći, mom bratu koji je ujedno bio i cimer te mom Ivanu na razumijevanju i ljubavi.

Veliko hvala svim mojim kolegama i prijateljima s fakulteta, a najviše Ana Mariji Matić, Anji Nikolić, Mateji Šimunović te Petri Tramontani koje sam upoznala na fakultetu, koje su mi ispunile fakultetske dane veseljem i što će mi ostati doživotne prijateljice.

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

Učinak nanočestica srebra na antioksidacijski odgovor alge *Chlorella vulgaris*

Katarina Terlević

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Zbog svojih antimikrobnih svojstava, nanočestice srebra (AgNP) mogu se naći u velikom broju potrošačkih proizvoda. S ciljem razumijevanja odgovora na oksidacijski stres uzrokovan toksičnim učinkom AgNP u stanicama zelenih algi, kultura alga *Chlorella vulgaris* izložena je djelovanju 5, 10 i 20 μM AgNP, stabiliziranih omotačem od polivilpirolidona (AgNP-PVP), u trajanju od 24 h. Spektrofotometrijski je ispitana stabilnost AgNP u hranjivoj podlozi BBM prije izlaganja alge *C. vulgaris* te stabilnost u kulturi alga u vremenskom periodu od 24 h. U otopinama čestica AgNP u hranjivoj podlozi zabilježen je porast apsorbancije i pomak pika prema manjim valnim duljinama za sve ispitane koncentracije AgNP u usporedbi s rezultatima dobivenim u Milli Q vodi, što pokazuje da je došlo do djelomične agregacije čestica AgNP, ali i otpuštanja iona Ag^+ . Smanjenje prirasta kulture alge, izmjereno pri najvećoj testiranoj koncentraciji AgNP, ukazalo je na inhibiciju rasta stanica, dok je smanjenje vijabilnosti stanica, povećanje sadržaja MDA i proteinskih karbonila, zabilježeno na većini ispitanih koncentracija AgNP-PVP, pokazalo pojavu oksidacijskog stresa. Oksidacijski stres potvrdila je i povećana aktivnost antioksidacijskog enzima PPX u svim tretmanima, dok je analiza izoformi nakon elektroforeze proteina u nativnim uvjetima pokazala promjenu u ekspresiji sva tri analizirana antioksidacijska enzima (CAT, PPX i APX).

(59 stranica, 21 slika, 3 tablice, 120 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: alge, reaktivni oblici kisika, prirast kulture, lipidna peroksidacija, oksidacija proteina, antioksidacijski enzimi

Voditelj: dr. sc. Biljana Balen, prof.

Neposredni voditelj: dr. sc. Petra Cvjetko

Ocjenitelji: Dr. sc. Biljana Balen, prof.

Dr. sc. Ines Radanović, prof.

Dr. sc. Vesna Petrović-Peroković, izv. prof.

Rad prihvaćen:

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

The effect of silver nanoparticles on antioxidant response of *Chlorella vulgaris*

Katarina Terlević

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Due to their antimicrobial properties, silver nanoparticles (AgNPs) can be found in various consumer products. For better understanding of oxidation stress response and toxic effect of AgNPs on green algae, *Chlorella vulgaris* was exposed to 5, 10 and 20 μM AgNPs stabilized with polyvinylpyrrolidone coating (AgNP-PVP) for 24 hours. The stability of AgNPs was determined spectrophotometrically in BBM nutrient medium before the exposure to AgNPs and upon exposure of algal culture for 24 h. Increase in the absorbance value and shift of the peak position toward lower wavelengths, recorded in all tested AgNP solutions in BBM medium compared to results obtained in Milli Q water, indicated partial AgNP aggregation as well as release of Ag^+ ions. Decrease in growth rate was detected at the highest applied AgNP concentration, which suggested growth inhibition. Reduced cell viability as well as increased content of MDA and protein carbonyls, detected at all tested AgNP concentrations, showed the presence of oxidative stress. Additional confirmation was achieved by significant increase in activity of PPX, an important antioxidant enzyme. Moreover, changes in isoenzyme patterns of all analysed antioxidant enzymes (CAT, PPX and APX) were recorded in algae cells upon protein analyses by means of gel electrophoresis in native conditions.

(59 pages, 21 figures, 3 tables, 120 references, original in: Croatian language)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: algae, reactive oxygen species, growth rate, lipid peroxidation, protein oxidation, antioxidative enzymes

Supervisor: Dr. Biljana Balen, Prof.

Cosupervisor: Dr. Petra Cvjetko

Reviewers: Dr. Biljana Balen, Prof.

Dr. Ines Radanović, Prof.

Dr. Vesna Petrović Peroković, Assoc. Prof.

Thesis accepted:

POPIS KRATICA I SIMBOLA

2-OH-E+ – 2-hidroksietidij

AA – akrilamid

AgNP – nanočestice srebra (eng. *silver nanoparticles*)

APS – amonijev peroksodisulfat

APX – askorbat peroksidaza

BBM – Bischoff i Bold hranjiva podloga

BFB – bromfenol plavo

Bis – N,N'-metilen-bis-akrilamid

BSA – goveđi serumski albumin

CAT – katalaza

CBB – boja Comassie Brilliant Blue

DHE – dihidroetidij

DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazin

DW – suha tvar (eng. *dry weight*)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

H₂DCF-DA – 2',7'-diklorohidrofluorescin diacetat

MDA – malondialdehid

NBT – nitroblue tetrazolium

OD – optička gustoća (eng. *optical density*)

PAGE – poliakrilamid gel elektroforeza

PBS – puferirana otopina fosfatnih soli

PI – propidij jodid

PPX – pirogalol peroksidaza

PVP – polivinilpirolidon

ROS – reaktivni oblici kisika (eng. *reactive oxygen species*)

TBA – tiobarbituratna kiselina

TBS – Tris pufer

TCA – trikloroctena kiselina

TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletildiamin

Tris – 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Nanočestice.....	1
1.1.1. Upotreba nanočestica srebra i njihov utjecaj na okoliš.....	2
1.1.2. Stabilizacija AgNP dodatkom omotača.....	3
1.2. Oksidacijski stres.....	4
1.2.1. Lipidna peroksidacija.....	5
1.2.2. Oksidacija proteina.....	6
1.2.3. Antioksidacijski enzimi.....	7
1.3. Zelena alga <i>Chlorella vulgaris</i> kao model u toksikološkim istraživanjima.....	8
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	11
3. MATERIJALI I METODE.....	12
3.1. Materijal.....	12
3.1.1. Fikološki materijal.....	12
3.2. Metode.....	12
3.2.1. Kultura alge <i>Chlorella vulgaris</i>	12
3.2.1.1. Uvjeti uzgoja.....	12
3.2.1.2. Praćenje rasta kulture alge <i>C. vulgaris</i> i određivanje suhe tvari.....	14
3.2.1.3. Izlaganje kulture alge <i>C. vulgaris</i> otopinama AgNP različitih koncentracija.....	15
3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje stabilnosti nanočestica srebra (AgNP-PVP).....	15
3.2.2.1. Spektrofotometrijsko određivanje stabilnosti AgNP-PVP u podlozi za izlaganje.....	15
3.2.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje stabilnosti AgNP-PVP u kulturi alge <i>C. vulgaris</i>	16
3.2.3. Ekstrakcija ukupnih topivih proteina.....	16
3.2.4. Određivanje koncentracije proteina.....	16
3.2.5. Detekcija molekula ROS i određivanje vijabilnosti u stanicama algi <i>in situ</i> primjenom fluorescentnih boja.....	17
3.2.5.1. Detekcija molekula ROS primjenom boje dihidroetidij.....	17
3.2.5.2. Detekcija molekula ROS primjenom boje 2',7'-diklorohidrofluorescein diacetat.....	18
3.2.5.3. Određivanje vijabilnosti stanica primjenom propidijevog jodida.....	18
3.2.6. Određivanje sadržaja malondialdehida.....	19
3.2.7. Određivanje sadržaja proteinskih karbonila.....	19
3.2.8. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima.....	20

3.2.8.1. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze.....	20
3.2.8.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti pirogalol peroksidaze.....	21
3.2.8.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze.....	22
3.2.9. Razdvajanje proteina nativnom poliakrilamid gel elektroforezom.....	23
3.2.9.1. Određivanje aktivnosti i broja izoformi antioksidacijskih enzima u gelu.....	24
3.2.9.1.1. Određivanje aktivnosti i broja izoformi katalaze.....	24
3.2.9.1.2. Određivanje aktivnosti i broja izoformi pirogalol peroksidaze.....	24
3.2.9.1.3. Određivanje aktivnosti i broja izoformi askorbat peroksidaze.....	24
3.3. Statistička obrada podataka.....	25
4. REZULTATI.....	26
4.1. Krivulja rasta i biomasa kulture alge <i>C. vulgaris</i>	27
4.1.1. Prirast kulture alge <i>C. vulgaris</i> na tretmanu od 24 h.....	27
4.2. Stabilnost AgNP.....	28
4.2.1. Stabilnost AgNP u hranjivoj podlozi BBM.....	28
4.2.2. Stabilnost AgNP u kulturi alge <i>C. vulgaris</i>	30
4.3. Detekcija molekula ROS i određivanje vijabilnosti u stanicama algi <i>in situ</i> primjenom fluorescentnih boja	32
4.3.1. Detekcija molekula ROS primjenom boje dihidroetidij.....	32
4.3.2. Detekcija molekula ROS primjenom boje 2',7'-diklorohidrofluorescein diacetat.....	33
4.3.3. Određivanje vijabilnosti stanica primjenom propidijevog jodida.....	34
4.4. Sadržaj malondialdehida.....	36
4.5. Sadržaj proteinskih karbonila.....	37
4.6. Aktivnost antioksidacijskih enzima.....	38
4.6.1. Aktivnost katalaze.....	38
4.6.2. Aktivnost pirogalol peroksidaze.....	39
4.6.3. Aktivnost askorbat peroksidaze.....	40
4.7. Aktivnost antioksidacijskih enzima u gelu.....	41
4.7.1. Aktivnost katalaze u gelu.....	41
4.7.2. Aktivnost pirogalol peroksidaze u gelu.....	42
4.7.3. Aktivnost askorbat peroksidaze u gelu.....	43
5. RASPRAVA.....	44
6. ZAKLJUČAK.....	49
7. POPIS LITERATURE.....	50

1. UVOD

1.1. Nanočestice

Nanoznanost je grana znanosti koja se bavi istraživanjem vrlo sitnih struktura, tzv. nanomaterijala čiji prefiks „nano“ označava faktor 10^{-9} , a obuhvaća dimenzije od 0,1 nm do 100 nm (Mody i sur., 2010; Williams, 2010). Nanomaterijali su materijali s vanjskim dimenzijama ili unutarnjim strukturama mjereni u nanometrima te imaju drugačija svojstva i ponašanje u odnosu na grublje i veće materijale sličnog kemijskog sastava. Prema Abdalluaeva (2017) nanomaterijali se prema njihovim morfološkim svojstvima mogu podijeliti na konsolidirane nanomaterijale i nanodisperzije u koje spadaju nanočestice, a na temelju njihovog kemijskog sastava svrstavaju u pet kategorija, a to su nano-metali, nano-oksidi, ugljikovi nanomaterijali, kvantne točke i ostali, primjerice organski polimeri (Wang F. i sur., 2019). Istraživanja o nanomaterijalima nisu novost. Koncept „nanometra“ prvi je predložio Richard Zsigmondy koji je 1925. godine dobio Nobelovu nagradu za kemiju. Moderna nanoznanost začeta je 1959. godine kad je Richard Feynman, dobitnik Nobelove nagrade za fiziku, održao predavanje pod naslovom „Ima puno prostora na dnu: poziv na ulazak u novo polje fizike“ (eng. *There's Plenty of Room at the Bottom*), u kojem je predstavio svoj koncept manipuliranja tvari na atomskoj razini (Hulla i sur., 2015). Grana inženjerstva koja se bavi proizvodnjom nanomaterijala naziva se nanotehnologija. Prva osoba koja je upotrijebila pojam „nanotehnologija“ bio je Norio Taniguchi 15 godina nakon slavnog Feynmanovog predavanja. Nakon toga je 1980-ih godina prošlog stoljeća počelo tzv. zlatno doba nanotehnologije otkrićem fulerena.

Nanočestice (eng. *nanoparticles*, NP), jedan od najčešće korištenih tipova nanomaterijala, su prema odluci Europske komisije 2011/696/EU definirane kao prirodne, slučajno stvorene ili proizvedene strukture koje se sastoje od čestica u slobodnom stanju ili spojenih kao agregati ili aglomerati, gdje je barem 50% čestica dimenzija od 1 do 100 nm. Kuglaste nanočestice su trodimenzijske na nanoskali, tj. svaka prostorna dimenzija je između 0,1 i 100 nm (Ivanković, 2011). Nanočestice metala su nanočestice pripravljene od čistih metala (npr. zlato, srebro, titan, cink, platina, željezo, cerij, talij) ili metalnih spojeva (oksida, hidroksida, sulfida, fosfata, fluorida, klorida). Postoje u prirodi, ali su ih ljudi počeli i umjetno sintetizirati zbog njihovih jedinstvenih svojstava te mogućnosti upotrebe u raznim područjima kao što su medicina, inženjerstvo, kemijska kinetika, sanacija okoliša, itd. Mogu se sintetizirati kemijskim, fizikalnim i biološkim metodama (Iravani i sur., 2014). Kemijske metode najčešće obuhvaćaju sintezu kemijskom redukcijom koristeći organske i anorganske reducirajuće agense, dok fizikalne metode primjenjuju procese evaporacije, kondenzacije

i laserske ablacije. Biološke metode su najnovije i u sintezi koriste mikroorganizme, biljke, biljne ekstrakte i gljive; ove se metode sve češće koriste jer su ekološki prihvatljive budući da u proizvodnji ne nastaju toksični nusprodukti (Keat i sur., 2015). Danas nanotehnologija utječe na svakodnevni život čovjeka. Iako proizvodnja i korištenje nanočestica u raznim domenama čovjekovog života donosi puno prednosti, postoji socijalna i ekološka zabrinutost zbog povećane izloženosti čovjeka i okoliša nanomaterijalima. Zbog tih se razloga razvila nova znanstvena disciplina - nanotoksikologija.

1.1.1. Upotreba nanočestica srebra i njihov utjecaj na okoliš

U posljednjih 11 godina, vlade diljem svijeta ukupno su uložile više od 67,5 milijardi američkih dolara u razvoj i napredak nanotehnologije. Prema najnovijim podacima iz baza podataka (*Danish Consumer Council, The Nanodatabase*) na europskom tržištu se trenutno nalazi 4365 proizvoda koji sadrže nanočestice, od kojih 433 proizvoda sadrži nanočestice srebra (AgNP), koje su posebno zanimljive proizvođačima zbog svojih antimikrobnih svojstava (Lima i sur., 2012). AgNP pronalaze primjenu u različitim granama industrije kao što su poljoprivreda, automobilska industrija, građevina, kozmetička industrija, prehrambena industrija, tekstilna industrija, medicina, a proizvodi koji sadrže AgNP su npr. materijali za pakiranje prehrambenih proizvoda, kontejneri za pohranu hrane, pročišćivači voda, čarape i donje rublje otporne na miris, razni sprejevi, deterdženti, perilice rublja, losioni za tijelo i sapuni, proizvodi za intimno zdravlje i njegu žena, kirurški instrumenti, medicinski povoji i mnogi drugi (Yu i sur., 2013).

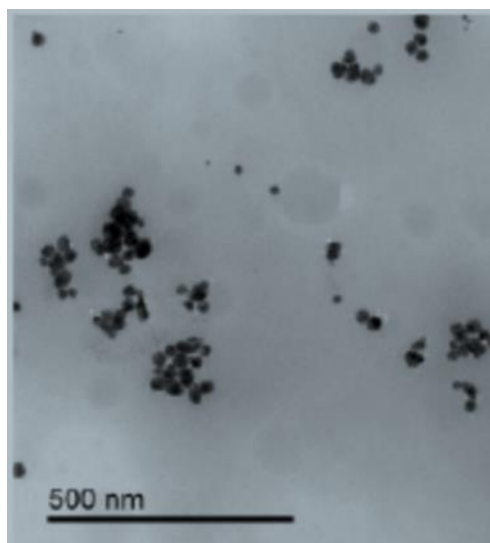
S obzirom na navedenu široku upotrebu AgNP, postavlja se pitanje predstavljaju li one prijetnju u okolišu te kakav je njihov utjecaj na biljni i životinjski svijet, te u konačnici na ljudsko zdravlje. Najveća prijetnja okolišu je mogućnost ispuštanja AgNP u vode namijenjene za piće. Naime, svjetska zdravstvena organizacija (SZO, 2003) potvrdila je prisustvo srebra u prirodnim izvorskim vodama u kojima je njegova koncentracija iznosila između 0,2 i 0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$, dok je koncentracija u vodama za piće bila u rasponu između „nemoguće detektirati“ i 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Domingo i sur., 2019). Iako se smatra da je srebro relativno bezopasno za ljude, dokazano je da izloženost srebrovim spojevima u višim koncentracijama kod ljudi izaziva argiriju, rijedak poremećaj koji se javlja zbog dugotrajnog kontakta s česticama ili spojevima srebra (Hill, 1941; Rosenman i sur., 2007). Trenutno nema dokaza koji pokazuju da su ljudi izloženi štetnom utjecaju AgNP, no što je više proizvoda na tržištu koji sadržavaju ove nanočestice, to je veća mogućnost da se one pojave u okolišu u povišenim koncentracijama, što pak dovodi do otapanja srebra, stvaranja srebrovih iona (Ag^+) i bioakumulacije srebra u živim organizmima (Luoma, 2008).

Svojstva AgNP koja treba uzeti u obzir pri procjeni opasnosti su veličina, oblik, aglomeracijsko stanje, topljivost, omotač korišten za stabilizaciju te površinska svojstva (veličina površine, naboj) (Warheit i sur., 2008). AgNP su zbog svoje velike površine u odnosu na mali volumen vrlo reaktivne, a zbog male veličine mogu prolaziti kroz stanične membrane. Stoga posljednjih godina raste broj istraživanja vezanih za ispitivanje potencijalnih štetnih učinaka AgNP na žive organizme. Prema Levard i sur., (2012) postoje dva mehanizma toksičnosti AgNP u živim organizmima: prvi je pojava oksidacijskog stresa stvaranjem reaktivnih oblika kisika (eng. *reactive oxygen species*, ROS); drugi je interakcija Ag^+ s tiolnim skupinama enzima i proteina, pri čemu utječu na procese u stanici kao što su stanično disanje i transport iona preko stanične membrane, rezultirajući uglavnom staničnom smrću ili apoptozom. Dokazano je da ioni Ag^+ koji nastaju raspadom nanočestica srebra ostaju trajno u vodenom mediju u okolišu te su vrlo toksični za prokariotske organizme, slatkovodne i morske beskralješnjake te ribe (Bianchini i sur., 2002; Erickson i sur., 1998; Fisher i Wang, 1998; Hogstrand i Wood, 1998). Gambardella i sur. (2015) su pokazali kako AgNP mogu utjecati na organizme na različitim trofičkim razinama u morskom ekosustavu, uključujući alge, žarnjake, rakove i bodlijkase.

1.1.2. Stabilizacija AgNP dodatkom omotača

Nanočestice je zbog njihove velike reaktivnosti potrebno stabilizirati. Termodinamički se to postiže dodatkom različitih omotača koji se vežu za površinu čestica (de Lima i sur., 2012). Za termodinamičku stabilizaciju AgNP primjenjuju se npr. polivinilpirolidon (PVP), koji pruža steričku stabilizaciju, te cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB) i citrat, koji ih elektrostatički stabiliziraju (Silva, 2011). Biološki učinci omotača na AgNP nisu dovoljno istraženi stoga je daljnim istraživanjima potrebno utvrditi njihov doprinos ukupnoj toksičnosti nanočestica.

U ovom diplomskom radu AgNP su pripravljene kemijskom metodom, redukcijskim postupkom iz otopine srebrovog nitrata (AgNO_3) uz dodatak natrijevog tetraborhidrida (NaBH_4) kao reducirajućeg agensa i polivinilpirolidona (PVP) kao stabilizirajućeg omotača. Slika 1. prikazuje AgNP stabilizirane omotačem od PVP-a (AgNP-PVP).



Slika 1. Nanočestice srebra stabilizirane omotačem od polivinilpirolidona (AgNP-PVP) snimljene transmisijom elektronskim mikroskopom (TEM). Preuzeto iz Biba i sur. (2020).

1.2. Oksidacijski stres

Pojava fotosintetskih organizama na Zemlji za posljedicu je imala stvaranje atmosfere bogate kisikom, što je dovelo do nastanka mnogih novih vrsta koje su razvile aerobni metabolizam. Aerobni organizmi energiju su počeli dobivati razgradnjom hrane, a postepeno su se razvili višestanični organizmi. Iako je metabolizam temeljen na kisiku evolucijski i energetski povoljniji ima i neke nedostatke. Kao nusprodukti takvog metabolizma u raznim dijelovima stance nastaju molekule ROS, koje mogu biti slobodni radikali kao što su hidroksilni ($\text{OH}^\cdot$), peroksilni ($\text{RO}_2^\cdot$), superoksidni ($\text{O}_2^{\cdot-}$) ili reaktivni neradikalni derivati kao singletni kisik ($^1\text{O}_2$) i vodikov peroksid (H_2O_2) (Sies, 1985). Ti su oblici uobičajeni međuprodukti koji u biljkama nastaju u fotosintetskom transportnom lancu elektrona (Arora et al., 2002) te ih u fiziološki povoljnim uvjetima neutraliziraju antioksidacijski mehanizmi koji održavaju reducirajući mikrokoliš unutar stanica (Das i sur., 2014; Poljsak i sur., 2013). Molekule ROS imaju veliku važnost u mnogobrojnim staničnim procesima, primjerice u unutarstaničnoj signalizaciji, proliferaciji, apoptozi te imunološkom odgovoru (Matés i Sánchez-Jiménez, 1999).

Na sve žive organizme utječu razni biotički i abiotički čimbenici koji na organizme mogu djelovati stresno (Balachandran i sur., 1997; Mittler, 2006). Takvi čimbenici su primjerice razni patogeni organizmi, teški metali u okolišu, suša, obilna kiša, ekstremno niske ili visoke temperature,

UV zračenje, manjak nutrijenata, povišeni salinitet itd., a predstavljaju izazov u preživljavanju i održavanju stanične homeostaze. Takvi uvjeti nisu fiziološki povoljni i dovode do pojačanog stvaranja molekula ROS-a, što može dovesti do pojave oksidacijskog stresa čiju je definiciju dao Sies (1985), a definira ga kao neravnotežu između oksidansa i antioksidansa u smjeru oksidansa. Primjerice, kloroplasti u biljkama i algama su stanični organeli vrlo podložni oksidacijskom stresu zbog povećane koncentracije kisika, protoka elektrona i prisustva metala u njihovom mikrokolišu (Foyer, 1996). U uvjetima snažnog osvjetljenja, koje predstavlja stres, apsorbira se više svjetlosti no što se može iskoristiti te se energija prenosi na molekule kisika (O_2) i nastaju molekule u pobuđenom stanju, npr. singletni kisik koji je snažan elektrofil i vrlo lako oksidira druge molekule u blizini. Nadalje, $O_2^{\cdot -}$ je reaktivni oblik koji može nastati redukcijom kisika u fotosustavu I (Mehlerova reakcija) i može lako difundirati u citoplazmu gdje se pretvara u O_2 , ali i H_2O_2 koji je također ROS molekula. H_2O_2 može ući u reakciju s reduciranim ionima metala i kao produkt dati $OH^{\cdot}$ koji je snažan oksidans i može dalje reagirati i oštetiti mnoge biološke komponente u stanici (Okamoto i sur., 2001).

Toksičnost koju ROS molekule izazivaju leži u njihovoj sposobnosti da izazivaju kaskade reakcija koje dovode do oštećenja biološki važnih molekula i genetičkog materijala te konačno do smrti stanice (Mittler 2002). Naime, ako je izloženost stresorima dugotrajna i snažna, ROS molekule mogu ući u oksidacijske ili redukcijske reakcije s lipidima i šećerima, ali i makromolekulama poput proteina i molekule DNA te tako uzrokovati razna oštećenja u stanici (Esterbauer i sur., 1991).

1.2.1. Lipidna peroksidacija

Peroksidacija lipida je oksidacijska razgradnja lipida. Slobodni radikali koji su nastali zbog učinka oksidacijskog stresa reagiraju s lipidima u staničnoj membrani što rezultira oštećenjem stanica zbog razgradnje višestruko nezasićenih masnih kiselina (eng. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA), narušavanja cjelovitosti stanične membrane te naknadnih oštećenja bioloških makromolekula produktima peroksidacije (Štefan i sur., 2007). Slobodni radikali reagiraju s PUFA zato što one sadrže nezasićenu (dvostruku) vezu između kojih se nalaze metilenske skupine ($-CH_2-$) čiji su vodikovi atomi podložni reakciji.

Reakcija lipidne peroksidacije odvija se mehanizmom lančane reakcije slobodnih radikala i može se podijeliti u tri faze: inicijaciju, propagaciju i terminaciju. Faza inicijacije započinje napadom molekula ROS-a, sposobnih da izdvoje reaktivni atom vodika iz metilenske skupine ($-CH_2-$). Tako iz molekula PUFA nastaju slobodni lipidni radikali (oksidansi) kao $OH^{\cdot}$. Ugljikovi radikali koji su nastali napadom molekula ROS-a nastoje se stabilizirati oblikujući konjugirane diene (Halliwell,

1991). U uvjetima gdje ima kisika konjugirani dieni se mogu spajati s O₂ te stvarati peroksilne radikale (LOO[•]), koji dalje reagiraju s atomima vodika susjednih bočnih lanaca molekula PUFA. Dolazi do oblikovanja lipidnih hidroperoksida (LOOH) i reaktivnih ugljikovih radikala, koji zatim nastavljaju mehanizam lančane reakcije slobodnih radikala. Lipidnu peroksidaciju katalizira hemski i nehemski vezano željezo i tijekom faze propagacije dolazi do disocijacije LOOH na LO[•] i LOO[•], što rezultira nakupljanjem konačnih produkata peroksidacije (Štefan i sur., 2007). Neki aldehidi koji nastaju kao konačni produkti lipidne peroksidacije su malondialdehid (MDA), propanal, heksanal i 4-hidroksinonenal (HNE).

Lipidna peroksidacija predstavlja izuzetno destruktivan proces u stanicama ukoliko se one ne uspiju obraniti, zato što lipidni peroksidi staničnu membranu oštećuju i direktno i indirektno putem radikala. Stoga su stanice razvile mehanizme za obranu od lipidne peroksidacije, a to su 1) prevencija disocijacije LOOH da se onemogući stvaranje novih radikala i 2) uklanjanje slobodnih radikala koji propagiraju mehanizam lančane reakcije (Cheeseman, 1993). Razina lipidne peroksidacije se zato koristi kao indikator oksidacijskog oštećenja staničnih membrana. Kao indikatori oksidacijskog stresa su općenito prihvaćeni kranji produkti lipidne peroksidacije, ponajviše MDA i HNE. Količina MDA se može odrediti spektrofotometrijski, reakcijom MDA i tiobarbituratne kiseline (TBA) nakon izlaganja stanica stresnim uvjetima (Shulaev i Oliver, 2006).

1.2.2. Oksidacija proteina

Oksidacija proteina se definira kao kovalentna modifikacija proteina potaknuta reakcijom proteina s molekulama ROS-a ili reakcijom proteina sa sekundarnim međuproduktima oksidacijskog stresa (Zhang i sur., 2013). Javlja se kao dio normalnih regulatornih procesa u stanicama, kao jedna linija obrane protiv oksidacijskog stresa ili kao proces koji je izrazito štetan za stanice ako je antioksidacijski mehanizam obrane protiv stresa nadjačan.

Većina oksidacijskih modifikacija proteina događa se na bočnim lancima aminokiselina, što uključuje tiolnu oksidaciju, aromatsku hidroksilaciju i stvaranje proteinskih karbonila (Stadtman, 1990). Od svih aminokiselina, metionin i cistein su najpodložniji oksidaciji jer sadrže atom sumpora (Shacter, 2000). Osim na bočnim lancima aminokiselina oksidacijsko cijepanje može zahvatiti i polipeptidne okosnice. Njih uglavnom oksidiraju ROS molekule te uzrokuju njihovu fragmentaciju i konformacijske promjene (Zhang i sur., 2013). Navedene promjene utječu na fizikalna i kemijska svojstva proteina npr. topljivost, hidrofobnost, kapacitet zadržavanja vode i drugo. Proteinski karbonili kao produkti ne nastaju oksidacijom histidina, fenilalanina i triptofana, ali nastaju

oksidacijom aminokiselina arginin, histidin, lizin, prolin, treonin i glutaminska kiselina, oksidacijskim cijepanjem polipeptida, vezanjem aldehida nastalih u lipidnoj peroksidaciji ili redukcijskom reakcijom šećera. Zbog toga, kao i zbog svoje stabilnosti, određivanje količine proteinskih karbonila koristi se kao najčešći način mjerenja razine oksidacije proteina. Ta se metoda vrši spektrofotometrijski na valnoj duljini od 370 nm, a zasniva na reakciji 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) i proteinskih karbonila čiji su produkti hidrazoni (Levine i sur., 1994).

1.2.3. Antioksidacijski enzimi

Antioksidans je bilo koja tvar koja može odgoditi, spriječiti i ukloniti oksidacijsko oštećenje određene molekule (Gutteridge i Halliwell, 2007). Stanice su razvile učinkovitu obranu protiv oksidacijskih oštećenja, a antioksidacijska obrana može djelovati na više načina: sprečavanjem nastanka slobodnih radikala, neutralizacijom nastalih radikala, povećanim uklanjanjem oštećenih molekula te sprečavanjem popravka oštećenih molekula (Štefan i sur., 2007). Za kontrolu razine molekula ROS-a više biljke i alge posjeduju antioksidanse male molekulске mase (askorbinska kiselina, reducirani glutathion, karotenoidi, tokoferoli), i enzimske antioksidanse, kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), pirogalol peroksidaza (PPX) te askorbat peroksidaza (APX), koji djeluju specifično i selektivno s reduciranim kisikovim međuproduktima (Gutteridge i Halliwell, 1988). Mnoga istraživanja su pokazala da je održavanje što većeg antioksidacijskog kapaciteta u stanici povezano s većom tolerancijom na stres (Dat i sur., 1998; Pedrajas i sur., 1993; Thomas i sur., 1999). No dokazano je i da povećanje aktivnosti antioksidacijskih enzimskih ukazuje i na prisutnost oksidacijskog stresa uvjetovnog nekim okolišnim čimbenicima. Stoga se aktivnost antioksidacijskih enzima koristi kao biomarker oksidacijskog stresa (Bajguz, 2010).

Katalaza (eng. *catalase*, CAT) je tetramerni enzim prisutan u prokariotskim i eukariotskim stanicama. Svaka njezina podjedinica sadrži molekulu hema na koju je vezan atom željeza, što omogućuje ovom enzimu da reagira s H₂O₂. Najčešće se nalazi u peroksisomima koji su mjesto najveće produkcije H₂O₂, no prisutna je i u mitohondrijima, citosolu, izvan stanice kao slobodni enzim ili vezana za staničnu membranu. CAT svojom aktivnošću uzrokuje raspad H₂O₂ na H₂O i O₂ prema jednadžbi kemijske reakcije (Das i Roychoudhury, 2014):



Njena aktivnost može se spektrofotometrijski izmjeriti praćenjem utroška H_2O_2 . CAT je katalitički visoko učinkovit enzim, ali ima izrazito nizak afinitet prema supstratu jer je za reakciju raspada H_2O_2 potreban simultani dolazak dvije takve molekule u aktivno mjesto (Willekens i sur., 1995).

Peroksidaze su skupina enzima koje se svrstavaju u tri razreda. Askorbat peroksidaza (APX) pripada peroksidazama razreda I, lignin peroksidaza (LiP) pripada peroksidazama razreda II, a pirogalol peroksidaza (PPX) pripada peroksidazama razreda III.

PPX je enzim koji spada u skupinu nespecifičnih peroksidaza (POX). One kataliziraju pretvorbu H_2O_2 u H_2O . Enzimi POX dobivaju ime prema supstratu kojeg oksidiraju; prema tome enzim PPX je svoj naziv dobio zato što kao donor elektrona koristi pirogalol. Jednadžba pretvorbe H_2O_2 u H_2O uz pirogalol kao donor elektrona je sljedeća:



APX posjeduje molekulu hema u svom aktivnom centru (Welinder, 1992.) Sastavni je dio glutation-askorbat ciklusa, metaboličkog puta kojim se rješava višak H_2O_2 , a koji nastaje kao otpadni produkt metabolizma. APX ima visok afinitet prema H_2O_2 , stoga je njegova uloga uklanjanje H_2O_2 njegovom redukcijom u H_2O , koristeći pritom askorbinsku kiselinu (eng. *ascorbic acid*, AA) kao specifični donor elektrona; kao produkti nastaju još dvije molekule monodehidroaskorbinske kiseline (eng. *monodehydroascorbate acid*, MDHA) prema jednadžbi:

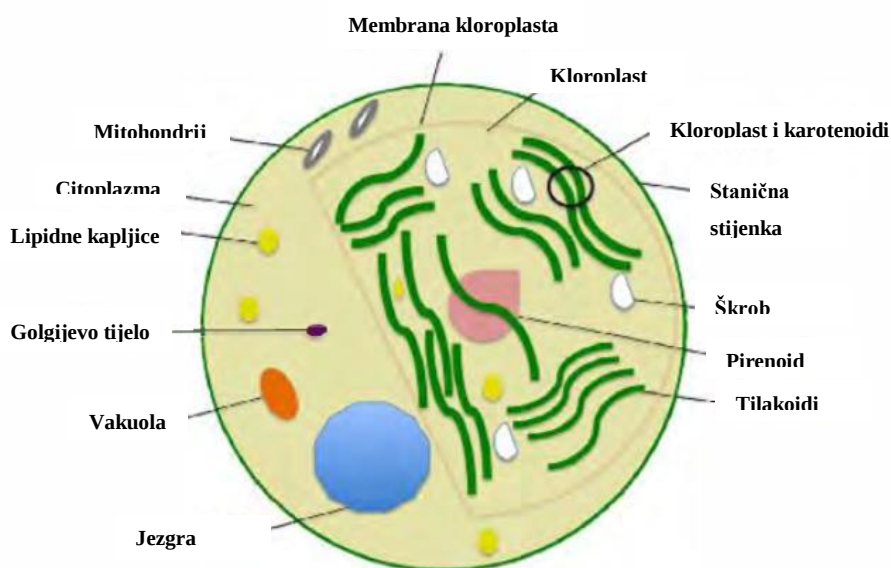


1.3. Zelena alga *Chlorella vulgaris* kao model u toksikološkim istraživanjima

Zelene alge su osobito važna skupina organizama jer izvode fotosintezu i proizvode kisik, a i izvor su hrane mnogim vrstama u morskim i slatkovodnim ekosustavima. S obzirom da su zelene alge široko rasprostranjene u vodenim ekosustavima i brzo reagiraju na prisustvo zagađivača, prikladan su modelni organizam za utvrđivanje onečišćenja voda (Špoljarić, 2013). Izlaganje algi nepovoljnim okolišnim uvjetima pospješuje nastanak ROS molekula, što dovodi do pojave oksidacijskog stresa (Holzinger i Pichrtová, 2020).

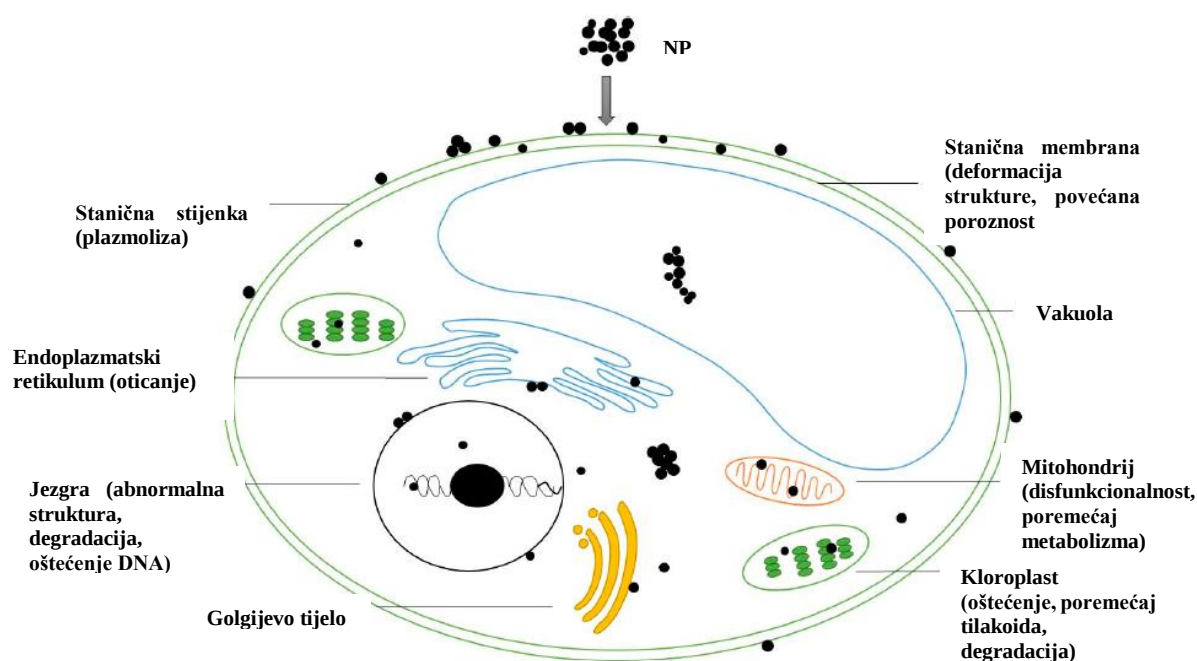
Zelena alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck pripada rodu *Chlorella*, porodici Chlorellaceae, koljenu Chlorophyta, carstvu biljaka te domeni eukariota. Članovi roda *Chlorella* tradicionalno pripadaju porodici Chlorellaceae, koja je nedavno podijeljena u dva klada: klad *Parachlorella* i klad

Chlorella (Krienitz et al. 2004; Luo et al. 2010), a vrsta *C. vulgaris* pripada kladu *Chlorella*. Ovu vrstu opisao je 1980. godine prošlog stoljeća znanstvenik Martin Willem Beijerinck. Naziv *Chlorella* dolazi od grčke riječi *chloros* (Χλωρός) što znači „zeleno“, a latinski sufiks *ella* odnosi se na njezinu mikroskopsku veličinu. To je jednostanična slatkovodna alga koja je prisutna na Zemlji još od doba prekambrija, doba prije 2,5 milijardi godina. 1990-ih godina prošlog stoljeća njemački su znanstvenici otkrili da sadrži bogat udio proteina i otada se ova alga spominje kao mogući prehrambeni proizvod, a danas se koristi kao dodatak prehrani (Safi i sur., 2014.) *Chlorella* se koristi i kao lijek jer se pokazalo da ima učinak na poboljšanje imuniteta i posjeduje anti-tumorska svojstva (Konishi i sur., 1985; Singh i sur., 1999). Alga *C. vulgaris* je sferičnog oblika i radijusa veličine 2-10 μm (Illman i sur., 2000; Yamamoto i sur., 2004). Stanicu obavija čvrsta stanična stijenka koja ima zaštitnu ulogu protiv patogena ili okolišnog stresa. Iako se smatralo da *C. vulgaris* ima jednoslojnu staničnu stijenku, Martinez i sur. (1991) su dokazali prisutnost sporopoleninskog sloja zbog kojeg je stanična stijenka tako čvrsta. Citoplazma se sastoji od vode, topivih proteina, minerala i lipidnih kapljica, a u njoj se nalaze mitohondriji, jezgra, vakuola, jedan kloroplast i Golgijevo tijelo (Slika 2). Kloroplast je vrčastog oblika i ispunjava gotovo cijelu citoplazmu. Sadrži omotač s dvostrukom membranom čiji su osnovni sastojci fosfolipidi; vanjska membrana je propusna za metabolite i ione, a unutarnja membrana je polupropusna za specifične proteine (Safi i sur., 2014). Kloroplast sadrži tilakoide čiji su dominantni fotosintetski pigmenti klorofil a i b koji za fotosintezu koriste Sunčevu svjetlost valne duljine od 450-475 nm i 630-675 nm. U fotosintezi sudjeluju i karoteinodi koji apsorbiraju valne duljine od 400-550 nm, što znači da crvena (600-700 nm) i plava (500-500 nm) svjetlost stimuliraju rast alge (Blair i sur., 2014).



Slika 2. Shematski prikaz ultrastrukture stanice alge *C. vulgaris*. Preuzeto iz Safi i sur. (2014).

Alga *C. vulgaris* je zbog brzog i lakog uzgoja u kulturi postala idealni model u istraživanju fiziologije biljaka i algi (Mariano i sur., 2020.; Silva i sur., 2019). U novije vrijeme *C. vulgaris* je postala i objekt u istraživanjima koja prate nastanak oksidacijskog stresa nastalog nakon izlaganja česticama AgNP (Qian i sur., 2016; Zheng i sur., 2019; Hazeem i sur., 2019). U istraživanju Wang i sur. (2019) istražen je transport AgNP u stanice algi te se smatra da nakon ulaska u stanicu AgNP mogu uzrokovati razna stanična oštećenja te negativno utjecati na metabolizam i reprodukciju samih stanica. Slika 3. prikazuje utjecaj AgNP na stanicu alge.



Slika 3. Shematski prikaz utjecaja AgNP na dijelove stanice alge. Preuzeto iz Wang F. i sur. (2019).

CILJ ISTRAŽIVANJA

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Ovim istraživanjem željela sam ispitati učinak nanočestica srebra (AgNP) stabiliziranih omotačem od polivinilpirolidona (AgNP-PVP) na rast i antioksidacijski odgovor alge vrste *Chlorella vulgaris*, a ciljevi su bili:

1. Utvrditi stabilnost ispitivanih koncentracija AgNP-PVP u tekućoj hranjivoj podlozi.
2. Utvrditi utječu li ispitivane koncentracije AgNP-PVP na rast stanica algi.
3. Utvrditi uzrokuju li ispitivane koncentracije AgNP-PVP na oštećenje biološki važnih molekula (lipida i proteina) tj. pojavu oksidacijskog stresa u stanicama algi.
4. Utvrditi uzrokuju li ispitivane koncentracije AgNP-PVP promjene u aktivnosti i ekspresiji antioksidacijskih enzima katalaze (CAT), pirogalol peroksidaze (PPX) i askorbat peroksidaze (APX).

MATERIJALI I METODE

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Fikološki materijal

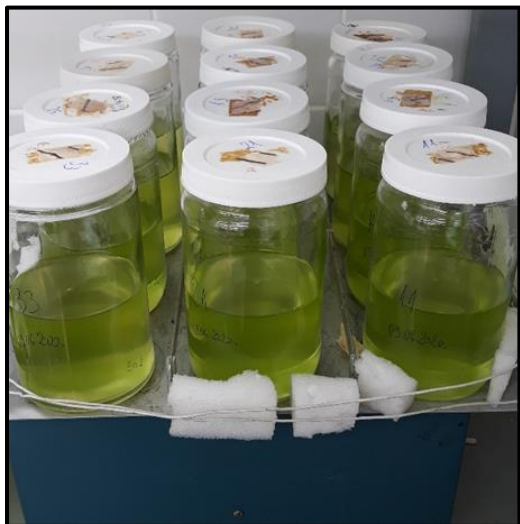
Kultura alge *Chlorella vulgaris*, soj SAG/211-11b, koja je korištena u istraživanju uzgojena je u istraživačkom institutu *Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften* Sveučilišta u Göttingenu (*Georg-August-Universität Göttingen*) te kultivirana u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

3.2. Metode

3.2.1. Kultura alge *Chlorella vulgaris*

3.2.1.1. Uvjeti uzgoja

Kultura algi *C. vulgaris* nasadena je na tekuću hranjivu podlogu (Bischoff i Bold, 1963; BBM) (Tablice 1 i 2) u prethodno autoklaviranim, sterilnim staklenkama zatvorenim plastičnim čepovima u laminaru i održavana na tresilici smještenoj u komori za uzgoj biljaka pri fotoperiodu od 16 sati svjetlosti i 8 sati tame, temperaturi od 24 °C i intenzitetu svjetlosti od 20 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Slika 4). Kultura algi održavana je presađivanjem na svježju tekuću podlogu BBM svakih 14 dana kako bi se osigurao dovoljan broj stanica algi za eksperiment.



Slika 4. Kulture alge *C. vulgaris* na tresilici u uzgojnoj komori (fotografija: K. Terlević).

Tablica 1. Sastav hranjive podloge BBM pH 6,6 (Bischoff i Bold, 1963)

Sastojak	γ (g L ⁻¹ dH ₂ O)	Volumen sastojka za pripremu 1 L medija (mL)	Volumen matične otopine (mL)
NaNO ₃	25	10	1000
CaCl ₂ x 2H ₂ O	2,5	10	1000
MgSO ₄ x 7H ₂ O	7,5	10	1000
K ₂ HPO ₄	7,5	10	1000
KH ₂ PO ₄	17,5	10	1000
NaCl	2,5	10	1000
otopina EDTA*	*	1	1000
Zakiseljena otopina željeza**	**	1	1000
H ₃ BO ₃	11,42	1	1000
Otopina metala u tragovima***	***	1	1000

Tablica 2. Detaljan sastav otopine EDTA, zakiseljene otopine željeza i otopine metala u tragovima, koje su korištene za pripremu podloge BBM.

*EDTA otopina	Količina sastojka	Volumen matične otopine (mL)
EDTA	50 g	1000
KOH	31 g	1000
**Zakiseljena otopina željeza		
FeSO ₄ x 7H ₂ O	4,98 g	1000
H ₂ SO ₄ (96%)	1 mL	1000
***Otopina metala u tragovima		
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	8,82 g	1000
MnCl ₂ x 4H ₂ O	1,44 g	1000
MoO ₃	0,70 g	1000
CuSO ₄ x 5H ₂ O	1,56 g	1000
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,50 g	1000

3.2.1.2. Praćenje rasta kulture alge *C. vulgaris* i određivanje suhe tvari

Rast kulture alge *C. vulgaris* praćen je brojanjem stanica u Bürker-Türk-ovoj komorici pod svjetlosnim mikroskopom na povećanju od $40\times$ u vremenskom periodu od 14 dana, svakog dana u isto vrijeme. Iz 12 replika nasađenih kultura algi izdvojen je alikvot od 1 mL i pripremljena su razrjeđenja za brojanje. Razrjeđenja su pripremljena tako da se pomiješalo 100 μ L kulture alge i 500 μ L deH₂O. Stanice algi brojane su uz pomoć ručnog brojača (*hand tally counter*, *Heathrow scientific*, *SAD*). Konačni rezultati su izraženi umnoškom srednje vrijednost broja izbrojanih stanica u Bürker-Türk-ovoj komorici, razrjeđenja i vrijednosti 10^4 . Vrijednost 10^4 (izraženo u mL) jest volumen kvadratnog polja unutar kojeg se broje stanice, stoga se konačni rezultat množi s 10^4 . Rast kulture algi pratio se brojanjem stanica kroz 14 dana kako bi se odredilo trajanje eksponencijalne faze rasta stanica algi.

Prirast kulture algi nakon tretmana praćen je na isti način kako je prethodno opisano, ali u periodu od 24 sata. Stanice su brojane na dan kad su alge postavljene na tretman (nulti dan) i nakon 24 sata (prvi dan) u isto vrijeme, kako bi se utvrdila promjena broja stanica algi nakon tretmana. Prirast je izračunat prema formuli (Allaguatova i sur., 2019):

$$m = \frac{\ln(N_2/N_1)}{t_2 - t_1}$$

pri čemu je:

m – prirast kulture

ln – prirodni logaritam

N_2/N_1 – razlika broja stanica n-tog dana brojanja i nultog dana brojanja

t_2 – n-ti dan brojanja stanica

t_1 – nulti dan brojanja stanica

Rast kultura algi je osim brojanjem stanica u Bürker-Türk-ovoj komorici praćen i spektrofotometrijski, mjerenjem optičke gustoće suspenzija stanica kroz vremenski period od 14 dana, svaki dan u isto vrijeme. Na temelju dobivenih podataka optičke gustoće na valnoj duljini od 750 nm mjerene svakog dana kroz vremenski period od 14 dana izračunata je masa suhe tvari (mg L⁻¹) algi, što zapravo predstavlja njenu biomasu. Mjeri se zato da bi se utvrdilo u kojem će se trenutku biomasa algi početi smanjivati te se dobiveni podaci koriste za određivanje trajanja eksponencijalne

faze kulture algi. U plastičnu kivetu prebačen je 1 mL suspenzije te je mjerena apsorbancija uzoraka spektrofotometrom pri valnoj duljini od 750 nm (OD_{750}).

Suha tvar (eng. *dry weight*, DW) je izračunata prema formuli regresijske analize (Lukavsky, 1992):

$$DW \text{ (mg L}^{-1}\text{)} = 3,31 + 179,45 \times A_{750} + 617,45 \times A_{750}^2$$

pri čemu je:

A_{750} – apsorbancija uzoraka izmjerena spektrofotometrom pri 750 nm

3,31 – odsječak na osi y

179,45 – koeficijent nezavisne varijable 1

617,45 – koeficijent nezavisne varijable 2

Rezultati su prikazani kao krivulja rasta (biomasa algi kroz vremenski period od 14 dana).

3.2.1.3. Izlaganje kulture alge *C. vulgaris* otopinama AgNP različitih koncentracija

Za tretman su uzete stanice algi u eksponencijalnoj fazi rasta (14. dan kulture) s početnom koncentracijom stanica od 1×10^7 stanica po mL podloge. U 300 mL stanične suspenzije u podlozi BBM dodan je odgovarajući volumen matične otopine 0,8983 mM AgNP-PVP kako bi se postigle koncentracije od 5, 10 i 20 μ M AgNP, u kojima su alge zatim tretirane 24 sata.

3.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje stabilnosti AgNP-PVP

3.2.2.1. Spektrofotometrijsko određivanje stabilnosti AgNP-PVP u podlozi za izlaganje

Stabilnost nanočestica srebra određena je spektrofotometrijski, metodom prema Peharec Štefanić i sur. (2018). Tekuća podloga BBM pripremljena je prema Tablicama 1. i 2. i autoklavirana u čistoj bočici od 50 mL. Jedan mL podloge prebačen je u tri različite kivete u koje su pipetom dodani određeni volumeni matične otopine AgNP-PVP kako bi se postigle koncentracije od 5, 10 i 20 μ M. Otopina AgNP-PVP u sterilnoj Milli Q vodi, odgovarajuće koncentracije, korištena je kao kontrola. U svakoj otopini izmjerena je apsorbancija u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm u vremenskim intervalima od 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30 minuta te 1, 2, 3, 4, 5, 24 sati. Dobiveni setovi podataka su analizirani te su konačni rezultati prikazani kao grafovi stabilnosti AgNP u podlozi BBM.

3.2.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje stabilnosti AgNP-PVP u kulturi alge *C. vulgaris*

Nakon rasta kulture algi u tekućoj podlozi BBM 14 dana na tresilici u komori za uzgoj biljaka, uzeti su alikvoti podloge te je po 1 mL podloge prebačen u kivete. U svaku kivetu je potom dodan određeni volumen matične otopine 0,8983 mM AgNP-PVP kako bi se postigle koncentracije od 5, 10 i 20 μ M. Jedan mL kulture algi bez dodane matične otopine AgNP-PVP korišten je kao kontrola. U svakoj otopini izmjerena je apsorbancija u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm u vremenskim intervalima od 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30 minuta te 1, 2, 3, 4, 5, 24 sati. Dobiveni setovi podataka su analizirani te su konačni rezultati prikazani kao grafovi stabilnosti AgNP u kulturi alge.

3.2.3. Ekstrakcija ukupnih topivih proteina

Za ekstrakciju topljivih proteina, 300 mL svake tretirane i kontrolne kulture algi centrifugirano je 10 minuta na 1702 g pri 22 °C u Falcon epruvetama od 50 mL, nakon čega su supernatanti bačeni. Talozi su resuspendirani u 1 mL hladnog 0,1 M kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0). 50 mL tog pufera pripremljeno je tako da se pomiješa 1,925 mL 1 M KH_2PO_4 , 3,075 mL 1 M K_2HPO_4 (omjer 1:2) i nadopuni s reH_2O . Talozi su potom centrifugirani 1×10 minuta na 1702 g pri 22 °C. Supernatanti su bačeni, a talozi resuspendirani u 500 μ L hladnog 0,1 M kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0). Stanice algi u talozima smrvljene su zatim u uređaju za razbijanje stanica (*Constant Cell Disruption Systems*, UK) nakon pet uzastopnih ponavljanja usitnjavanja pri tlaku od 37,000 psi (2,500 bar). Homogenati su zatim centrifugirani 15 minuta pri 20854 g i 4 °C, nakon čega su supernatanti prebačeni u čiste tubice te ponovo centrifugirani 45 minuta pri 20854 g i 4 °C. Tako pripremljeni uzorci prebačeni su u čiste tubice i pohranjeni na temperaturi od -20 °C kako bi se očuvali za sljedeće analize: određivanje sadržaja malondialdehida i proteinskih karbonila, spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima te određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima u gelu.

3.2.4. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija proteina određena je spektrofotometrijski metodom prema Bradfordu (1976), koja se temelji se na reakciji između Bradfordovog reagensa i proteinskog ekstrakta. U plastičnim tubicama pripremljena je reakcijska smjesa za mjerenje, koja je sadržavala je 20 μ L proteinskog ekstrakta i 980 μ L Bradford radne otopine (2,58% (v/v) etanol, 5,28% (v/v) H_3PO_4 , te 6% (v/v)

Bradford matična otopina koja se sastoji od 0,01% CBB G-250 (eng. *Coomassie Brilliant Blue G-250*, CBB), 31,35% (v/v) etanol te 58,6% (v/v) H_3PO_4). Za slijepu probu je umjesto proteinskog ekstrakta dodano 20 μL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0). Tubice s reakcijskim smjesama kratko su promiješane na vortexu i ostavljene u mraku 10 minuta, nakon čega je njihov sadržaj prebačen u kivete. Spektrofotometrom je mjerena apsorbancija na valnoj duljini od 595 nm. Koncentracija proteina izražena u mg mL^{-1} , izračunata je iz baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije u reakciji Bradfordovog reagensa i niza otopina albumina goveđeg seruma (eng. *bovine serum albumin*, BSA) poznatih koncentracija (0,2 – 2,0 mg mL^{-1}).

3.2.5. Detekcija molekula ROS i određivanje vijabilnosti u stanicama algi *in situ* primjenom fluorescentnih boja

3.2.5.1. Detekcija molekula ROS primjenom boje dihidroetidij

Razina oksidacijskog stresa u stanici mjerena je detekcijom molekula ROS-a, primjenom fluorescentne boje dihidroetidij (DHE), koja primarno reagira sa superoksidnim anionom ($\text{O}_2^{\cdot-}$). Boja DHE prolaskom kroz staničnu membranu reagira sa $\text{O}_2^{\cdot-}$ pri čemu nastaje 2-hidroksietidij, koji fluorescira. Stoga, što je veća količina molekula $\text{O}_2^{\cdot-}$ u stanici, veći je i intenzitet fluorescencije.

Nastanak $\text{O}_2^{\cdot-}$ mjereno je u 500 μL suspenzije stanica algi nakon 24 h tretmana s 5, 10 i 20 μM AgNP-PVP. Kontrolni uzorak bila je kultura algi koje nisu bile izložene česticama AgNP-PVP. Uzorci od svake ispitane koncentracije su prvo inkubirani u 8 μL 10 μM otopine boje DHE tijekom 5 minuta u plastičnoj tubici na sobnoj temperaturi. Nakon toga uzorci su pipetom prenijeti na predmetno stakalce, promatrani fluorescencijskim mikroskopom *Olympus BX51*, fotografirani visokorezolucijskom kamerom *Olympus DP70* te su fotografije spremljene za analizu. Preparati su fotografirani pri povećanju objektiva od 60 $\times$ i filteru 3 (ekscitacija zeleno svjetlo, emisija crveno svjetlo) pri ekspoziciji od 1,5 sec. Analiza intenziteta fluorescencije izvedena je računalnim programom *Lucida 6.0* koji mjeri srednji intenzitet obojenja 100 nasumično odabranih stanica po predmetnom stakalcu. Rezultati su prikazani kao relativan intenzitet u odnosu na kontrolni uzorak.

3.2.5.2. Detekcija molekula ROS primjenom boje 2',7'-diklorohidrofluorescein diacetat

Razina oksidacijskog stresa u stanici mjerena je detekcijom molekula ROS-a i primjenom fluorescentne boje 2',7'-diklorohidrofluorescein diacetat (H₂DCF-DA), koja se primarno koristi za detekciju H₂O₂ u stanici. Molekula H₂DCF-DA prolazi kroz staničnu membranu, reagira s H₂O₂ te nastaje 2'-7'-diklorohidrofluorescein koji fluorescira.

Nastanak H₂O₂ mjen je u 500 µL suspenzije stanica algi nakon 24 h tretmana s 5, 10 i 20 µM AgNP-PVP. Kontrolni uzorak bila je kultura algi koje nisu bile izložene česticama AgNP-PVP. Uzorci od svake ispitane koncentracije su prvo inkubirani u 8 µL 10 µM otopine boje H₂DCF-DA tijekom 5 minuta u plastičnoj tubici na sobnoj temperaturi. Nakon toga uzorci su pipetom prenijeti na predmetno stakalce, promatrani fluorescencijskim mikroskopom *Olympus BX51*, fotografirani visokorezolucijskom kamerom *Olympus DP70* te su fotografije spremljene za analizu. Preparati su fotografirani pri povećanju objektiva od 60× i filteru 2 (ekscitacija plavo svjetlo, emisija zeleno svjetlo) pri ekspoziciji od 0,25 sec. Analiza intenziteta fluorescencije izvedena je računalnim programom *Lucida 6.0* koji mjeri srednji intenzitet obojenja 100 nasumično odabranih stanica po predmetnom stakalcu. Rezultati su prikazani kao relativan intenzitet u odnosu na kontrolni uzorak.

3.2.5.3. Određivanje vijabilnosti stanica primjenom propidijevog jodida

Vijabilnost stanica algi mjerena je detekcijom oštećenja stanica primjenom fluorescentne boje propidij jodid (PI), koja je korištena kao indikator vijabilnosti. Boja PI u normalnim uvjetima ne može prodrijeti kroz staničnu membranu, no ukoliko prođe kroz nju, može se pretpostaviti da je ta stanica oštećena ili mrtva. Ukoliko je to slučaj, takve stanice fluoresciraju crveno.

Vijabilnost stanica analizirana je u 500 µL suspenzije stanica algi nakon 24 h tretmana s 5, 10 i 20 µM AgNP-PVP. Kontrolni uzorak bila je kultura algi koje nisu bile izložene česticama AgNP-PVP. Uzorci od svake ispitane koncentracije su prvo inkubirani u 8 µL 1 µM otopine boje PI tijekom 5 minuta u plastičnoj tubici na sobnoj temperaturi. Nakon toga uzorci su pipetom prenijeti na predmetno stakalce, promatrani fluorescencijskim mikroskopom *Olympus BX51*, fotografirani visokorezolucijskom kamerom *Olympus DP70* te su fotografije spremljene za analizu. Preparati su fotografirani pri povećanju objektiva od 60× i filteru 3 (ekscitacija zeleno svjetlo, emisija crveno svjetlo) pri ekspoziciji od 1,2 sec. Analiza intenziteta fluorescencije izvedena je računalnim programom *Lucida 6.0* koji mjeri srednji intenzitet obojenja 100 nasumično odabranih stanica po predmetnom stakalcu. Rezultati su prikazani kao relativan intenzitet u odnosu na kontrolni uzorak.

3.2.6. Određivanje sadržaja malondialdehida

Prije određivanja sadržaja malondialdehida bilo je potrebno je ekstrahirati lipide, za što je po 6 replika stanične suspenzije algi svakog tretmana smrvljeno u 700 μL ekstrakcijske smjese (0,5% (w/v) tiobarbituratna kiselina (TBA) u 20% (w/v) trikloroctennoj kiselini (TCA)). Dobiveni ekstrakti prebačeni su u plastične tubice za daljnju analizu.

Spektrofotometrijsko određivanje količine malondialdehida (Heath i Packer, 1968) koristi se kao metoda za određivanje razine lipidne peroksidacije. Prethodno dobiveni ekstrakti zagrijavani su u termomikseru na temperaturi od 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 minuta. Pri zagrijavanju potrebno je ostaviti tubice otvorenima jer smjesa vrije. Nakon zagrijavanja, ekstrakti su ohlađeni u ledenoj kupelji te centrifugirani 30 minuta na 20854 g pri 4 $^{\circ}\text{C}$. Dobiveni supernatanti su prebačeni u kivete, nakon čega im je spektrofotometrom izmjerena apsorbancija na valnim duljinama od 532 nm i 600 nm. Vrijednost apsorbancije mjerena na 532 nm oduzeta je od vrijednosti mjerene na 600 nm i tako je napravljena korekcija za nespecifično zamućenje. Koncentracija lipidnih peroksida izražena je kao sadržaj MDA u nmol g^{-1} svježe tvari, a formula glasi:

$$\text{sadržaj MDA} = \frac{A_{532} - A_{600}}{m \times \varepsilon \times l} \text{ [nmol g}^{-1} \text{ svježe tvari]}$$

pri čemu je:

A_{532} – apsorbancija izmjerena na valnoj duljini od 532 nm

A_{600} – apsorbancija izmjerena na valnoj duljini od 600 nm

m – masa tkiva (g)

ε – molarni apsorpcijski koeficijent ($155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l – duljina puta (cm)

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika $\pm$ standardna pogreška.

3.2.7. Određivanje sadržaja proteinskih karbonila

Spektrofotometrijsko određivanje količine proteinskih karbonila (Levine i sur., 1994) koristi se kao metoda za određivanje oksidacije proteina. Za određivanje sadržaja proteinskih karbonila pripremljena su dva seta tubica; u jedan set je stavljeno 200 μL proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.2.3.) i 300 μL 10 mM dinitrofenilhidrazina (DNPH) u 2 M HCl, a u drugi set, koji je služio kao kontrola, stavljeno je 200 μL proteinskog ekstrakta i 300 μL 2 M HCl. Sadržaji tubica su promiješani

na vortexu i ostavljeni u mraku sat vremena uz povremeno potresanje. Nakon 1 sata u sve uzorke dodano je 500 μL 10 % (w/v) TCA za precipitaciju proteina. Uzorci su potom stavljeni 5 minuta u hladnjak na temperaturu od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i potom centrifugirani 10 minuta na 20854 g pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nakon centrifugiranja supernatanti su bačeni, a talozi su isprani $3 \times 500\text{ }\mu\text{L}$ otopine etanol/etilacetat u omjeru od 1:1 kako bi se uklonio nevezani reagens. Isprani talozi su na kraju otopljeni u 1 mL 6 M otopine uree u 20 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 2,4) uz miješanje na vortexu zbog lakšeg otapanja taloga. Pri mjerenju apsorbancije svaki uzorak s DNPH imao je svoju slijepu probu bez DNPH, a apsorbancija je mjerena pri valnim duljinama od 370, 280 i 260 nm. Apsorbancija se mjeri na valnim duljinama od 280 i 260 nm radi korekcije zbog moguće prisutnosti molekule DNA. Formula za izračunavanje sadržaja proteinskih karbonila jest:

$$\text{sadržaj karbonila} = \frac{A_{370}}{m \times \epsilon \times l} \quad [\mu\text{mol g}^{-1} \text{ svježe tvari}]$$

pri čemu je:

A_{370} – apsorbancija izmjerena na valnoj duljini od 370 nm

m – koncentracija proteina ($\text{mg}_{\text{proteina}} \text{ mL}^{-1}$)

ϵ – molarni apsorpcijski koeficijent ($22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l – duljina puta (cm)

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika $\pm$ standardna pogreška.

3.2.8. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima

3.2.8.1. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze

Za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze (CAT) (Aebi, 1984) pripremljena je reakcijska smjesa na način da je u 50 mL 50 mM kalij-fosfatog pufera (pH 7,0) dodano 51 μL 30%-tne otopine H_2O_2 . Za slijepu probu 950 μL reakcijske smjese pomiješano je s 50 μL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0), dok je za mjerenje uzoraka 950 μL reakcijske smjese pomiješano s 50 μL proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.2.3.) Aktivnost enzima katalaze mjerena je na valnoj duljini od 240 nm svakih 10 sekundi tijekom 2 minute čime se prati utrošak H_2O_2 . Aktivnost katalaze izražena je formulama:

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A(\text{s.v.}) \times 6 \times V(\text{s.r.}) \times \text{F.R.}}{V(\text{uz}) \times \epsilon \times l} \quad [\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}]$$

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A_{\mu\text{mol/min mL}}}{\text{mg(proteina)/mL}} \quad [\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteina}]$$

pri čemu je:

$\Delta A(\text{s.v.})$ – srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 240 nm u 10 sekundi

6 – faktor korekcije za $\Delta A(\text{s.v.})$ za izražavanje rezultata u minuti

$V(\text{r.s.})$ – volumen reakcijske smjese (1 mL)

F.R. – faktor razrjeđenja uzorka (1)

$V(\text{uz})$ – volumen uzorka (0,05 mL)

ϵ – molarni apsorpcijski koeficijent ($40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l – duljina optičkog puta (1 cm)

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 6 replika $\pm$ standardna pogreška.

3.2.8.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti pirogalol peroksidaze

Za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti pirogalol peroksidaze (PPX) (Nakano i Asada, 1981) pripremljena je reakcijska smjesa na način da je u 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0) otopljeno 0,126 g pirogalola te je neposredno prije njenog korištenja dodano 5,5 μL 30%-tne otopine H_2O_2 . Reakcijsku smjesu je potrebno zamotati u aluminijsku foliju ili uliti u tamnu bocu zbog osjetljivosti na svjetlost. Za slijepu probu korištena pomiješano je 980 μL reakcijske smjese i 20 μL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0), dok je za mjerenje uzoraka pomiješano 980 μL reakcijske smjese i 20 μL proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.2.3.). Aktivnost enzima pirogalol peroksidaze mjerena je na valnoj duljini od 430 nm svakih 15 sekundi tijekom 1 minute čime se prati nastanak produkta purpurogalina. Aktivnost enzima PPX izražena je formulama:

$$\text{PPX} = \frac{\Delta A(\text{s.v.}) \times 4 \times V(\text{s.r.}) \times \text{F.R.}}{V(\text{uz}) \times \epsilon \times l} \quad [\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mL}^{-1}]$$

$$\text{PPX} = \frac{\Delta A_{\mu\text{mol/min mL}}}{\text{mg(proteina)/mL}} \quad [\mu\text{mol}_{\text{produkta}} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteina}]$$

pri čemu je:

$\Delta A(s.v.)$ – srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 430 nm u 15 sekundi

4 – faktor korekcije za $\Delta A(s.v.)$ za izražavanje rezultata u minuti

$V(r.s.)$ – volumen reakcijske smjese (1 mL)

F.R. – faktor razrjeđenja uzorka (1)

$V(uz)$ – volumen uzorka (0,02 mL)

ϵ – molarni apsorpcijski koeficijent ($2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l – duljina optičkog puta (1 cm)

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 6 replika $\pm$ standardna pogreška.

3.2.8.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze

Za spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze (APX) (Nakano i Asada, 1981) pripremljene su sljedeće otopine: 10 mM EDTA, 50 mM kalij-fosfatni pufer (pH 7,0), pufer 1 sastavljen od 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0) i 500 μL 10 mM EDTA, 12 mM H_2O_2 te 10 mM askorbinska kiselina otopljen u 10 mL pufera 1. Slijepa proba pripremljena je miješanjem 800 μL pufera 1, 180 μL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0), 10 μL 10 mM askorbinske kiseline, a neposredno prije mjerenja dodane 10 μL 12 mM H_2O_2 . Za mjerenje uzoraka korištena je smjesa 800 μL pufera 1, 180 μL proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.2.3.), 10 μL 10 mM askorbinske kiseline i neposredno prije mjerenja dodane 10 μL 12 mM H_2O_2 . Aktivnost enzima askorbat peroksidaze mjerena je u kvarcnim kivetama na valnoj duljini od 290 nm svaku sekundu tijekom 15 sekundi čime se prati nastanak produkta oksidacije askorbinske kiseline. Aktivnost enzima APX izražena je formulama:

$$\text{APX} = \frac{\Delta A(s.v.) \times 4 \times V(r.s.) \times F.R.}{V(uz) \times \epsilon \times l} \quad [\mu\text{mol min}^{-1} \text{mL}^{-1}]$$

$$\text{APX} = \frac{\Delta A \mu\text{mol/min mL}}{\text{mg(proteina)/mL}} \quad [\mu\text{mol}_{\text{produkta}} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{proteina}}]$$

pri čemu je:

$\Delta A(s.v.)$ – srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 290 nm u 15 sekundi

4 – faktor korekcije za $\Delta A(s.v.)$ za izražavanje rezultata u minuti

V(r.s.) – volumen reakcijske smjese (1 mL)

F.R. – faktor razrjeđenja uzorka (1)

V(uz) – volumen uzorka (0,18 mL)

ε – molarni apsorpcijski koeficijent ($2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l – duljina optičkog puta (1 cm)

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost 6 replika $\pm$ standardna pogreška.

3.2.9. Razdvajanje proteina nativnom poliakrilamid gel elektroforezom

Enzime u stanicama te različite izoforme enzima moguće je razdvojiti i analizirati nativnom elektroforezom zato što pokretljivost proteina u poliakrilamidnom gelu ovisi o gustoći naboja molekule proteina, izoelektričnoj točki i molekulskoj masi (Balen i sur., 2011). Otopine za gelove (Tablica 3) pripremljene su i izlivenne u sendvič napravljen od staklenih ploča prema postupku koji je opisan u Balen i sur. (2011). Prvo je pripremljen gel za razdvajanje i ostavljen da se polimerizira 1 h na sobnoj temperaturi. Nakon toga je pripremljen gel za koncentriranje i umetnuti češljevi za izradu jažica. Gel je ostavljen da se polimerizira 1 h na sobnoj temperaturi, nakon čega je zamotan u plastičnu foliju i pohranjen u hladnjak na $+4^{\circ}\text{C}$ do sljedećeg dana. Staklene ploče s gelovima su prenesene na elektrodni nosač i uronjene u kadicu ispunjenu elektrodnim puferom (otopljeno 1,408 g askorbinske kiseline u 4 L 0,1 M kalij-fosfatnog pufera, pH 7,0). Prije nanošenja u jažice na gelu proteinski ekstrakti (poglavlje 3.2.3.) su pomiješani s bojom 0.005% (w/v) bromfenol plavo (eng. *bromophenol blue*, BFB) zbog vidljivosti i praćenja tijeka elektroforeze i 10 μL 0,5%-tne otopine saharoze koja osigurava pravilno i sigurno sjedanje uzoraka u jažice. Na gel je nanoseno 60 μg proteina po jažici. Elektroforeza je izvedena u kadici *PROTEAN® II xi cell* (Bio-Rad) na 4°C , prvih 45 minuta tekla je pri 100 V, nakon čega je napon povišen na 220 V do kraja elektroforeze.

Tablica 3. Sastav gelova za razdvajanje proteina poliakrilamid gel elektroforezom u nativnim uvjetima.

sastav	gel za koncentriranje (4%)	gel za razdvajanje (10%)
reH ₂ O	6,1 mL	16,8 mL
Tris-HCl	0,5 M; pH 6,8; 2,5 mL	1,5 M; pH 8,8; 10 mL
akrilamid/bisakrilamid (AA/Bis)	1,3 ml	13,2 mL
10% amonijev peroksodisulfat (APS)	50 μ L	200 μ L
tetrametiletilendiamin (TEMED)	10 μ L	20 μ L

3.2.9.1. Određivanje aktivnosti i broja izoformi antioksidacijskih enzima u gelu

3.2.9.1.1. Određivanje aktivnosti i broja izoformi katalaze

Po završetku elektroforeze, gel je ispran $3 \times$ po 15 minuta u deH₂O nakon čega je inkubiran 10 minuta u 100 mL deH₂O u koju je dodano 102 μ L 30%-tne otopine H₂O₂. Potom su pripremljene dvije otopine, otopina K₃Fe(CN)₆ (0,5 g K₃Fe(CN)₆ otopljeno u 50 mL deH₂O) i otopina FeCl₃ (0,5 g FeCl₃ otopljeno u 50 mL deH₂O) koje su pomiješane na magnetskoj mješalici neposredno prije upotrebe. U ovoj otopini gel je inkubiran sve dok se na plavo obojanoj pozadini nisu pojavile žute, a kasnije plave vrpce koje predstavljaju izoforme CAT (Woodbury i sur., 1971). Gel je potom skeniran i analiziran.

3.2.9.1.2. Određivanje aktivnosti i broja izoformi pirogalol peroksidaze

Gel za određivanje aktivnosti i broja izoformi pirogalol peroksidaze tretiran je prema metodi Chance i Maehly (1955). Gel je prvo inkubiran 30 minuta u 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0), a zatim u 100 mL 50 mM kalij fosfatnog-pufera (pH 7,0) s dodatkom 0,252 g pirogalola i

40 μL 30%-tne otopine H_2O_2 10 minuta, odnosno dok se na žutoj pozadini nisu pojavile smeđe vrpce koje predstavljaju izoforme PPX. Gel je nakon pojave vrpce skeniran i analiziran.

3.2.9.1.3. Određivanje aktivnosti i broja izoformi askorbat peroksidaze

Gel za određivanje aktivnosti i broja izoformi askorbat peroksidaze tretiran je prema metodi koju su objavili Mittler i Zilinskas (1993). Gel je inkubiran $3 \times$ po 10 minuta u otopini pripremljenoj otapanjem 0,212 g askorbinske kiseline u 50 mM kalij-fosfatnom puferu (pH 7,0). Nakon toga gel je inkubiran 20 minuta u otopini 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0) u kojoj je dodano još 0,14 g askorbinske kiseline i 41 μL 30%-tne otopine H_2O_2 . Gel je zatim ispran 1 minutu u 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,0) nakon čega je uslijedila inkubacija u otopini 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera (pH 7,8) sa 860 μL TEMED-a i 0,3 g NBT-a, u trajanju od 10 do 15 minuta. Kad su se na ljubičastoj podlozi pojavile akromatske vrpce koje predstavljaju izoforme APX, gel je skeniran i analiziran.

3.3. Statistička obrada podataka

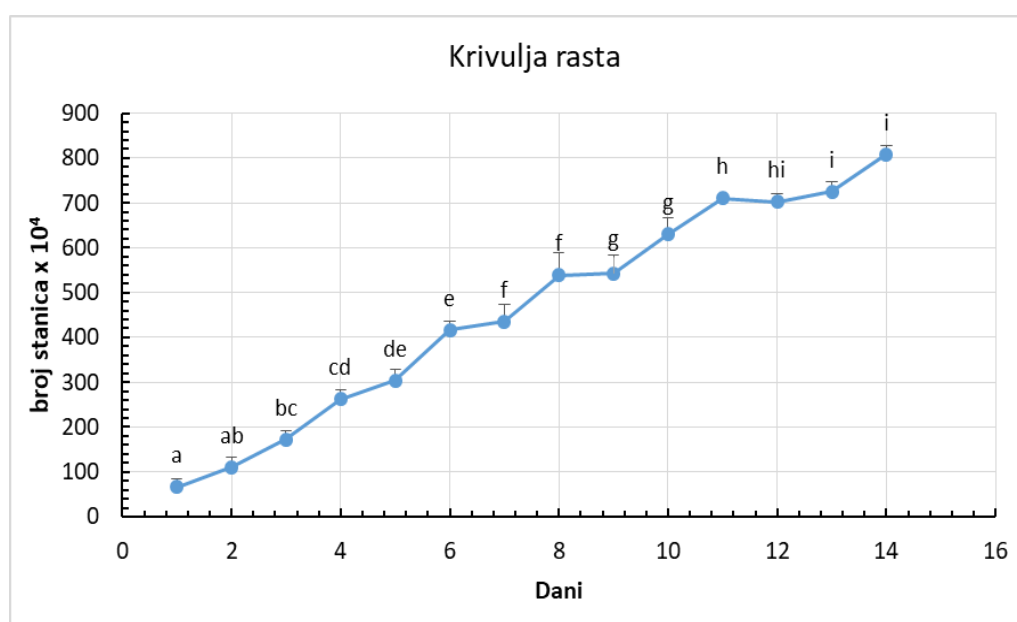
Podaci u ovom diplomskog radu su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika $\pm$ standardne pogreške. Za statističku obradu rezultata korištena je jednosmjerna analiza varijance (eng. *analysis of variance* – ANOVA), nakon čega je proveden post-hoc Duncan test. Pri tumačenju statistički obrađenih rezultata značajnom se smatrala razlika $p \leq 0,05$ za što je korišten računalni program *Statistica 10.0* (Stat Soft Inc., SAD).

REZULTATI

4. REZULTATI

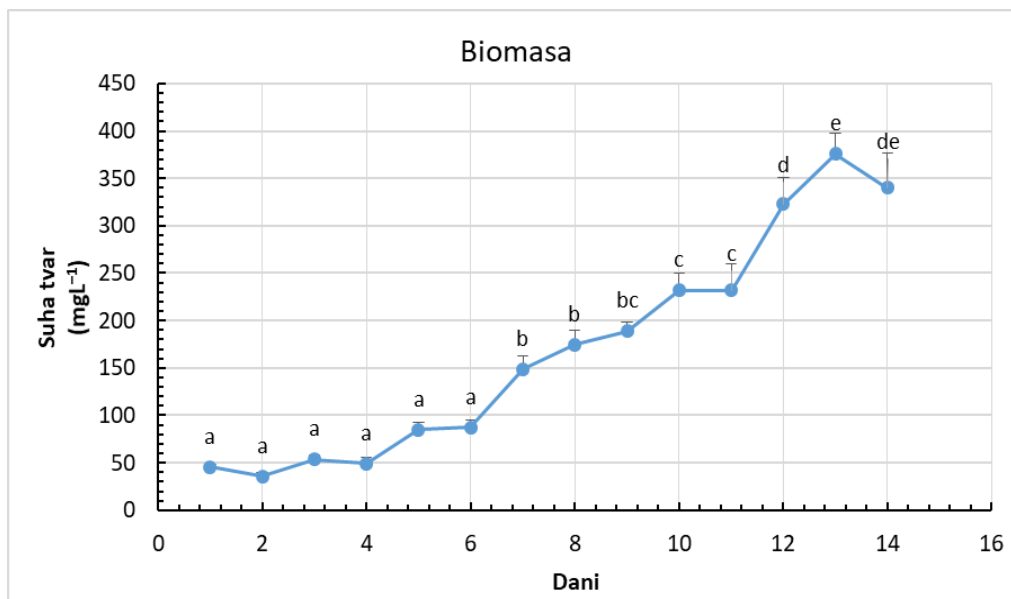
4.1. Krivulja rasta i biomasa kulture alge *C. vulgaris*

Krivulja rasta kulture alge *C. vulgaris* prikazana je na Slici 5. Praćenje rasta stanica algi u Bürker-Türk-ovoj komorici pod mikroskopom jasno prikazuje povećanje broja stanica algi svakog dana kroz vremenski period od 14 dana (Slika 5). Do statistički značajnog povećanja broja stanica došlo je u 3., 6., 7., 9., 10. i 13. danu u odnosu na nulti dan. Srednja vrijednost broja stanica nultog dana iznosila je $66,69 \times 10^4$, a četrnaestog dana $808,99 \times 10^4$.



Slika 5. Krivulja rasta kulture alge *C. vulgaris* praćena brojanjem stanica algi u Bürker-Türk-ovoj komorici pod mikroskopom u periodu od 14 dana. Rezultat za svaki dan pojedinačno dobiven je izračunom srednje vrijednosti broja stanica od 12 replika nasađenih kultura algi. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$; Duncan test).

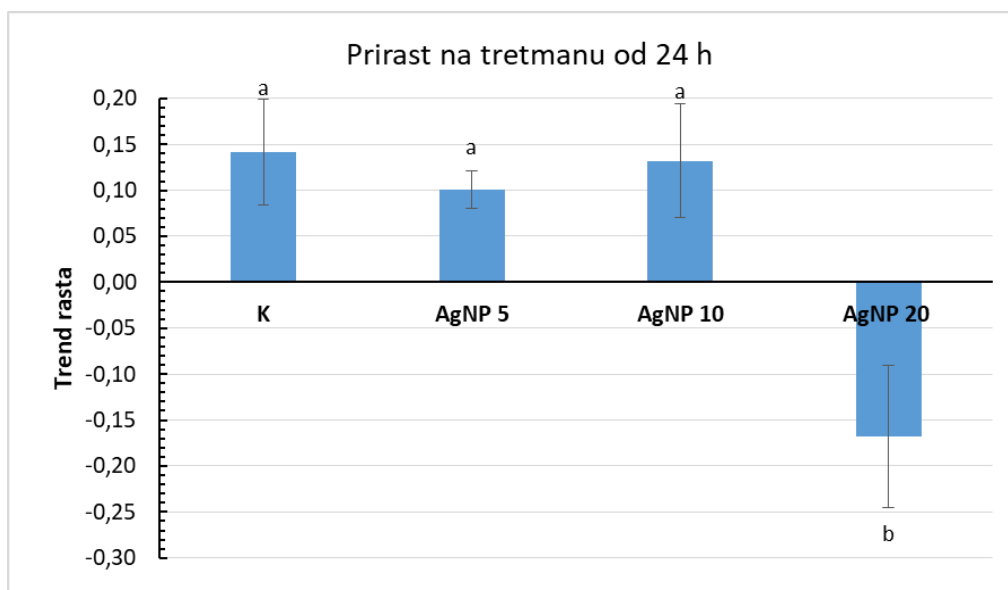
Krivulja rasta kulture alge *C. vulgaris* također je praćena povećanjem biomase alge *C. vulgaris* u periodu od 14 dana (Slika 6). Biomasa alge vidljivo je rasla kroz navedeni vremenski period, s time da se statistički značajno povećala nakon šestog dana rasta, potom nakon jedanaestog dana rasta i naposljetku nakon trinaestog dana rasta. U četrnaestom danu zabilježen je blagi, ali ne statistički značajan pad biomase.



Slika 6. Krivulja rasta kulture alge *C. vulgaris* praćena povećanjem biomase kulture alge u periodu od 14 dana. Rezultat za svaki dan pojedinačno dobiven je izračunom srednje vrijednosti suhe tvari od 12 replika nasađenih kultura algi. Različita slova označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0,05$; Duncan test).

4.1.1. Prirast kulture alge *C. vulgaris* na tretmanu od 24 h

Nakon 24 sata tretmana koncentracije od 5 i 10 μM AgNP nisu pokazale statistički značajnu promjenu broja stanica algi u odnosu na kontrolu, dok je tretman s 20 μM AgNP rezultirao statistički značajnim padom broja stanica u usporedbi s kontrolom (Slika 7). Vrijednosti su dobivene brojanjem stanica u Bürker-Türk-ovoj komorici pod mikroskopom na dan kad su alge postavljene na tretman i nakon 24 sata.

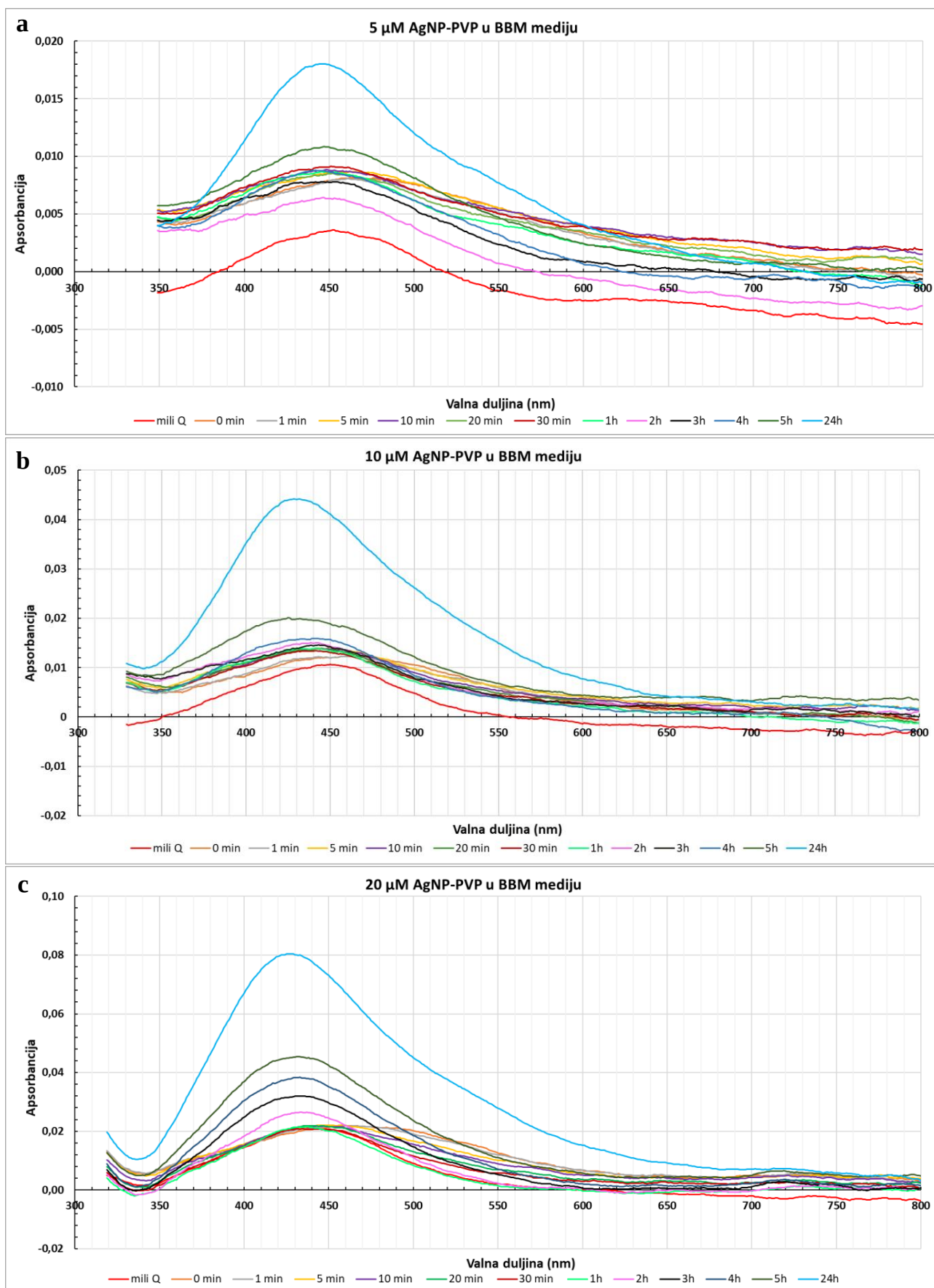


Slika 7. Prirast kulture alge *C. vulgaris* nakon tretmana s 5, 10 i 20 µM AgNP u trajanju od 24 h. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola, AgNP 5 – prirast stanica nakon tretmana s 5 µM AgNP-PVP, AgNP 10 – prirast stanica nakon tretmana s 10 µM AgNP-PVP, AgNP 20 – prirast stanica algi nakon tretmana s 20 µM AgNP-PVP.

4.2. Stabilnost AgNP

4.2.1. Stabilnost AgNP u hranjivoj podlozi BBM

Apsorpcijski spektri 5, 10 i 20 µM otopine AgNP-PVP u BBM hranjivoj podlozi prikazani su na Slici 8. U otopini AgNP u Milli Q vodi, koja je korištena kao kontrola, zabilježen je pik na 450 nm, čija se apsorbancija povećavala s porastom koncentracije AgNP-PVP (Slika 8a, b i c). U 5 µM otopini AgNP-PVP u BBM hranjivoj podlozi s vremenom je zabilježen je blagi pomak pika prema manjim valnim duljinama i porast apsorbancije; nakon 24 h pik je zabilježen na 436 nm s maksimalnom apsorbancijom od 0,018 (Slika 8a). Sličan uzorak u transformaciji čestica AgNP-PVP pokazala je i 10 µM otopina AgNP-PVP u BBM hranjivoj podlozi, s tim da je nakon 24 h pik dobiven na 435 nm s maksimalnom apsorbancijom od 0,044 (Slika 8b). U 20 µM otopini AgNP-PVP u BBM hranjivoj podlozi od nulte minute do 1 h izmjerena je jednako niska apsorbancija kao u Milli Q vodi bez značajne promjene u valnoj duljini pika, dok je od 2 h nadalje zabilježen značajan porast apsorbancije i pomak pika prema manjim valnim duljinama. Nakon 24 h pik je zabilježen na valnoj duljini od 430 nm s maksimalnom apsorbancijom od 0,080 (Slika 8c).



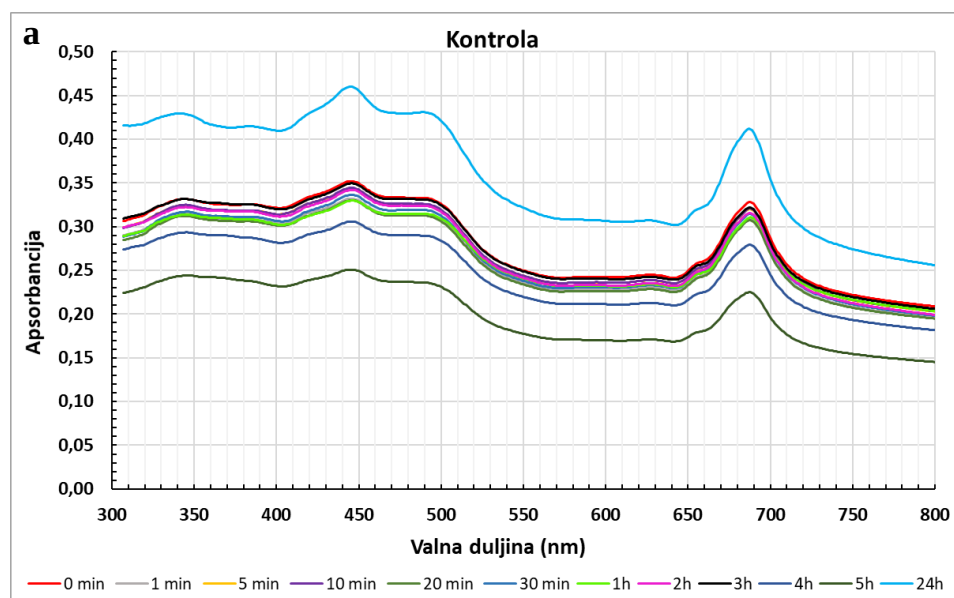
Slika 8. Apsorpcijski spektri a) 5 μM , b) 10 μM te c) 20 μM AgNP-PVP u BBM hranjivoj podlozi u vremenskim intervalima od 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30 minuta te 1, 2, 3, 4, 5, 24 sati izmjereni u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm.

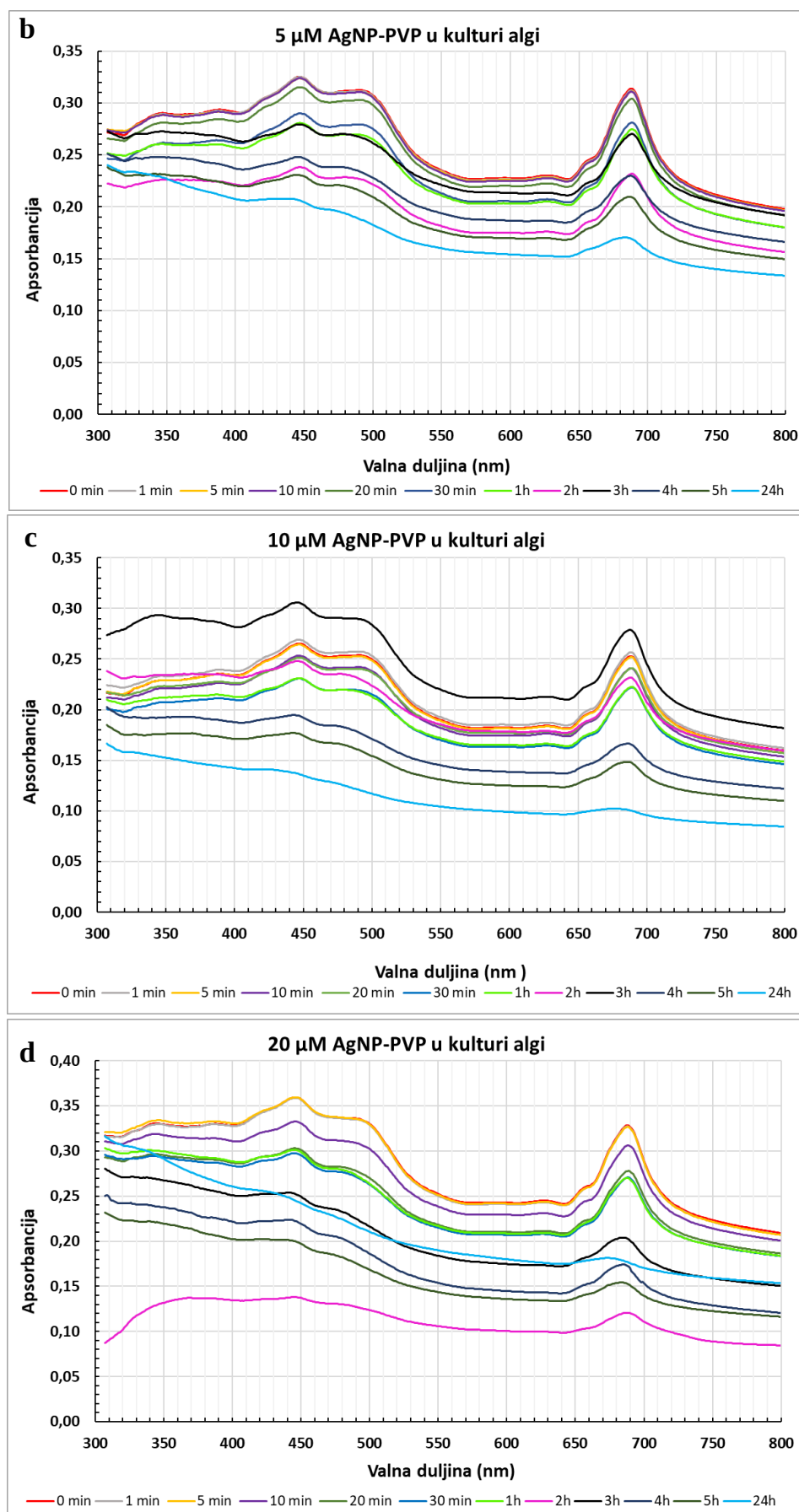
4.2.2. Stabilnost AgNP u kulturi alge *C. vulgaris*

Apsorpcijski spektri kontrolne suspenzije stanica algi te spektri suspenzija nakon izlaganja 5, 10 i 20 μM AgNP-PVP prikazani su na Slici 9. Apsorpcijski spektar u kontrolnoj suspenziji stanica algi pokazao je dva pika; manji pik na valnoj duljini od 445 nm te veći pik na valnoj duljini od 684 nm. Od nulte minute do 5 h zabilježen je kontinuirani pad apsorbancije, a značajno je porasla nakon 24 h, iako se položaj pikova nije promijenio (Slika 9a).

Apsorpcijski spektri suspenzije stanica algi nakon izlaganja 5, 10 i 20 μM AgNP-PVP pokazali su iste pikove na 445 nm i 684 nm, ali je u ovim otopinama zabilježena manja apsorbancija u odnosu na kontrolnu suspenziju. U sve tri otopine apsorbancija je kontinuirano padala od 0 minute sve do 24 h, kada je zabilježena i najmanja vrijednost (Slike 9b, c i d). Iznimka je jedino bila suspenzija algi sa 10 μM AgNP-PVP u kojoj je nakon 3 h zabilježen porast apsorbancije u odnosu na nultu minutu (Slika 9c). Položaj pikova u sve tri suspenzije nije se promijenio, ali se njihov intenzitet smanjio s vremenom (Slike 9b, c i d). U suspenziji stanica algi s dodatkom najveće ispitane koncentracije AgNP-PVP nakon 24 h pikovi više nisu bili vidljivi (Slika 9d).

Apsorpcijski spektar suspenzije stanica algi nakon izlaganja 5 μM AgNP-PVP pokazao je dva pika, na 445 nm i na 684 nm. Od nulte minute pa sve do 24 h apsorbancija pada te je najniža nakon 24 h. Položaj pikova se ne mijenja (Slika 9d).



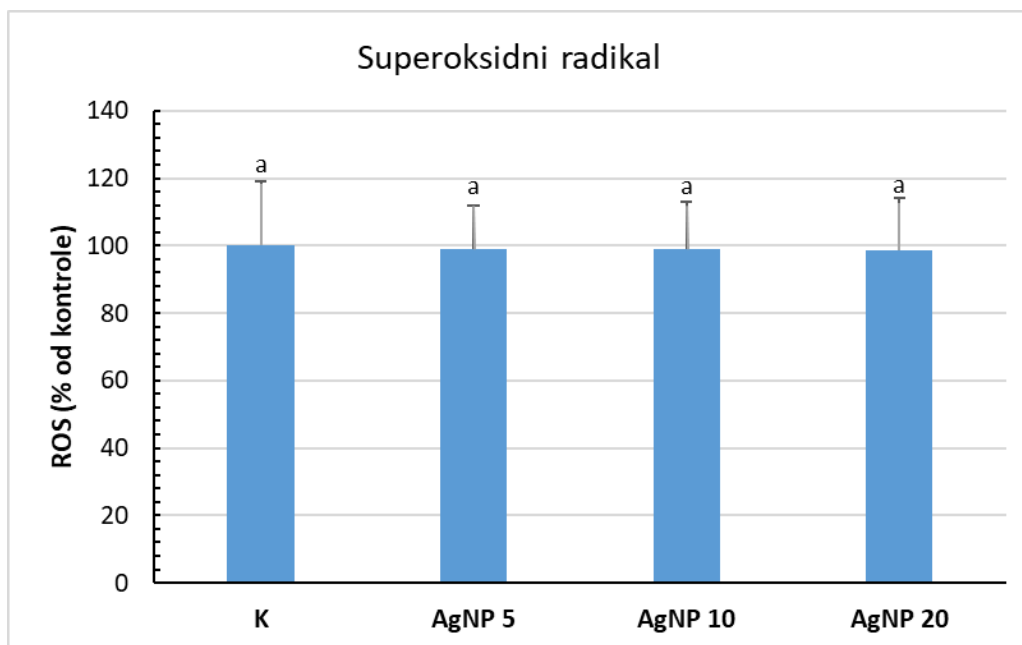


Slika 9. ApSORPCIJSKI spektri a) kontrolne suspenzije stanica algi *C. vulgaris* u BBM hranjivoj podlozi te suspenzija nakon izlaganja b) 5 µM, c) 10 µM te d) 20 µM AgNP-PVP u intervalima od 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30 minuta te 1, 2, 3, 4, 5, 24 sati izmjereni u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm.

4.3. Detekcija molekula ROS i određivanje vijabilnosti u stanicama algi *in situ* primjenom fluorescentnih boja

4.3.1. Detekcija molekula ROS primjenom boje dihidroetidij

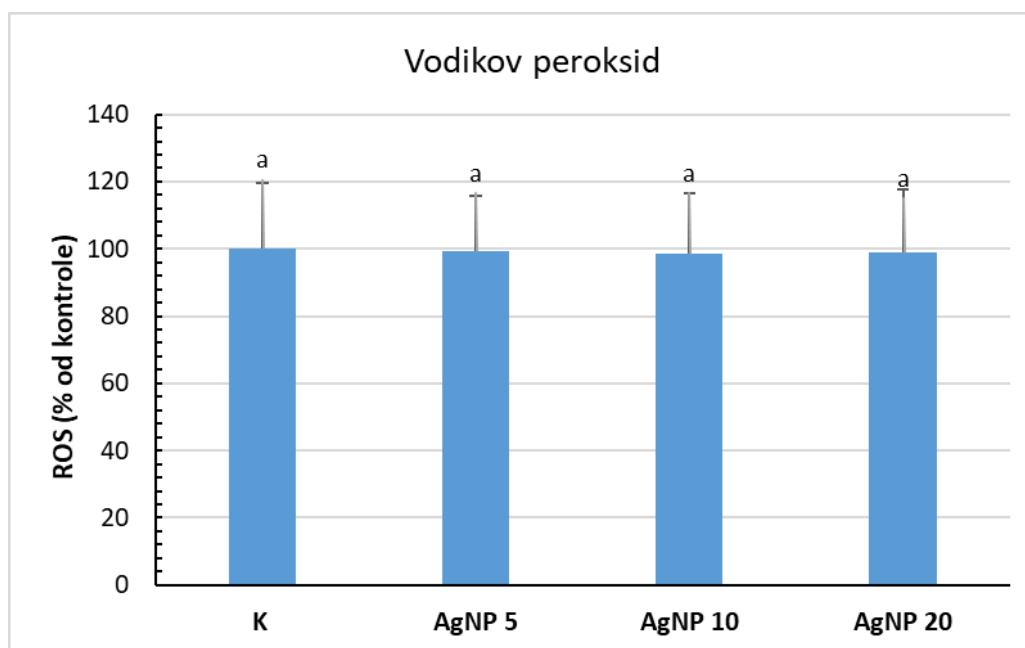
Dihidroetidij (DHE) je fluorescentna boja koja se koristi za detekciju molekula ROS, primarno superoksidnog aniona (O_2^-), što je omogućilo utvrđivanje razine oksidacijskog stresa u stanicama algi nakon tretmana s AgNP-PVP primijenjenih u 5, 10 i 20 μM koncentraciji u trajanju od 24 h. Nakon navedenih tretmana u stanicama algi nije zabilježen statistički značajan porast razine ROS molekula u odnosu na kontrolu (Slika 10).



Slika 10. Razina molekula ROS detektirana primjenom fluorescentne boje DHE u stanicama algi *C. vulgaris* nakon tretmana s 5, 10 i 20 μM AgNP-PVP u trajanju od 24 h. Rezultati, prikazani kao relativan intenzitet u odnosu na kontrolni uzorak, srednje su vrijednosti intenziteta fluorescencije izmjenjenog u 100 stanica $\pm$ standardna pogreška. Stupci označeni istim slovima pokazuju da nema statistički značajne razlike između tretmana ($p \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola, AgNP 5 – tretman s 5 μM AgNP-PVP, AgNP 10 – tretman s 10 μM AgNP-PVP, AgNP 20 – tretman s 20 μM AgNP-PVP.

4.3.2. Detekcija molekula ROS primjenom boje 2',7'-diklorohidrofluorescin diacetat

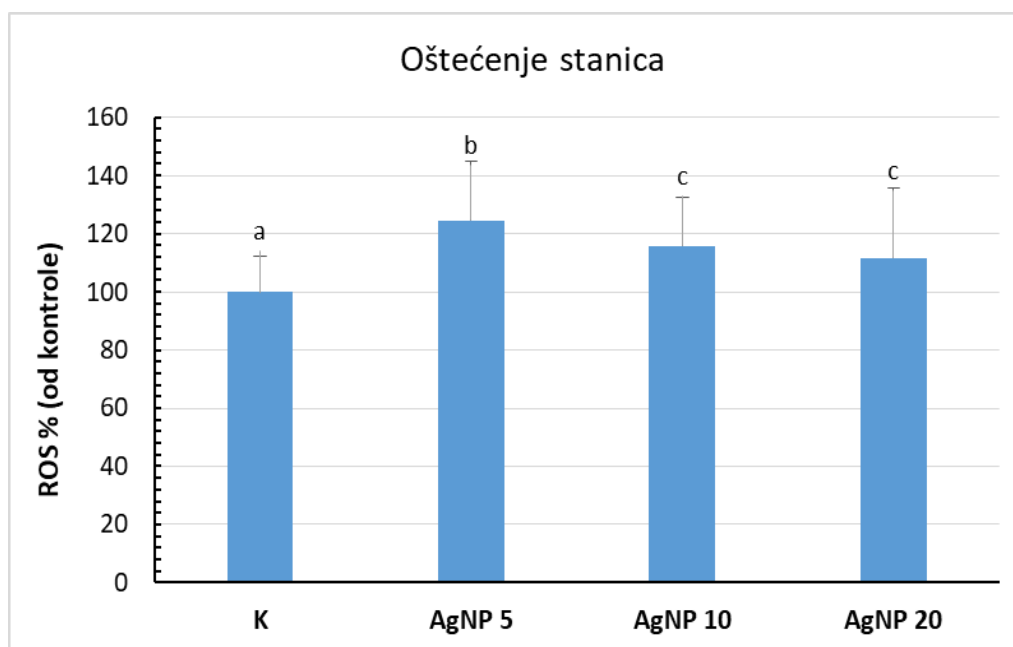
2',7'-diklorohidrofluorescin ($H_2DCF-DA$) je fluorescentna boja koja se koristi za detekciju molekula ROS, primarno vodikovog peroksida (H_2O_2), a u svom istraživanju također sam je koristila za ispitivanje razine oksidacijskog stresa u stanicama algi nakon tretmana s 5, 10 i 20 μM AgNP-PVP u trajanju od 24 h. Nakon navedenih tretmana, u stanicama algi nije zabilježen statistički značajan porast razine molekula ROS u odnosu na kontrolu (Slika 11).



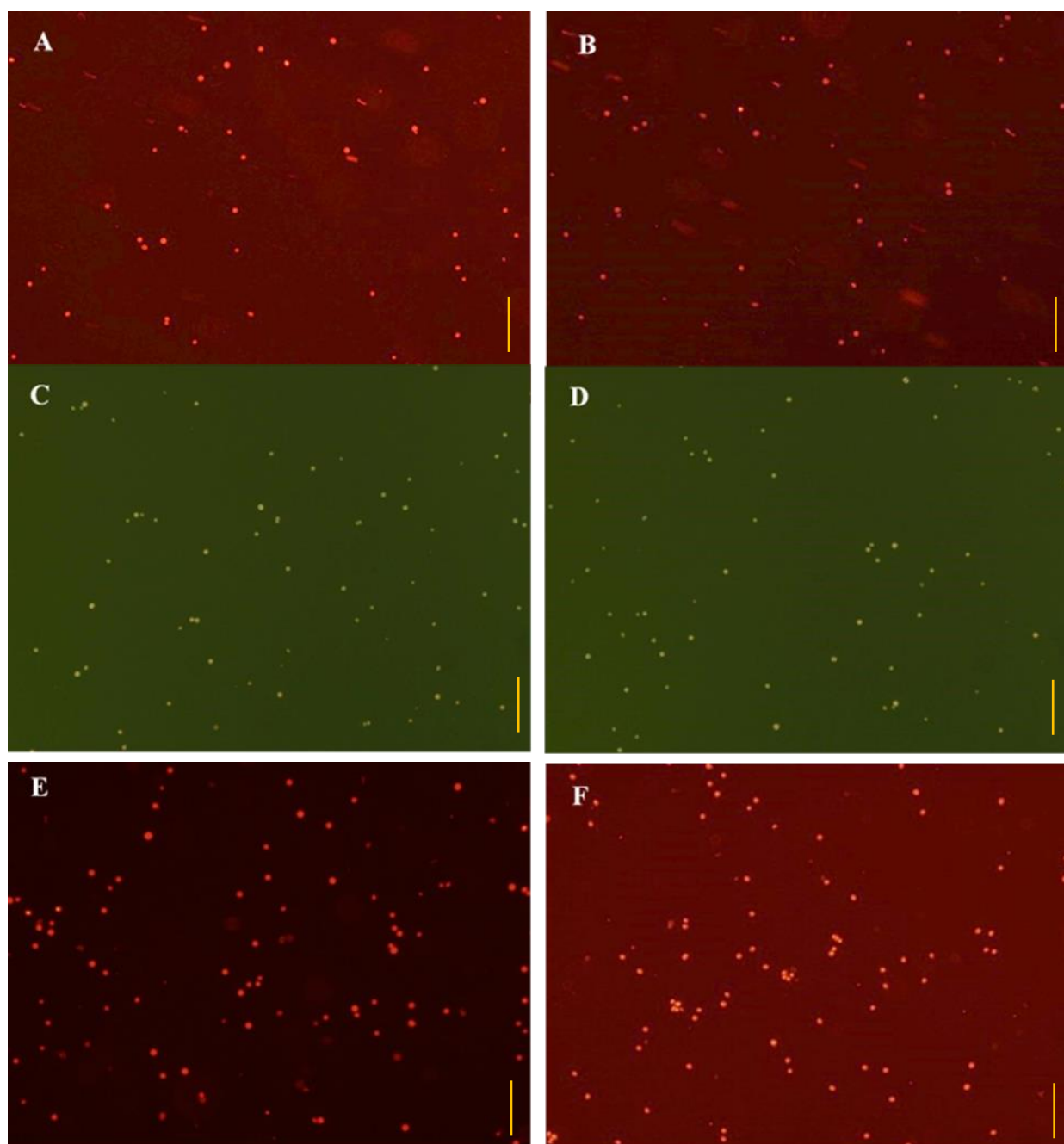
Slika 11. Razina molekula ROS detektirana primjenom fluorescentne boje DCFH u stanicama algi *C. vulgaris* nakon tretmana s 5, 10 i 20 μM AgNP-PVP u trajanju od 24 h. Rezultati, prikazani kao relativan intenzitet u odnosu na kontrolni uzorak, srednje su vrijednosti intenziteta fluorescencije izmjerene u 100 stanica $\pm$ standardna pogreška. Stupci označeni istim slovima pokazuju da nema statistički značajne razlike između tretmana ($p \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola, AgNP 5 – tretman s 5 μM AgNP-PVP, AgNP 10 – tretman s 10 μM AgNP-PVP, AgNP 20 – tretman s 20 μM AgNP-PVP.

4.3.3. Određivanje vijabilnosti stanica primjenom propidijevog jodida

Propidij jodid (PI) je fluorescentno interkalirajuće sredstvo koje se može upotrijebiti za bojenje stanica i nukleinskih kiselina, a veže se na molekulu DNA interkalacijom između baza s malo ili nikakve preferencije u sekvenci. Zaostaje samo u mrtvim, nekrotičnim stanicama i one fluoresciraju crveno. U ovom istraživanju koristila sam ga kao indikator vijabilnosti stanica. Nakon izlaganja suspenzije algi 5, 10 i 20 μM koncentraciji čestica AgNP-PVP u trajanju od 24 h zabilježila sam statistički značajno povećanje oštećenja u svim tretmanima u usporedbi s kontrolom, s tim da je značajno najveće oštećenje izmjereno nakon tretmana s 5 μM AgNP-PVP (Slika 12).



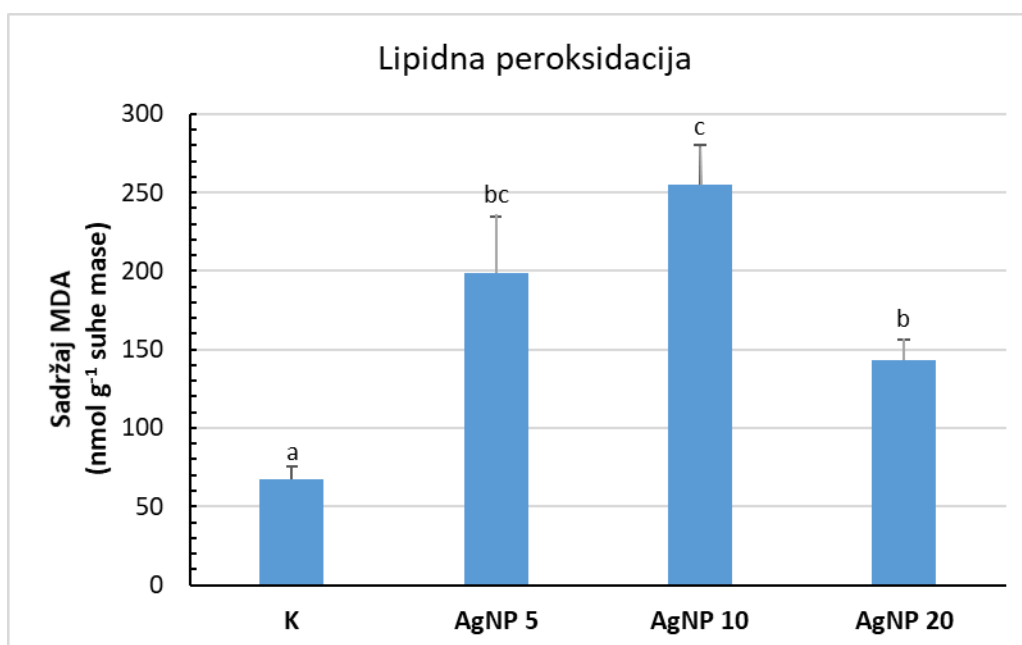
Slika 12. Postotak oštećenja u stanicama alge *C. vulgaris* u odnosu na kontrolu detektiran je primjenom fluorescentne boje PI nakon tretmana s 5, 10 i 20 μM AgNP-PVP u trajanju od 24 h. Rezultati, prikazani kao relativan intenzitet u odnosu na kontrolni uzorak, srednje su vrijednosti intenziteta fluorescencije izmjenjenog u 100 stanica $\pm$ standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola, AgNP 5 – tretman s 5 μM AgNP-PVP, AgNP 10 – tretman s 10 μM AgNP-PVP, AgNP 20 – tretman s 20 μM AgNP-PVP.



Slika 13. Primjeri analiziranih fotografija pri detekciji molekula ROS i vijabilnosti stanica alge *C. vulgaris* nakon tretmana od 24 h. Fotografije su snimljene fluorescencijskim mikroskopom pri povećanju od 400×. Linija predstavlja 50 μm . A – kontrolna suspenzija stanica u reakciji s bojom DHE, B – suspenzija stanica nakon tretmana s 20 μM AgNP-PVP u reakciji s bojom DHE, C – kontrolna suspenzija stanica u reakciji s bojom H₂DCF-DA, D – suspenzija stanica nakon tretmana s 20 μM AgNP-PVP u reakciji s bojom H₂DCF-DA, E – kontrolna suspenzija stanica u reakciji s bojom PI, F – suspenzija stanica nakon tretmana s 20 μM AgNP-PVP u reakciji s bojom PI.

4.4. Sadržaj malondialdehida

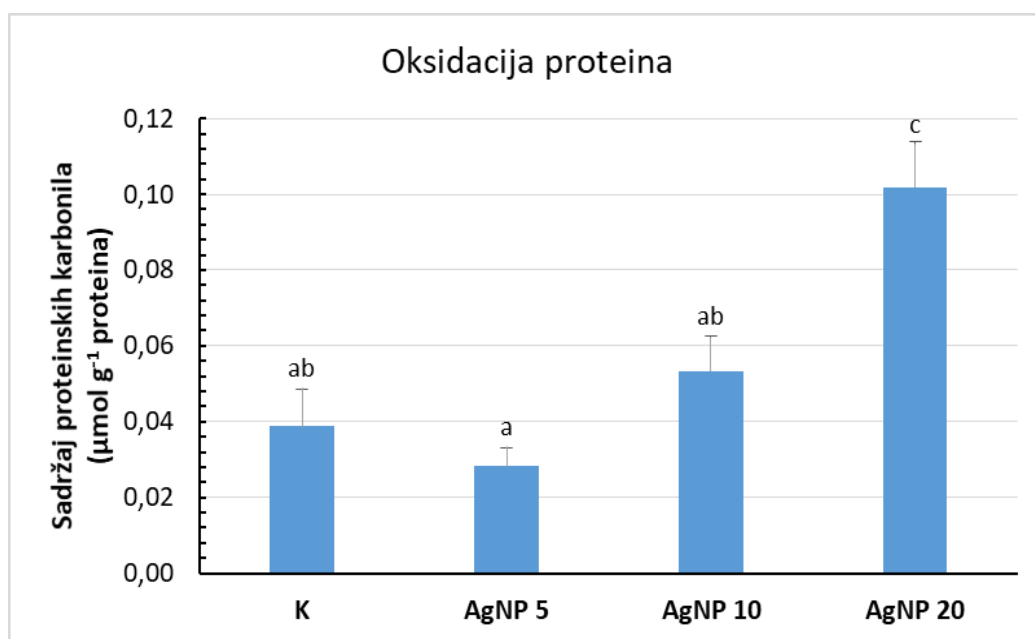
Sadržaj malondialdehida (MDA) u stanicama alge *C. vulgaris* određivala sam zbog toga što je MDA organski spoj koji u stanicama nastaje prilikom lipidne peroksidacije i označava pojavu oksidacijskog stresa. Sve ispitane koncentracije čestica AgNP-PVP izazvale su statistički značajno povećanje sadržaja MDA u stanicama algi u odnosu na kontrolu (Slika 14). Najveće vrijednosti zabilježene su nakon izlaganja 10 μM koncentraciji AgNP-PVP, i te su vrijednosti bile značajno veće od sadržaja MDA izmjenjenog nakon izlaganja tretmanu s 20 μM AgNP-PVP.



Slika 14. Sadržaj MDA u stanicama alge *C. vulgaris* nakon tretmana s 5, 10 i 20 μM AgNP u trajanju od 24 h. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika $\pm$ standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola, AgNP 5 – tretman s 5 μM AgNP-PVP, AgNP 10 – tretman s 10 μM AgNP-PVP, AgNP 20 – tretman s 20 μM AgNP-PVP.

4.5. Sadržaj proteinskih karbonila

Sadržaj proteinskih karbonila u stanicama alge *C. vulgaris* određivala sam jer je njihov povećan sadržaj jedan od biljega oksidacijskog oštećenja proteina. Nanočestice AgNP-PVP, primijenjene u 5 i 10 μM koncentraciji, nisu izazvale statističku značajnu promjenu u razini oksidacije proteina u usporedbi s kontrolom, dok je najveća testirana koncentracija AgNP-PVP (20 μM), rezultirala značajnim povećanjem proteinskih karbonila u usporedbi s kontrolom i oba tretmana s nižim koncentracijama AgNP-PVP (Slika 15).

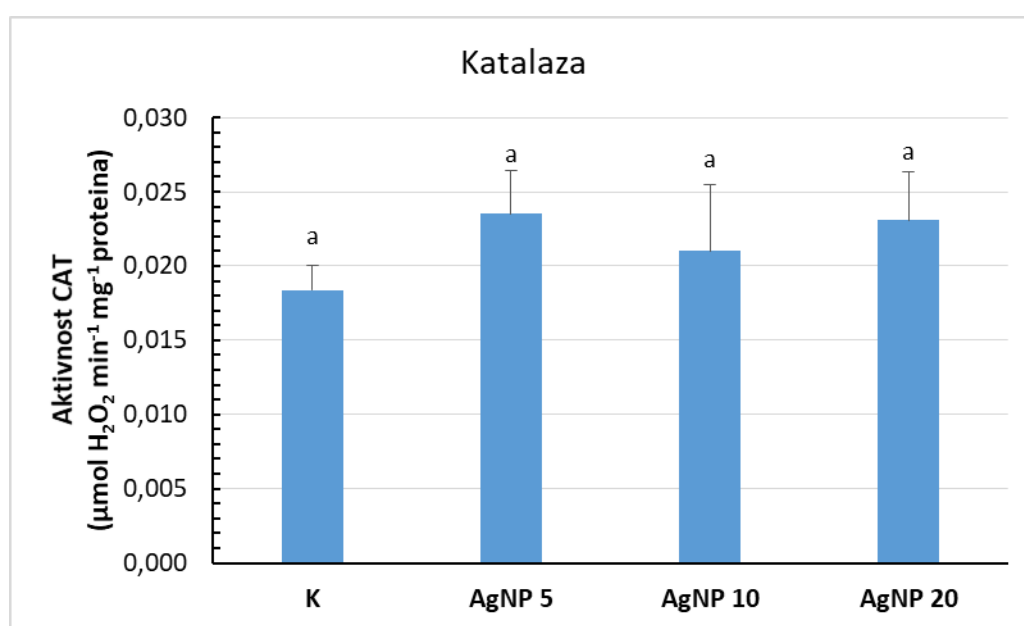


Slika 15. Sadržaj proteinskih karbonila u stanicama alge *C. vulgaris* nakon tretmana s 5, 10 i 20 μM AgNP u trajanju od 24 h. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika $\pm$ standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola, AgNP 5 – tretman s 5 μM AgNP-PVP, AgNP 10 – tretman s 10 μM AgNP-PVP, AgNP 20 – tretman s 20 μM AgNP-PVP.

4.6. Aktivnost antioksidacijskih enzima

4.6.1. Aktivnost katalaze

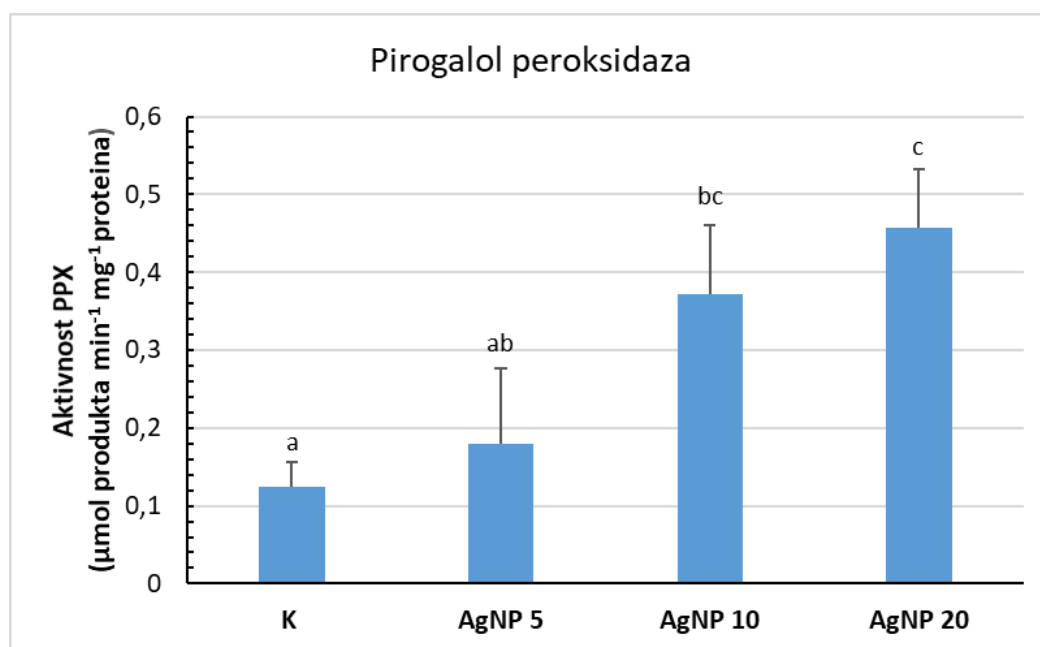
Katalaza (CAT) je enzim koji svojom aktivnošću uzrokuje raspad H_2O_2 , kao jedne od molekule ROS-a, na vodu i O_2 . Njena aktivnost je spektrofotometrijski mjerena praćenjem utroška H_2O_2 . Nakon navedenih tretmana, u stanicama alge *C. vulgaris* nije zabilježen statistički značajan porast aktivnosti CAT u odnosu na kontrolu (Slika 16).



Slika 16. Aktivnost katalaze u stanicama alge *C. vulgaris* nakon tretmana s 5, 10 i 20 μM AgNP u trajanju od 24 h. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika $\pm$ standardna pogreška. Stupci označeni istim slovima pokazuju da nema statistički značajne razlike između tretmana ($p \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola, AgNP 5 – tretman s 5 μM AgNP-PVP, AgNP 10 – tretman s 10 μM AgNP-PVP, AgNP 20 – tretman s 20 μM AgNP-PVP.

4.6.2. Aktivnost pirogalol peroksidaze

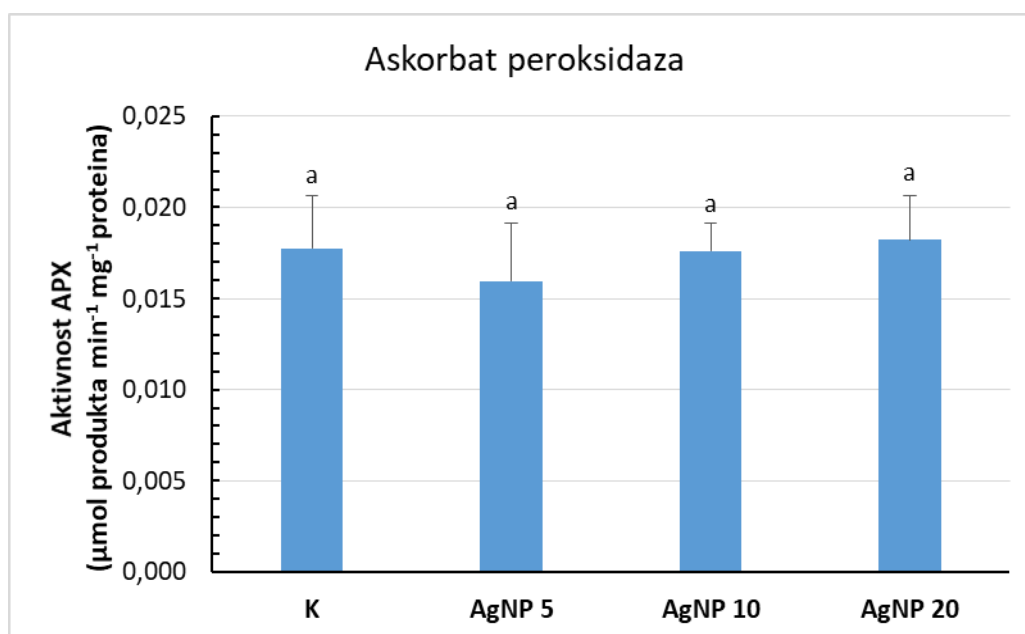
Pirogalol peroksidaza (PPX) je enzim koji svojom aktivnošću uzrokuje pretvorbu H_2O_2 u vodu. Njena aktivnost je spektrofotometrijski mjerena praćenjem nastanka purpurogalina. Zabilježen je linearni porast aktivnosti enzima PPX s povećanjem koncentracije čestica AgNP-PVP. Naime, najniža koncentracija ($5\ \mu\text{M}$ AgNP-PVP) izazvala je blago povećanje aktivnosti enzima PPX, koje nije bilo statistički značajno u usporedbi s kontrolom; $10\ \mu\text{M}$ koncentracija AgNP-PVP rezultirala je statistički značajnim povećanjem u aktivnosti enzima PPX u usporedbi s kontrolom; dok je najviša ispitana koncentracija AgNP-PVP ($20\ \mu\text{M}$) pokazala i najveću aktivnost PPX, koja se statistički značajno razlikovala od kontrole i tretmana s $5\ \mu\text{M}$ AgNP-PVP (Slika 17).



Slika 17. Aktivnost pirogalol peroksidaze u stanicama alge *C. vulgaris* nakon tretmana s 5, 10 i $20\ \mu\text{M}$ AgNP u trajanju od 24 h. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika $\pm$ standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima statistički se značajno razlikuju ($p \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola, AgNP 5 – tretman s $5\ \mu\text{M}$ AgNP-PVP, AgNP 10 – tretman s $10\ \mu\text{M}$ AgNP-PVP, AgNP 20 – tretman s $20\ \mu\text{M}$ AgNP-PVP.

4.6.3. Aktivnost askorbat peroksidaze

Askorbat peroksidaza (APX) je enzim koji svojom aktivnošću uzrokuje uklanjanje H_2O_2 iz stanice, preko askorbat-glutationskog ciklusa (Halliwell-Asada). Njena aktivnost je spektrofotometrijski mjerena praćenjem nastanka produkta oksidacije askorbinske kiseline. Nakon navedenih tretmana, u stanicama alge *C. vulgaris* nije zabilježen statistički značajan porast aktivnosti APX u odnosu na kontrolu (Slika 18).

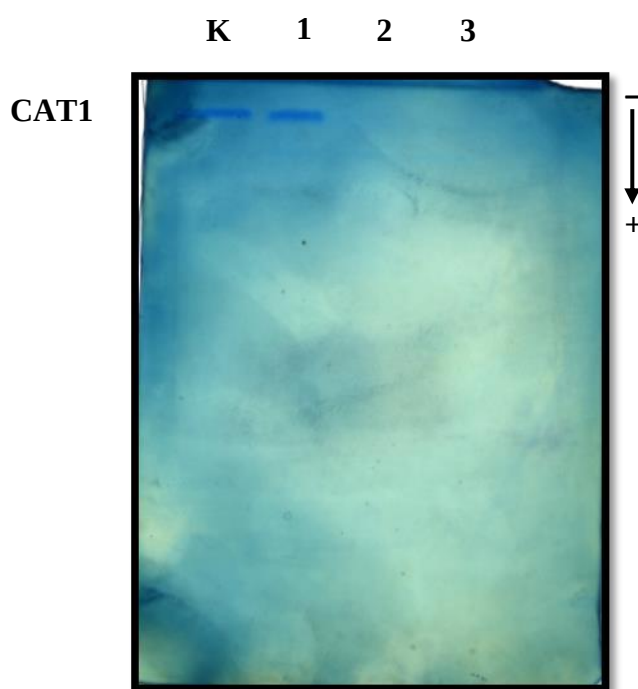


Slika 18. Aktivnost askorbat peroksidaze u stanicama alge *C. vulgaris* nakon tretmana s 5, 10 i 20 μM AgNP u trajanju od 24 h. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika $\pm$ standardna pogreška. Stupci označeni istim slovima pokazuju da nema statistički značajne razlike između tretmana ($p \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola, AgNP 5 – tretman s 5 μM AgNP-PVP, AgNP 10 – tretman s 10 μM AgNP-PVP, AgNP 20 – tretman s 20 μM AgNP-PVP.

4.7. Aktivnost antioksidacijskih enzima u gelu

4.7.1. Aktivnost katalaze u gelu

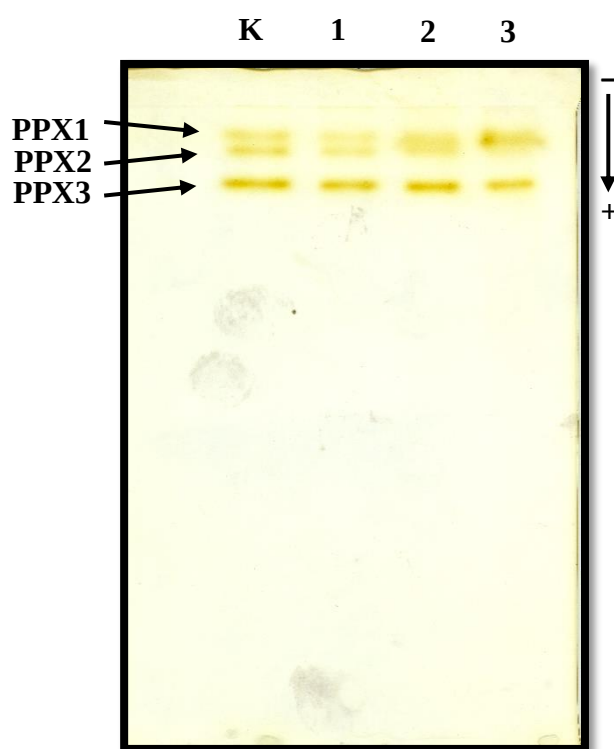
Aktivnost i izoforme enzima CAT u gelu prikazane su na Slici 19. Na gelu se uočava samo jedna izoforma ovog enzima, označena kao CAT1, koja je detektirana u kontrolnim stanicama te stanicama algi koje su bile izložene najnižoj testiranoj koncentraciji AgNP-PVP (5 μ M) s jednakim intenzitetom.



Slika 19. Aktivnost i izoforme enzima CAT razdvojene u gelu nativnom PAG elektroforezom u stanicama algi *C. vulgaris* nakon tretmana s 5, 10 i 20 μ M AgNP u trajanju od 24 h. K – kontrola, 1 – 5 μ M AgNP-PVP, 2 – 10 μ M AgNP-PVP, 3 – 20 μ M AgNP-PVP.

4.7.2. Aktivnost pirogallol peroksidaze u gelu

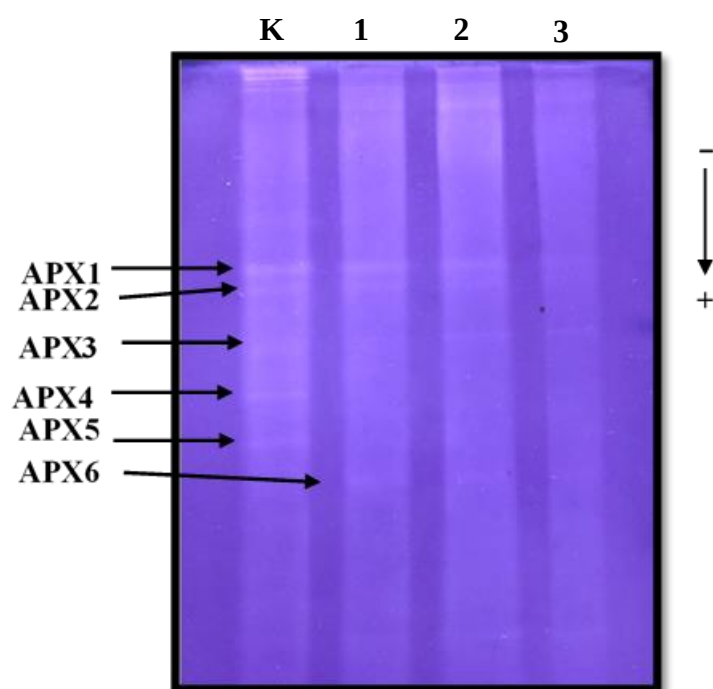
Aktivnost i izoforme enzima PPX u gelu prikazane su na Slici 20. Na gelu se uočavaju tri izoforme ovog enzima (PPX1, PPX2, PPX3) koje su detektirane u svim uzorcima, ali s različitim intenzitetom. Izoforme PPX1 i PPX2 pokazale su jaču ekspresiju u kontrolnom uzorku u usporedbi s tretmanima, s tim da je izoforma PPX2 u uzorku 3 (20 μ M AgNP-PVP) jedva zamjetna. Izoforma PPX3 imala je jednak intenzitet u kontroli i uzorcima 1 i 2 (tretmani s 5 i 10 μ M AgNP-PVP), dok je nakon izlaganja stanica algi 20 μ M koncentraciji AgNP-PVP bila slabije eksprimirana (Slika 20).



Slika 20. Aktivnost i izoforme enzima PPX razdvojene u gelu nativnom PAG elektroforezom u stanicama algi *C. vulgaris* nakon tretmana s 5, 10 i 20 μ M AgNP u trajanju od 24 h. K – kontrola, 1 – 5 μ M AgNP-PVP, 2 – 10 μ M AgNP-PVP, 3 – 20 μ M AgNP-PVP.

4.7.3. Aktivnost askorbat peroksidaze u gelu

Aktivnost i izoforme enzima APX u gelu prikazane su na Slici 21. Na gelu se uočava šest izoformi ovog enzima (APX1, APX2, APX3, APX4, APX5, APX6). U kontrolnom uzorku detektirano je pet izoformi (APX1 – APX5), čija je ekspresija bila jača u usporedbi s tretmanima. Nakon izlaganja algi 5, 10 i 20 μM koncentraciji AgNP-PVP, zabilježene su izoforme APX1, APX2 i APX3, no sa znatno slabijim intenzitetom nego u kontroli. Svi tretmani pokazali su izoformu APX6, koja u kontroli nije bila vidljiva (Slika 21).



Slika 21. Aktivnost i izoforme enzima APX razdvojene u gelu nativnom PAG elektroforezom u stanicama alge *C. vulgaris* nakon tretmana s 5, 10 i 20 μM AgNP u trajanju od 24 h. K – kontrola, 1 – 5 μM AgNP-PVP, 2 – 10 μM AgNP-PVP, 3 – 20 μM AgNP-PVP.

RASPRAVA

5. RASPRAVA

Čestice AgNP danas imaju vrlo široku primjenu i koriste se u medicini, poljoprivredi, kozmetičkoj industriji, ali i mnogim drugim granama industrije (Tong i sur., 2014; Baetke i sur., 2015; Jo i sur., 2016; Biffi i sur., 2015). Zbog njihove velike uporabe, AgNP različitim putevima dospijevaju u okolna tla, vode i zrak gdje dolaze u interakciju sa živim organizmima. Stoga se povećava broj istraživanja o ponašanju AgNP u biološki relevantnim medijima te utjecaju na organizme u okolišu. Iako postoji veliki broj istraživanja toksičnosti AgNP na mikroorganizme, biljke te animalne i humane stanice u uvjetima *in vitro* (Kim i sur., 2009; Ma i sur., 2010; Yin i sur., 2011; Jiravova i sur., 2016; Cvjetko i sur., 2017; Peharec i sur., 2018; Biba i sur., 2020), relativno je mali broj istraživanja učinka AgNP na mikroalge (Navarro i sur., 2008; Li i sur., 2015; Navarro i sur., 2016; Sendra i sur., 2017; Bahador i sur., 2019; Nam i An, 2019), a osobito na algu *C. vulgaris* (Qian i sur. 2016; Hazeem i sur., 2019; Mariano i sur., 2020).

U ovom istraživanju, alge su izlagane tretmanima s AgNP u eksponencijalnoj fazi rasta, odnosno za izlaganje je izabran 14. dan. U određivanju eksponencijalne faze rasta alge *C. vulgaris*, Allaguvatova i sur. (2019) zabilježili su najveći rast 12. dana uzgoja, dok je u istraživanju Kalimurthi i sur. (2019) najveći broj stanica zabilježen 15. dan, što približno odgovara rezultatima mog istraživanja. Alge se tretiraju u eksponencijalnoj fazi rasta jer prema Källquist (2001) kulture u eksponencijalnoj fazi imaju brz i uravnotežen rast koji nije limitiran ni intenzitetom svjetlosti ni koncentracijom hranjivih tvari, a kulture su vrlo osjetljive na promjene u okolišu i brzo reagiraju.

Kao jedan od indikatora toksičnosti neke tvari na stanice algi koristi se test inhibicije rasta. Takav test temelji se na internacionalnim standardima, a za inhibiciju rasta stanica algi to je OECD (eng. *Organisation for Economic Co-operation and Development*) test broj 201: Slatkovodne alge i cijanobakterije, test inhibicije rasta (2011). Prirast kulture algi može se odrediti na više načina, a to su brojanje stanica, mjerenje gustoće stanica ili određivanje biomase algi izražene kroz suhu tvar, suhu tvar bez pepela i sadržaj klorofila *a* (Moheimani i sur., 2013). U ovom istraživanju za određivanje prirasta koristila sam brojanje stanica u Bürker-Türk-ovoj komorici uz pomoć mikroskopa. Rezultati su pokazali da niže ispitane konc. AgNP (5 i 10 μM) nemaju učinak na rast alge *C. vulgaris*, dok je izlaganje 20 μM AgNP pokazalo značajnu inhibiciju nakon 24 sata. Zheng i sur. (2019) su pokazali negativan utjecaj AgNP na algu *C. vulgaris*, uz redukciju sadržaja klorofila te inhibiciju rasta stanica, a slični rezultati dobiveni su i nakon izlaganja algi *Chlamydomonas reinhardtii* (Wang J. i sur., 2014) te *Pseudokirchneriella subcapitata* (Wang S. i sur., 2016) česticama AgNP. Negativan učinak AgNP na rast algi u svojim istraživanjima pokazali su i Gambardella i sur.

(2015), koji su zabilježili značajnu inhibiciju rasta stanica alge *Dunaliella tertiolecta* nakon tretmana s AgNP (IC_{50} 0,9 mg L⁻¹) u trajanju od 72 h, dok je istraživanje Aline i sur. (2015) pokazalo da je izlaganje alge *P. subcapitata* česticama AgNP, koje su bile stabilizirane omotačem od polivinil alkohola (eng. *polyvinyl alcohol*, AgNP-PVA), također inhibiralo rast. Osim toga, Fazelian i sur. (2020) pokazali su smanjenje rasta alge *Nannochloropsis oculata*, gdje je prirast bio najniži nakon tretmana s najvećom ispitanom koncentracijom AgNP (50 mg L⁻¹). S druge strane, u istraživanju Bahador i sur. (2019) tretmani s 5 i 15 pM AgNP nisu imali utjecaja na rast alge *Dunaliella salina*, ali se broj stanica značajno smanjio nakon tretmana s 25 pM AgNP u trajanju od 48 h. Iz rezultata ovih istraživanja, vidljivo je da je utjecaj tretmana s AgNP na rast mikroalgi direktno povezan s primijenjenom koncentracijom AgNP, što je pokazalo i moje istraživanje.

Analiza stabilnosti AgNP pruža uvid u to kako površinska svojstva i sastav hranjive podloge utječu na aglomeraciju, agregaciju te otpuštanje iona Ag⁺ s AgNP, što je povezano sa njihovom toksičnošću te nužno za razumijevanje trajanja i pohrane nanomaterijala koji sadržavaju AgNP (Valenti i Giacomelli, 2017). Treba napomenuti da se još uvijek ne može potvrditi jesu li AgNP toksične *per se* ili njihova toksičnost potječe i od otpuštanja iona Ag⁺. U istraživanju Navarro i sur. (2008), stanice alge *C. reinhardtii* pokazale su manju produktivnost fotosinteze nakon izlaganja česticama AgNP koncentracija od 10 do 100,000 nM u usporedbi s tretmanima s 100 do 10,000 nM AgNO₃, nakon čega su zaključili da toksičnost AgNP ne potječe isključivo od iona Ag⁺. Čestice AgNP su nestabilne u većini bioloških medija zbog svoje velike površinske reaktivnosti te su podložne promjenama ili reakcijama s drugim aktivnim supstancama (Phan i Haes, 2019.), stoga im se dodaju različiti omotači koji služe kao stabilizatori (Xu i sur., 2018). Karakteristike stabilizatora mogu utjecati na rast i morfologiju NP te na topljivost u različitim otapalima, površinsku stabilnost i kinetiku rasta (Koczkur i sur., 2015). U ovom istraživanju ispitana je stabilnost AgNP-PVP u hranjivoj podlozi BBM, prije izlaganja alge *C. vulgaris* česticama AgNP te stabilnost u kulturi alga. U otopinama čestica AgNP-PVP u hranjivoj podlozi BBM, zabilježen je porast apsorbancije i pomak maksimalne vrijednosti apsorbancije prema manjim vrijednostima valnih duljina za sve ispitane koncentracije AgNP u usporedbi s rezultatima dobivenim u Milli Q vodi, što pokazuje da su čestice AgNP u ovoj hranjivoj podlozi djelomično agregirale, ali i da je došlo do otpuštanja iona Ag⁺. Slični rezultati dobiveni su za AgNP-PVP (Biba i sur., 2020) i za AgNP-citrat (Peharec Štefanić i sur., 2018) pri ispitivanju stabilnosti nanočestica u tekućoj hranjivoj podlozi MS (Murashige i Skoog, 1962), koja se koristi za uzgoj biljaka. Zanimljivo je da su Biba i sur. (2020) pokazali kako su AgNP stabilizirane omotačem od CTAB (eng. *cetrimonium bromide*, CTAB) bile stabilnije u hranjivoj podlozi MS u usporedbi s AgNP-PVP, što pokazuje kako i sam omotač doprinosi stabilnosti nanočestica jer otpuštanje molekula

omotača doprinosti i disocijaciji iona Ag^+ s AgNP (Wojcieszek i sur., 2020). Molekule omotača vezane su nekovalentnim vezama za AgNP i u kemijskoj su ravnoteži sa slobodnim molekulama liganda u mediju. Disperzija AgNP u mediju uzrokuje promjenu u kemijskoj ravnoteži, otpuštajući molekule omotača i rezultirajući aglomeracijom AgNP te otpuštanjem iona Ag^+ (Biba i sur., 2020; Wojcieszek i sur., 2020).

Istraživanja su pokazala da izlaganje biljaka i algi česticama AgNP može potaknuti povećano stvaranje molekula ROS koji mogu reagirati s proteinima, lipidima i molekulom DNA, rezultirajući metaboličkim promjenama, oštećivanjem staničnih membrana i staničnom smrću (Tkalec i sur., 2019). Postoji više metoda kojima se otkriva prisutnost molekula ROS u stanici, a u svom istraživanju koristila sam metode detekcije *in situ* primjenom fluorescentnih boja DHE i $\text{H}_2\text{DCF-DA}$. Nakon izlaganja stanica alge *C. vulgaris* česticama AgNP-PVP nije zabilježen statistički značajan porast razine ROS u odnosu na kontrolu niti sa jednom od fluorescentnih boja, iako je primjena boje PI pokazala značajno povećanje oštećenja stanica. Negativan učinak na vijabilnost stanica zabilježen je i u istraživanju Hazeem i sur., (2019), nakon izlaganja alge *C. vulgaris* česticama AgNP veličine 50 i 100 nm. Osim toga, u svom radu Hazeem i sur. (2019) su utvrdili povećano stvaranje molekula ROS-a nakon tretmana stanica alge *C. vulgaris* s otopinom AgNP ispitivanih koncentracija 10, 50, 100 i 200 mg L^{-1} u vremenskom periodu od 24, 48, 72 i 96 h, a prisustvo molekula ROS su detektirali pomoću fluorescentne boje $\text{H}_2\text{DCF-DA}$. Rezultati DHE testa Biba i sur. (2016) pokazali su da se količina molekula ROS u klijancima duhana tretiranim AgNP-citrat ispitivanih koncentracija 25, 50, 75, 100 i 500 μM značajno povećala, a isto su pokazali i Mirzajani i sur. (2013) nakon izlaganja biljke *Lemna gibba* tretmanu s koloidnom otopinom AgNP ispitivanih koncentracija od 0,3 do 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$, što su značajno više koncentracije od ovih koje sam ja krositila u svom istraživanju.

Iako primjenom fluorescentnih boja nisam uspjela zabilježiti povećano stvaranje ROS molekula, spektrofotometrijsko mjerenje sadržaja MDA i proteinskih karbonila, parametara koji se uobičajeno analiziraju za detekciju oksidacijskog stresa, ipak je pokazalo značajno povećane vrijednosti u odnosu na kontrolu, osobito pri najvećoj testiranoj koncentraciji (20 μM). MDA se koristi kao pokazatelj oštećenja bioloških membrana jer one sadrže veliku količinu višestruko nezasićenih masnih kiselina, a njihova intenzivna peroksidacija dovodi do gubitka fluidnosti, opadanja vrijednosti membranskoga potencijala, povećanja propusnosti za vodikove ione te do mogućeg raspada stanice i ispuštanja njena sadržaja (Štefan i sur. 2007). Dosadašnja istraživanja pokazala su da nanočestice bakrovog oksida (CuONP) izazivaju lipidnu peroksidaciju i time induciraju stvaranje novih pora u membrani zelene alge *C. reinhardtii*, uslijed čega membrana postaje više propusna i manje selektivna (Melegari i sur., 2013), dok se nanočestice cinkovog oksida (ZnONP) akumuliraju u membrani zelene alge

Scenedesmus obliquus, što dovodi do narušavanja strukture stanične stijenke, promjene u propusnosti membrane i u konačnici do stanične smrti (Bhuvaneshwari i sur., 2015). Istraživanje Ozkaleli i sur. (2018) pokazalo je povećanje lipidne peroksidacije i oštećenja stanične membrane mikroalge *Raphidocelis subcapitata* nakon izlaganja nanočesticama titanijevog oksida (TiO₂NP). U mom istraživanju značajno povećanje sadržaja MDA u stanicama algi *C. vulgaris* u odnosu na kontrolu, zabilježeno nakon svih ispitanih tretmana s česticama AgNP-PVP, što ukazuje na pojavu oksidacijskog stresa, a i u skladu je s rezultatima detekcije oštećenja stanica *in situ* primjenom fluorescentne boje PI. Nadalje, moji rezultati u skladu su i s rezultatima autora Amal i sur. (2013) na algi *C. vulgaris*, dok je povećani sadržaj MDA nakon izlaganja česticama AgNP zabilježen i u mikroalgama *N. oculata* (Fazelian i sur., 2020) i *Dunaliella tertiolecta* (Amal i sur., 2013). U mojim rezultatima neobično je to što su najveće vrijednosti zabilježene nakon izlaganja 10 µM koncentraciji AgNP-PVP, koje su bile značajno veće od sadržaja MDA izmjerenog nakon izlaganja tretmanu s 20 µM AgNP-PVP. Iako je općenito mehanizam lipidne peroksidacije u algama slabo istražen, Moji rezultati su u skladu s rezultatima dobivenima u istraživanju Rai i sur. (2013), u kojem su pri analizi učinka kromata na algu *C. vulgaris* najveće vrijednosti sadržaja MDA izmjerene nakon izlaganja tretmanu s 15 µM koncentracijom, dok su vrijednosti izmjerene nakon izlaganja 25 i 100 µM koncentracijama bile značajno manje. Rezultati istraživanja sadržaja proteinskih karbonila, koji nastaju kao kovalentna modifikacija proteina nakon djelovanja molekula ROS (Zhang i sur., 2013), pokazuju značajan porast pri najvećoj testiranoj koncentraciji AgNP-PVP (20 µM), što odgovara rezultatima dobivenima mjerenjem sadržaja MDA. Nadalje moji rezultati u skladu su i s rezultatima istraživanja učinka različitih metala na kloroplast algi *Gonyaulax polyedra*, koji su također pokazali značajno povećanje razine proteinskih karbonila u kloroplastu nakon akutnog izlaganja algi metalima (Okamoto i sur., 2001). Nažalost, podaci o sadržaju proteinskih karbonila u stanicama algi nakon izlaganja AgNP nisu dostupni u literaturi te je potonje potrebno istražiti.

Povećana proizvodnja molekula ROS-a u stanici pokreće pojačano stvaranje molekula antioksidansa i povećava aktivnost antioksidacijskih enzima (Melegari i sur., 2013), koji mogu ukloniti višak molekula ROS-a, štiteći tako stanicu od oštećenja (Zhou i sur., 2001). U ovom istraživanju analizirala sam aktivnost antioksidacijskih enzima CAT, APX i PPX kako bih ispitala antioksidacijski odgovor stanice alge *C. vulgaris* nakon izlaganja česticama AgNP. Aktivnost katalaze nije značajno porasla nakon ispitanih tretmana, što nije u potpunosti u skladu s podacima za učinak nanočestica metala ispitanih na drugim vrstama algi. Naime, Lekamge i sur. (2019) zabilježili su povećanje aktivnosti CAT nakon 32 dana izlaganja alge *P. subcapitata* česticama AgNP, dok su Fazelian i sur. (2020) dokazali značajno povećanje aktivnosti CAT već pri najmanjoj ispitanoj

koncentraciji (5 mg L^{-1}) AgNP u stanicama algi *N. oculata*. Nadalje, Melegari i sur. (2013) su u istraživanju utjecaja CuONP koncentracija 0,1, 1, 10, 100 i 1000 mg L^{-1} u vremenskom periodu od 72 h na algu *C. reinhardtii* izmjerili povećanu aktivnost CAT. U istraživanju učinka AgNP na vodenu biljku *Spirodela polyrhiza*, aktivnost CAT nije se značajno povećala nakon tretmana s nižim koncentracijama AgNP, što je u skladu s mojim rezultatima, ali je značajno povećanje zabilježeno nakon izlaganja višim koncentracijama (Jiang i sur., 2014).

APX i PPX su nespecifični enzimi koji pripadaju peroksidazama, enzimima koji kataliziraju raspad H_2O_2 na vodu. U mom istraživanju, enzim PPX pokazao je značajno povećanje aktivnosti u većini ispitanih tretmana. Povećanje aktivnosti PPX zabilježeno je i u istraživanju učinka AgNP na vodenu biljku *S. polyrhiza*. S druge strane, Qian i sur. (2016) izmjerili su smanjenje aktivnosti PPX u stanicama algi *C. vulgaris* i *D. tertiolecta* nakon tretmana s AgNP u trajanju od 96 h. Aktivnost enzima APX u mom istraživanju nije bila značajno promijenjena nakon tretmana s AgNP-PVP, što nije u skladu s do sada objavljenim rezultatima. Naime, Fazelian i sur. (2020) su utvrdili značajno povećanje aktivnosti APX nakon tretmana s 10 i 25 mg L^{-1} AgNP, dok je izlaganje 50 mg L^{-1} koncentraciji rezultiralo smanjenjem aktivnosti. Pri usporedbi rezultata mojih istraživanja s rezultatima drugih autora važno je napomenuti da toksični učinak nanočestica uvelike ovisi o vrsti alge jer debljina stanične stijenke, organski sastav stanične stijenke i volumen stanice igraju važnu ulogu (Roy i sur., 2016). Qian i sur. (2016) u svom su istraživanju usporedili toksičnost AgNP na prokariotsku slatkovodnu cijanobakteriju *Mycrocistic aeruginosa* i mikroalgu *C. vulgaris* i pokazali negativan učinak na rast, fotosintezu, aktivnost antioksidacijskog sustava i metabolizam ugljikohidrata u vrsti *M. aeruginosa*, dok je alga *C. vulgaris* učinkovito uklonila molekule ROS-a pomoću antioksidacijskih enzima (SOD, PPX, CAT i glutamin sintetaza).

Ovo istraživanje utjecaja AgNP na mikroalge nudi mnogo korisnih podataka kao temelj za nova istraživanja, počevši od same metodologije pa do rezultata. AgNP stabilizirane omotačem od PVP-a su pokazale negativan učinak na rast stanica alge *C. vulgaris* te stvaranje molekula ROS-a koje su inducirale oksidacijski stres i djelomično aktivirale antioksidacijske enzime. Najtoksičniji učinak pokazala je najviša ispitana koncentracija ($20 \mu\text{M}$) AgNP-PV, što pokazuje da je toksični učinak direktno ovisan o primijenjenoj koncentraciji. Budući da su u ovom istraživanju parametri analizirani nakon izlaganja od 24 h, za izvođenje preciznijih zaključaka o mehanizmima toksičnosti AgNP-PVP u mikroalgama bilo bi potrebno istražiti kakav utjecaj imaju AgNP u duljem vremenskom periodu, ispitati učinak AgNP stabiliziranih različitim omotačima te analizirati veći raspon koncentracija AgNP čestica.

ZAKLJUČAK

6. ZAKLJUČAK

1. Smanjeni prirast kulture stanica alge *C. vulgaris* na najvećoj testiranoj koncentraciji AgNP-PVP (20 μ M) ukazuje da se alga u 24 h nije prilagodila uvjetima stresa te da su AgNP-PVP imale toksičan učinak i inhibirale rast stanica algi.
2. Smanjenje vijabilnosti stanica, povećanje sadržaja MDA i porast karbonila u stanicama algi, zabilježen nakon većine tretmana, ukazuje na to da su AgNP-PVP izazvale pojavu oksidacijskog stresa i uzrokovale oštećenja staničnih membrana, iako povećano stvaranje ROS molekula nije dokazano fluorescencijskom mikroskopijom.
3. Antioksidacijski enzimi CAT i APX nisu spektrofotometrijskim mjerenjem pokazali promjenu u svojoj aktivnosti, što može značiti da stres nije bio dovoljno snažan ili dovoljno dug (24 h) za njihovu aktivaciju.
4. Antioksidacijski enzim PPX je spektrofotometrijskim mjerenjem pokazao povećanje svoje aktivnosti na svim ispitanim koncentracijama, što ukazuje na AgNP-PVP ipak barem djelomičano aktiviraju antioksidacijski odgovor u stanicama alge
5. Nakon razdvajanja u gelu, sva tri antioksidacijska enzima (CAT, PPX i APX) pokazali su promjenu u ekspresiji izoenzima, koja je uglavnom bila smanjena na tretmanima u odnosu na kontrolu.

LITERATURA

7. LITERATURA

Aline AB, Jonsson CM, Puti FC, Siqueira MC, Mattoso LHC, Correa DS, Ferreira MD (2015) Toxicity of PVA-stabilized silver nanoparticles to algae and microcrustaceans. *Environmental Nanotechnology Monitoring Managing*, 3, 22e29.

Allagatova R, Myasina Y, Zakharenko V, Gaysina L (2019) A simple method for the cultivation of algae *Chlorella vulgaris* Beijerinck. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 390 0102020

Angel BM, Batley GE, Jarolimek CV, Rogers NJ (2013) The impact of size on the fate and toxicity of nanoparticulate silver in aquatic systems. *Chemosphere*, 93(2), 359–365.

Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative systems in plants. *Current Science*, 82,1227-1238,.

Baetke SC, Lammers T, Kiessling F (2015) Applications of nanoparticles for diagnosis and therapy of cancer. *The British Journal of Radiology*, 88,20150207.

Balachandran S, Hurry VM, Kelley SE, Osmond CB, Robinson SA, Rohozinski J, Sims DA (1997) Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 100(2), 203–213.

Bahador E, Einali A, Azizian-Shermeh O, Sangtarash MH (2019) Metabolic responses of the green microalga *Dunaliella salina* to silver nanoparticles-induced oxidative stress in the presence of salicylic acid treatment. *Aquatic Toxicology*, 105356.

Bajguz A (2010). An enhancing effect of exogenous brassinolide on the growth and antioxidant activity in *Chlorella vulgaris* cultures under heavy metals stress. *Environmental and Experimental Botany*, 68(2), 175–179.

Becker EW (1994) *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge University Press, Cambridge

Biba R (2016) Utjecaj nanočestica srebra na pojavu oksidacijskog stresa i ekspresiju proteina u klijancima duhana (*Nicotiana tabacum*). Diplomski rad Sveučilišta u Zagrebu

Biba R, Matić D, Lyons DM, Štefanić PP, Cvjetko P, Tkalec M, Balen B (2020) Coating-dependent effects of silver nanoparticles on tobacco seed germination and early growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3441.

Bianchini A, Bowles KC, Brauner CJ, Gorsuch JW, Kramer JR, Wood CM (2002) Evaluation of the effects of reactive sulfide on the acute toxicity of silver (i) to *Daphnia magna*. Part 2: Toxic results. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2002(21)1294–300.

Biffi S, Voltan R, Rampazzo E, Prodi L, Zauli G, Secchiero P (2015) Applications of nanoparticles in cancer medicine and beyond: optical and multimodal in vivo imaging, tissue targeting and drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 12,1837-1849.

- Blair MF, Kokabian B, Gude VG (2014) Light and growth medium effect on *Chlorella vulgaris* biomass production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 665–674.
- Cheeseman KH (1993) Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Molecular Aspects of Medicine*, 14(3), 191–197.
- Classification of Nanomaterials (2017) *Nano- and Biomaterials*, 27–56.
- Commission recommendation on the definition of nanomaterial (2011/696/EU), *Official Journal of the European Union*, L 275/38, 20.10.2011.
- Cvjetko P, Milošić A, Domijan AM, Vinković Vrček I, Tolić S, Peharec Štefanić P, Letofsky-Papst I, Tkalec M, Balen B (2017) Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137, 18–28.
- Danish Consumer Council. The Nanodatabase (2020) <http://nanodb.dk/en/search-database/> (05. 07. 2020.)
- Das K, Roychoudhury A (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants, *Frontiers in Environmental Science*, 2, 53.
- Dat JF, Foyer CH, Scott I (1998) Changes in salicylic acid and antioxidants during induced thermotolerance in mustard seedlings. *Plant Physiology*, 118, 1455–1461
- de Lima R, Seabra AB, Durán N (2012) Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology*, 32(11), 867–879.
- Domingo G, Bracale M, Vannini, C (2019) Phytotoxicity of silver nanoparticles to aquatic plants, algae, and microorganisms. *Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms*, 143–168.
- Erickson RJ, Brooke LT, Kahl MD, Vende Venter F, Harting SL, Markee TP, et al. (1998) Effects of laboratory test conditions on the toxicity of silver to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*; 17, 572–8.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, 11, 81–128
- Fabrega J, Luoma SN, Tyler CR, Galloway TS, Lead JR (2011) Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. *Environment International*, 37(2), 517–531.
- Fazelian N, Movafeghi A, Yousefzadi M, Rahimzadeh M, Zarei M (2020). Impact of silver nanoparticles on the growth, fatty acid profile, and antioxidative response of *Nannochloropsis oculata*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 42(7).
- Fisher NS, Wang WX (1998) Trophic transfer of silver to marine herbivores: a review of recent studies. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 562–71.
- Foyer CH (1996) Free radical processes in plants. *Biochemical Society Transactions*, 24, 427–433.

- Gambardella C, Costa E, Piazza V, Fabbrocini A, Magi E, Faimali M, Garaventa F (2015) Effect of silver nanoparticles on marine organisms belonging to different trophic levels. *Marine Environmental Research*, 111,41-49.
- Georgantzopoulou A, Balachandran YL, Rosenkranz P, Dusinska M, Lankoff A, Wojewodzka M, Kruszewski M, Guignard C, Audinot JN, Giriya (2013) Ag nanoparticles: Size- and surface dependent effects on model aquatic organisms and uptake evaluation with NanoSIMS. *Nanotoxicology*, 2013(7) 1168–1178.
- Gutteridge JMC, Halliwell B (1988) The antioxidant problems of extracellular fluids. In: Chrow CK, ed. *Cellular antioxidant defense mechanisms*, Vol 2. Boca Ration, CRC Press, 1988,1-23.
- Halliwell B (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *American Journal of Medicine*, 91(3C),14S-22S.
- Halliwell B and Gutteridge JMC (2007) *Free radicals in biology and medicine*, 4th edition, Clarendon Press, Oxford.
- Hazeem LJ, Kuku G, Dewailly E, Slomianny C, Barras A, Hamdi A, Bououdina M (2019) Toxicity effect of silver nanoparticles on photosynthetic pigment content, growth, ROS production and ultrastructural changes of microalgae *Chlorella vulgaris*. *Nanomaterials*, 9(7), 914.
- Hill WR (1941) Argyria: the pharmacology of silver. *Southern Medical Journal*, 34:340.
- Hogstrand C, Wood CM (1998) Toward a better understanding of the bioavailability, physiology and toxicity of silver in fish: implications for water quality criteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*,17:547–61.
- Holzinger A, Pichrtová M (2020) Abiotic stress tolerance of charophyte green algae: new challenges for omics techniques. *Frontiers in Plant Science*, 7,678.
- Jo DH, Kim JH, Lee TG, Kim JH (2016) Assessing Toxicity of Nanoparticles: In Vitro and In Vivo Assays. In: Aliofkhazraei M. (eds) *Handbook of Nanoparticles*, 923-940.
- Huang J, Cheng J, Yi J, (2016) Impact of silver nanoparticles on marine diatom *Skeletonema costatum*. *Journal of Applied Toxicology*, 36(10), 1343e1354.
- Hulla J, Sahu S, Hayes A (2015) Nanotechnology. *Human & Experimental Toxicology*, 34(12), 1318–1321.
- Illman AM, Scragg AH, Shales SW (2000) Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 7,631–5.
- Iravani S, et al. (2014) Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 9(6), 385–406.
- Ivanković M. (2011) Nanomaterijali i nanoproizvodi – mogućnosti i rizici. *Polimeri*, 32 (1), 23-28.

- Ivask A, Kurvet I, Kasemets K, Blinova I, Aruoja V, Suppi S, Vija H, K  inen A, Titma T, Heinlaan M, Visnapuu M, Koller D, Kisand V, Kahru A (2014) Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. *PLoS One* 9.
- Jiang HS, Qiu XN, Li GB, Li W, Yin LY (2014) Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *Spirodela polyrhiza*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(6), 1398–1405.
- Jiravova, J, Tomankova KB, Harvanova M, Malina L, Malohlava J, Luhova L, Kolarova H (2016) The effect of silver nanoparticles and silver ions on mammalian and plant cells in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 96, 50–61.
- Keat CL, Aziz A, Eid AM, Elmarzugi NA (2015) Biosynthesis of nanoparticles and silver nanoparticles. *Bioresour Bioprocessing*, 2,47.
- Kalbassi MR, Johari SA, Soltani M, Yu IJ (2013) Particle size and agglomeration affect the toxicity levels of silver nanoparticle types in aquatic environment. *BioMed Research International*, 1, 247–264.
- Kaliyamurthi S, Selvaraj G, Cakmak ZE, Korkmaz AD, Cakmak T (2019) The relationship between *Chlorella* sp. and zinc oxide nanoparticles: changes in biochemical, oxygen evolution, and lipid production ability. *Process Biochemistry*, 85, 45-50.
- K  lquist T (2001) New OECD TG „Marine Algae Inhibition Test“. Development of ecotoxicity and toxicity testing of chemicals: proceedings of the Fourth Nordic Network Meeting, 9-11 October, Hurdalsj  en, Norway, str. 76-80. Nordic Council of Ministers, Copenhagen
- Kim S, Choi JE, Choi J, Chung KH, Park K, Yi J, Ryu DY (2009) Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. *Toxicology in Vitro*, 23(6), 1076–1084
- Koczkur KM., Mourdikoudis S, Polavarapu L, Skrabalak, SE (2015) Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. *Dalton Transactions*, 44(41), 17883–17905.
- Konishi F, Tanaka K, Himeno K, Taniguchi K, Nomoto K (1985) Antitumoreffect induced by a hot water extract of *Chlorella vulgaris* (CE): resistance to Meth-A tumor growth mediated by CE induced polymorphonuclear leukocytes. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 19(2), 73–8.
- Krienitz L, Hegewald EH, Hepperle D, Huss VAR, Rohr T Wolf M (2004) Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Phycologia*, 43, 529–542.
- Krishnaraj C, Jagan EG, Ramachandran R, Abirami SM, Mohan N, Kalaichelvan PT (2012) Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. *Process Biochemistry*, 47, 651–658.
- Lekamge S., Miranda A.F., Trestrail C., Pham B., Ball A.S., Shukla R., Nugegoda D. (2019). The toxicity of nonaged and aged coated silver nanoparticles to freshwater alga *Raphidocelis subcapitata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(11), 2371-2382.

- Levard C, Hotze EM, Lowry GV, Brown GE (2012) Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environmental Science & Technology*, 46(13), 6900–6914.
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E (1994) Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins, *Methods in Enzymology*, 233, 346–357.
- Lewis MA (1992) Periphyton photosynthesis as an indicator of effluent toxicity: relationship to effects on animal test species. *Aquatic Toxicology*. 23, 279–288.
- Lewis MA, Wang W (1997) Water quality and aquatic plants. U: Wuncheng, W., Gorsuch, J.W., Hughes, J.S. (Eds.), *Plants for Environmental Studies*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Li X, Schirmer K, Bernard L, Sigg L, Pillai S, Behra R (2015) Silver nanoparticle toxicity and association with the alga *Euglena gracilis*. *Environmental Science: Nano*, 2(6), 594–602.
- Lima R, Seabra AB, Durán N (2012) Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. *Journal of Applied Toxicology*, 32, 867–79.
- Luo W, Pröschold T, Bock C, Krienitz, L (2010) Generic concept in *Chlorella*–related coccoid green algae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Plant Biology*, 12, 545–553.
- Luoma SN (2008) Silver nanotechnologies and the environment: old problems and new challenges? Washington DC: Woodrow Wilson International Center for Scholars or The PEW Charitable Trusts.
- Ma X, Geiser-Lee J, Deng Y, Kolmakov A (2010) Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Science of the Total Environment*, 408, 3053–3061.
- Mariano S, Panzarini E, Inverno MD, Voulvoulis N, Dini L (2020) Toxicity, bioaccumulation and biotransformation of glucose-capped silver nanoparticles in green microalgae *Chlorella vulgaris*. *Nanomaterials*, 10(7), 1377.
- Martinez F, Ascaso C, Orus MI (1991) Morphometric and stereologic analysis of *Chlorella vulgaris* under heterotrophic growth conditions. *Annals of Botany*, 67(3), 239–245.
- Matés JM, Sánchez-Jiménez F (1994) Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Frontiers in Bioscience*, 1999, 4:D339–45.
- McGillicuddy E, Murray I, Kavanagh S, Morrison L, Fogarty A, Cormican M, Morris D (2017) Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Science of the Total Environment*, 575, 231–246.
- Millington LA, Goulding KH, Adams N (1988) The influence of growth medium composition on the toxicity of chemicals to algae. *Water Research*, 22(12), 1593–1597.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7, 405–410.

- Mirzajani F, Askari H, Hamzelou S, Farzaneh M, Ghassempour A (2013) Effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa* L. and its rhizosphere bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 88,48-54.
- Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*, 11(1),15–19.
- Melegari SP, Perreault F, Costa RH, Popovic R, Matias WG (2013) Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*, 142-143, 431–440.
- Mody VV, Siwale R, Singh A, Mody HR (2010) Introduction to metallic nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 2(4),282-289.
- Moheimani NR, Borowitzka MA, Isdepsky A, Sing SF (2012) Standard methods for measuring growth of algae and their composition. In: Borowitzka M., Moheimani N. (eds) *Algae for Biofuels and Energy*. *Developments in Applied Phycology*, 5,265–284.
- Nam SH, An YJ (2019) Size- and shape-dependent toxicity of silver nanomaterials in green alga *Chlorococcum infusionum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 168, 88–393.
- Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, Marconi F, Kaegi R, Odzak N, Behra R (2008) Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology*, 42(23), 8959–8964.
- Navarro E, Bonafos C, Pugliara A, Bayle M, Benzo P, Mlayah A, Behra R (2016) The use of biosensors for improving the development of nanotechnology under realistic-use scenarios: Applications for cheaper and more effective silver nanoparticles and nanostructured surfaces. 2016 IEEE Nanotechnology Materials and Devices Conference (NMDC).
- OECD. 2011. Test No. 201: Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test. OECD Publishing, Paris
- Okamoto K, Pinto E, Latorre LR (2001) Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 40(1), 18–24.
- Pedrajas RJ, 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.
- Phan HT, Haes AJ (2019) What Does Nanoparticle Stability Mean? *The Journal of Physical Chemistry C* 123, 16495-16507.
- Poljsak B, Šuput D, Milisav I (2013) Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use synthetic antioxidants, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2013. Article ID 761264
- Qian H, Zhu K, Lu H, Lavoie M, Chen S, Zhongjing Z, Deng Z, Chen J, Fu Z (2016) Contrasting silver nanoparticle toxicity and detoxification strategies in *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris*:

New insights from proteomic and physiological analyses, *Science of the Total Environment*, 572, 1213-1221.

Rai UN, Singh NK, Upadhyay AK, Verma S (2013) Chromate tolerance and accumulation in *Chlorella vulgaris* L.: Role of antioxidant enzymes and biochemical changes in detoxification of metals. *Bioresource Technology*, 136, 604–609.

Rosenman KD, Moss A, Kon S (1979) Argyria: clinical implications of exposure to silver nitrate and silver oxide. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 21,430–5.

Roy R, Parashar A, Bhuvaneshwari M, Chandrasekaran N, Mukherjee A (2016) Differential effects of P25 TiO₂ nanoparticles on freshwater green microalgae: *Chlorella* and *Scenedesmus* species. *Aquatic Toxicology*, 176, 161–171.

Rudramurthy GR, Swamy MK (2018) Potential applications of engineered nanoparticles in medicine and biology: An update. *Journal of Biology and Inorganic Chemistry*, 23, 1185–1204.

Safi C, Zebib B, Merah O, Pontalier PY, Vaca-Garcia C (2014) Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278.

Sendra M, Yeste MP, Gatica JM, Moreno-Garrido I, Blasco J (2017) Direct and indirect effects of silver nanoparticles on freshwater and marine microalgae (*Chlamydomonas reinhardtii* and *Phaeodactylum tricornutum*). *Chemosphere*, 179, 279–289.

Shacter E (2000) Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews*, 32,307–326.

Sharma R, Singh GP, Sharma VK (2012) Effects of culture conditions on growth and biochemical profile of *Chlorella vulgaris*. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 3,131.

Shulaev V, Oliver DJ (2006) Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. New tools for reactive oxygen species research. *Plant Physiology*, 141(2),367-372.

Sies H (1985) Oxidative stress, Introductory remarks. U: Sies H (ur.) Oxidative Stress. London, Academic Press, 1-8.

Sies H (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 82(2), 291–295.

Silva, TU (2011) An evaluation of coating material dependent toxicity of silver nanoparticles. ETD Paper 1229. <http://dc.etsu.edu/etd/1229>

Silva J, Alves C, Pinteus S, Reboleira J, Pedrosa R, Bernardino S (2019) *Chlorella*. Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements, 187–193.

Singh A, Singh SP, Bamezai R. (1999) Inhibitory potential of *Chlorella vulgaris* (E-25) on mouse skin papillomagenesis and xenobiotic detoxication system. *Anti-cancer Research*, 19,1887–91.

Stadtman ER (1990) Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radical Biology and Medicine*, 9, 315–325.

- Špoljarić D (2013) Oksidacijski stres u stanicama alga *Chlorella kessleri* uzrokovan toksičnim zagađivačima u vodama. Doktorski rad. Sveučilište Josipa Juraja Strossmeyera u Osijeku
- Štefan L, Tepšić T, Zaviđić T, Urukalo M, Tota D, Domitrović R (2007) Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina* 43:84-93.
- Štefanić PP, Cvjetko P, Biba R, Domijan AM, Letofsky-Papst I, Tkalec M, Šikić S, Cindrić M, Balen B (2018) Physiological, ultrastructural and proteomic responses of tobacco seedlings exposed to silver nanoparticles and silver nitrate, *Chemosphere*, 209, 640-653.
- Thomas DJ, Thomas JB, Prier SD, Nasso NE, Herbert SK (1999) Iron superoxide dismutase protects against chilling damage in the cyanobacterium *Synechococcus species* PCC7942. *American Science of Plant Physiologists. Plant Physiology*, 120,275–282.
- Tkalec, M, Peharec Štefanić P, Balen B (2019) Phytotoxicity of silver nanoparticles and defence mechanisms. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 44, 145-198.
- Tong S, Fine EJ, Lin Y, Cradick TJ, Bao G (2014) Nanomedicine: tiny particles and machines give huge gains. *Annals of Biomedical Engineering*, 42,243–259.
- Tuominen, M, Schultz E, Sillanpää M (2013) Toxicity and stability of silver nanoparticles to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* in boreal freshwater samples and growth media. *Nanomaterials and the Environment*, 1,48-57.
- Valenti LE, Giacomelli CE (2017) Stability of silver nanoparticles: agglomeration and oxidation in biological relevant conditions. *Journal of Nanoparticle Research*, 19,156.
- Wang F, Guan W, Xu L, Ding Z, Ma H, Ma A, Terry N (2019) Effects of nanoparticles on algae: adsorption, distribution, ecotoxicity and fate. *Applied Science*, 9(8), 1534.
- Wang S, Lv J, Ma J, Zhang S (2016) Cellular internalization and intracellular biotransformation of silver nanoparticles in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nanotoxicology*, 10, 1129–1135.
- Wang J, Wang WX (2014) Significance of physicochemical and uptake kinetics in controlling the toxicity of metallic nanomaterials to aquatic organisms. *Journal of Zhejiang University Science A*,15, 573–592.
- Warheit DB et al (2008) Health effects related to nanoparticle exposures: Environmental, health and safety considerations for assessing hazards and risks. *Pharmacology & Therapeutics*, 120(1), 35-42.
- Welinder KG (1992) Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion in Structural Biology*, 2,388-393.
- Willekens H, Inze D, Van Montagu M, Van Camp W (1995) Catalases in plants. *Molecular Breeding*, 1,207-228.
- Williams D (2008) The relationship between biomaterials and nanotechnology. *Biomaterials* 29(12), 1737-8.

Xu L, Liang HW, Yang Y, Yu SH (2018) Stability and reactivity: positive and negative aspects for nanoparticle processing. *Chemical Reviews*, 118(7), 3209–3250.

Yamamoto M, Fujishita M, Hirata A, Kawano S (2004) Regeneration and maturation of daughter cell walls in the autospore-forming green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Journal of Plant Research*, 117, 257–264.

Yin L, Cheng Y, Espinasse B, Colman BP, Auffan M, Wiesner M, Rose J, Liu J, Bernhardt ES (2011) More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental Science and Technology*, 45, 2360–2367.

Yu S, Yin Y, Liu J (2013) Silver nanoparticles in the environment. *Environmental Science: Processes Impacts*, 15(1), 78–92.

Zhang W, Xiao B, Fang, T (2018) Chemical transformation of silver nanoparticles in aquatic environments: Mechanism, morphology and toxicity. *Chemosphere*, 191, 324–334.

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 18. prosinca 1995. godine u Puli. U Rovinju sam završila Osnovnu školu Jurja Dobrile i Prirodoslovno-matematički smjer u Srednjoj školi Zvane Črnje 2014. godine. 2014. godine sam upisala integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, program koji objedinjuje znanja iz područja biologije i kemije s metodičkim i pedagoškim predmetima. Tijekom studija odradila sam metodičke prakse u V. gimnaziji te Osnovnoj školi Petra Zrinskog gdje sam stekla iskustvo u radu s učenicima. Tijekom studija sam volontirala u Udruzi studenata biologije BIUS te sam 2017., 2018. i 2019. godine bila voditeljica Sekcije za edukaciju Udruge BIUS, a 2018., 2019. i 2020. godine sudjelovala sam u EU projektu „U društvu mikroba“. 2016. godine sam sudjelovala u kreativnim radionicama, interaktivnim diskusijama, debatama i intervjuima na Erasmus + programu u Mađarskoj. Također sam više godina zaredom volontirala na raznim manifestacijama kao Noć biologije, Otvoreni dan kemije, Znanstveni piknik, Interliber, Znanstveni sajam te volontirala na radionicama u raznim školama diljem Hrvatske. 2018. i 2019. godine sam intenzivno prisustvovala biološkim terenima i odradila terenski rad u kojem sam naučila uzimati uzorke, mjeriti morfometrijske parametre gmazova i vodozemaca, postaviti klopke za kornjaše, postavljati mreže za ptice i ostalo.

Mnoge sam korisne vještine naučila na poslovima kao što su voditeljica radionice te rad u uredništvu biologije, a pogotovo na poslu u laboratoriju za organsku sintezu u PLIVA d.o.o.

Dobitnica sam Rektorove nagrade za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici u akademskoj godini 2018./2019.

