

Utjecaj nanočestica srebra stabiliziranih različitim omotačima na aktivnost i ekspresiju enzima antioksidacijskog sustava u klijancima duhana (*Nicotiana tabacum* L.)

Kotarski, Lucija

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:709291>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-03**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Lucija Kotarski

**UTJECAJ NANOČESTICA SREBRA STABILIZIRANIH RAZLIČITIM
OMOTAČIMA NA AKTIVNOST I EKSPRESIJU ENZIMA ANTIOKSIDACIJSKOG
SUSTAVA U KLIJANCIMA DUHANA (*Nicotiana tabacum* L.)**

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biljnu proteomiku na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom prof. dr. sc. Biljane Balen te neposrednim vodstvom mag. educ. biol. et chem. Renate Biba. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Za početak, zahvaljujem se mentorici dr. sc. Biljani Balen, prof. na iznimno ugodnoj komunikaciji i ljubaznosti te izvanrednoj organizaciji, brizi i planiranju provedbe mog diplomskog rada tijekom nepredvidivih vremena tekuće godine.

Veliko hvala neposrednoj voditeljici, mojoj dragoj Renati Biba, mag. educ. biol. et chem. na velikom broju odgovorenih pitanja, na brojnim idejama i požrtvovnosti, na susretljivosti te pomoći tijekom eksperimentalnog rada.

Zahvaljujem se ukupnom osoblju laboratorija radi pružanja iznimno pozitivne i poticajne atmosfere za rad.

Najveće hvala mojim roditeljima i bratu koji su me usmjerili na pravi put, pružili mi najveću podršku te mi omogućili sve što mi je bilo potrebno. Zaslužni su za sve što ja danas jesam.

Hvala Filipu i Mariji što nesebično dijele svoje vrijeme sa mnom, sudjeluju u svim važnim događajima te me svakodnevno podsjećaju na važnost prijateljstva, kompromisa i ljubavi.

Hvala mojem djedu i baki, cjelokupnoj porodici i prijateljima. Hvala svima koji su sudjelovali u donošenju i provođenju mojih važnih životnih odluka.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Diplomski rad

UTJECAJ NANOČESTICA SREBRA STABILIZIRANIH RAZLIČITIM OMOTAČIMA NA AKTIVNOST I EKSPRESIJU ENZIMA ANTIOKSIDACIJSKOG SUSTAVA U KLIJANCIMA DUHANA (*Nicotiana tabacum* L.)

Lucija Kotarski

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Nanočestice srebra (AgNP) ubrajamo u često korištene nanomaterijale zbog njihovih antimikrobnih svojstava koja im osiguravaju veliki tržišni potencijal i široku primjenu. Brojna toksikološka ispitivanja ukazuju na važnost istraživanja i razumijevanje potencijalno štetnog učinka AgNP na okoliš. Ovaj rad usmjeren je na ispitivanje toksičnosti 100 μM AgNP stabiliziranih omotačima od polivinilpirolidona (AgNP-PVP) i cetiltrimetilamonijevog bromida (AgNP-CTAB) i 100 μM srebrova nitrata (AgNO_3), samih i u kombinaciji s 500 μM cisteinom, na klijance duhana (*Nicotiana tabacum* L.). Spektrofotometrijska analiza stabilnosti AgNP u hranjivoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS pokazala je veću stabilnost AgNP-PVP u odnosu na AgNP-CTAB, dok je dodatak cisteina narušio stabilnost AgNP-PVP, a kratkoročno produljio stabilnost AgNP-CTAB. Spektrofotometrijsko mjerenje aktivnosti antioksidacijskih enzima (superoksid dismutaza, katalaza, askorbat i pirogalol peroksidaza), detekcija njihovih izoformi elektroforezom u nativnim uvjetima i imunokemijska metoda pokazale su promjene u njihovoj aktivnosti i ekspresiji. Najosjetljivijim enzimom pokazala se askorbat peroksidaza. Usporedbom tretmana s AgNP i AgNO_3 utvrđena je veća toksičnost AgNP-CTAB te manja toksičnost AgNP-PVP prema većini parametara, u odnosu na AgNO_3 . Dodatak cisteina nije utjecao na fitotoksičnost AgNP-PVP, ali je djelomično ublažio toksičan učinak AgNP-CTAB, što navodi na zaključak da fitotoksičnost AgNP-PVP proizlazi većim dijelom iz samih nanočestica, dok fitotoksičnost AgNP-CTAB proizlazi iz otpuštenih Ag^+ ili omotača CTAB.

(71 stranica, 27 slika, 4 tablice, 97 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Ključne riječi: nanočestice srebra, ionsko srebro, omotači, oksidacijski stres, antioksidacijski enzimi

Voditelj: Red. prof. dr. sc. Biljana Balen

Neposredni voditelj: Renata Biba, mag. educ. biol. et chem.

Ocjenitelji: Red. prof. dr. sc. Biljana Balen

Izv. prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

Izv. prof. dr. sc. Martina Šeruga Musić

Zamjena: Doc. dr. sc. Petra Peharec Štefanić

Rad prihvaćen: 04.02.2021

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation Thesis

IMPACT OF SILVER NANOPARTICLES STABILIZED BY DIFFERENT COATINGS ON
ACTIVITY AND EXPRESSION OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN TOBACCO SEEDLINGS

(*Nicotiana tabacum* L.)

Lucija Kotarski

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Silver nanoparticles (AgNP) are one of the most frequently used nanomaterials, due to their antimicrobial properties, which provide them great market potential and wide application. Numerous toxicological studies indicate the importance of investigating and understanding potentially harmful effects of AgNP on the environment. This work is focused on toxicity testing of 100 μM AgNP stabilized with polyvinylpyrrolidone (AgNP-PVP) and cetyltrimethylammonium bromide (AgNP-CTAB) coatings and 100 μM AgNO_3 , single and in combination with 500 μM cysteine, applied to tobacco seedlings (*Nicotiana tabacum* L.). Spectrophotometric analysis of AgNP stability in $\frac{1}{2}$ MS nutrient medium showed higher stability of AgNP-PVP compared to AgNP-CTAB, while cysteine addition disturbed AgNP-PVP stability and prolonged the stability of AgNP-CTAB in the short term. Spectrophotometric measurement of activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, ascorbate and pyrogallol peroxidase), detection of their isoforms by native electrophoresis and immunochemical method showed changes in their activity and expression. Ascorbate peroxidase proved to be the most sensitive enzyme. Comparison of AgNP and AgNO_3 treatments revealed higher toxicity of AgNP-CTAB and lower toxicity of AgNP-PVP compared to AgNO_3 , according to the majority of the parameters. Addition of cysteine did not affect AgNP-PVP phytotoxicity, but partially alleviated toxic effects of AgNP-CTAB, leading to the conclusion that phytotoxicity of AgNP-PVP comes predominantly from the nanoparticles, while AgNP-CTAB phytotoxicity results from the released Ag^+ ions or CTAB coating.

(71 pages, 27 figures, 4 tables, 97 references, original in: Croatian language)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: silver nanoparticles, ionic silver, coatings, oxidative stress, antioxidant enzymes

Supervisor: Prof. Dr. Biljana Balen

Assistant supervisor: Renata Biba, mag. educ. biol. et chem.

Reviewers: Prof. Dr. Biljana Balen

Assoc. Prof. Dr. Željka Vidaković-Cifrek

Assoc. Prof. Dr. Martina Šeruga Musić

Zamjena: Asst. Prof. Dr. Petra Peharec Štefanić

Thesis accepted: 04.02.2021.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Nanotehnologija.....	1
1.1.1. Nanočestice srebra.....	1
1.1.2. Karakterizacija nanočestica srebra	3
1.1.3. Omotači za stabilizaciju nanočestica srebra.....	3
1.1.4. Cistein kao kelator iona srebra	5
1.2. Biljni stres	6
1.2.1. Oksidacijski stres.....	6
1.2.2. Antioksidacijski enzimi	7
1.3. Utjecaj AgNP na biljke	8
1.4. Modelni organizam	10
1.5. Cilj istraživanja.....	11
2. MATERIJALI I METODE.....	12
2.1. Materijali	12
2.1.1. AgNP	12
2.1.2. Biljni materijal	12
2.2. Metode	14
2.2.1. Mjerenje stabilnosti AgNP u hranjivoj podlozi ½ MS	14
2.2.2. Ekstrakcija topivih proteina	14
2.2.3. Određivanje koncentracije topivih proteina.....	15
2.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima.....	16
2.2.5. Razdvajanje proteina poliakrilamidnom gel elektroforezom u nativnim uvjetima	20
2.2.6. Određivanje aktivnosti i broja izoformi enzima na gelu.....	21
2.2.7. Razdvajanje topivih proteina SDS-PAG elektroforezom i vizualizacija proteina..	22
2.2.7.1. SDS-PAG elektroforeza	23
2.2.7.2. Bojanje gelova bojom <i>Coomassie Brilliant Blue</i>	24
2.2.7.3. Bojanje gelova srebrovim nitratom.....	24
2.2.8. Imunokemijska detekcija proteina na membrani.....	25
2.3. Analiza i statistička obrada podataka.....	26
3. REZULTATI	28
3.1. Spektrofotometrijska analiza otopina AgNP i AgNO ₃ u hranjivoj podlozi ½ MS.....	28
3.1.1. Analiza otopine AgNP-PVP.....	28
3.1.2. Analiza otopine AgNP-PVP uz dodatak cisteina	30

3.1.3. Analiza otopine AgNP-CTAB	32
3.1.4. Analiza otopine AgNP-CTAB uz dodatak cisteina	34
3.1.5. Analiza otopine AgNO ₃	36
3.1.6. Analiza otopine AgNO ₃ uz dodatak cisteina.....	38
3.2. Koncentracija topivih proteina	40
3.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima	41
3.3.1. Aktivnost enzima SOD	41
3.3.2. Aktivnost enzima CAT	42
3.3.3. Aktivnost enzima APX	43
3.3.4. Aktivnost enzima PPX.....	44
3.4. Aktivnost i broj izoformi enzima na gelu	45
3.4.1. Aktivnost enzima SOD	45
3.4.2. Aktivnost enzima CAT	45
3.4.3. Aktivnost enzima APX	46
3.4.4. Aktivnost enzima PPX.....	47
3.5. Ekspresija topivih proteina.....	48
3.6. Imunokemijska detekcija proteina na membrani.....	50
3.6.1. Ekspresija proteina SOD.....	50
3.6.2. Ekspresija proteina CAT.....	50
3.6.3. Ekspresija proteina APX.....	51
3.6.4. Ekspresija proteina PPX	52
4. RASPRAVA	54
5. ZAKLJUČAK.....	63
6. POPIS LITERATURE	64

POPIS KRATICA I SIMBOLA

AA – akrilamid

AgNP – nanočestice srebra

APS – amonijev peroksodisulfat

APX – enzim askorbat peroksidaza

Bis – N,N'-metilen-bis-akrilamid

BSA – goveđi serumski albumin

CAT – enzim katalaza

CBB – *Comassie Brilliant Blue*

CTAB – cetiltrimetilamonijev bromid

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

HRP – enzim peroksidaza iz hrena

½ MS – hranjiva podloga Murashige-Skoog s polovičnom koncentracijom makroelemenata

NBT – nitro plavi tetrazolij

PAGE – poliakrilamid gel elektroforeza

PBS – puferirana otopina fosfatnih soli

PPX – enzim pirogalol peroksidaza

PVP – polivinilpirolidon

SDS – natrijev dodecil sulfat

SOD – enzim superoksid dismutaza

SPR – površinska plazmonska rezonancija

TBS – pufer Tris

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

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

UV-Vis – Ultraljubičasto zračenje/Vidljiva svjetlost

UVOD

1. UVOD

1.1. Nanotehnologija

Nanotehnologija označava znanstveno područje koje se bavi modeliranjem i manipulacijom nanomaterijala, nanoalata i nanouređaja koji doprinose pronalasku novih tehničkih rješenja i proizvoda. Nanostrukture su strukture kojima je barem jedna dimenzija promjera od 0,1 do 100 nm, gdje prefiks „nano“ označava 10^{-9} dio metra.

U današnje vrijeme nanomaterijali česti su objekt brojnih znanstvenih i tehnoloških istraživanja. Svoju primjenu i potencijal pronalaze u socijalnom, ekološkom, ekonomskom i financijskom aspektu osiguravajući energetske učinkovite inovacije. Upotrebom nanotehnologije mogao bi se riješiti budući problem nedostatka pitke vode na Zemlji. Nanofilteri, uz nisku energetske potrošnju, uspješno filtriraju vodu te uklanjaju organske i anorganske tvari te bakterije i viruse, smanjujući kasniju potrebu za dezinfekcijom vode (Zekić i sur. 2018). Nanomaterijali se koriste za razvoj učinkovitijih baterija koje se brže pune te poboljšanje ekrana na pametnim telefonima (Kumar i sur. 2018). Koriste se i za osiguravanje sterilnosti prilikom pakiranja hrane, sprječavanje gubitka boje u odjeći, proizvodnji krema za sunčanje i mnogim drugim industrijskim sektorima (www.nano.gov). Važna sposobnost nanomaterijala je da djeluju kao katalizatori kemijskih reakcija (Kumar i sur. 2018, Zekić i sur. 2018) te se koriste u automobilske industriji i postrojenjima za preradu nafte. Integracija nanomaterijala u solarne panele omogućava efikasniju pretvorbu sunčeve energije u električnu energiju (www.nano.gov) te dodatno osigurava značajnu uštedu energije (Zekić i sur. 2018).

1.1.1. Nanočestice srebra

Nanočestice (eng. *nanoparticles*, NP) ubrajaju se u nanomaterijale trodimenzijske strukture gdje je svaka prostorna dimenzija manja od 100 nm na nanoskali. Nanočestice mogu nastati planirano u laboratorijskim uvjetima te nenamjerno djelovanjem prirodnih procesa, kao što su erupcije vulkana, požari, izgaranje goriva i sl. (Ivanković 2011).

Još od doba antike poznata je antibakterijska uloga srebra (Yu i sur. 2018). Otpušteni ioni srebra (Ag^+) toksično djeluju i na prokariotske i na eukariotske stanice, što omogućava široku primjenu srebra u medicinskim i komercijalno dostupnim proizvodima, osiguravajući supresiju rasta bakterija i gljivica (Kvitek i sur. 2011). Razvojem nanotehnologije omogućena je sinteza nanočestica srebra (AgNP) te time njihova češća primjena u biomedicinske svrhe. Globalni problem današnjice je česta bakterijska otpornost na antibiotike koja nastaje zbog nepravilnog propisivanja i upotrebe antibiotika, upotrebe antibiotika s ciljem poboljšanja zdravlja životinja namijenjenih za prehrambenu industriju te upotrebe higijenskih proizvoda i

proizvoda za čišćenje s antibakterijskim svojstvima (Ventola 2015). Sve veću važnost dobivaju tvari koje imaju antimikrobnu aktivnost, a istovremeno ne omogućavaju bakterijama razvoj otpornosti. Kao pogodna alternativa ističu se AgNP (Yu i sur. 2018), koje u usporedbi s ionskim srebrom (AgNO_3) pokazuju jaču antibakterijsku aktivnost (Kvitek i sur. 2011). Istraživanja su pokazala da osim navedenih svojstava, AgNP imaju i pojačanu antivirusnu i fungicidnu aktivnost, što proširuje njihovu primjenu na prehrambenu, tekstilnu i kozmetičku industriju (Wei i sur. 2015). Sve je vjerojatnija i primjena AgNP kao potencijalnih antikancerogenih lijekova koji bi u odgovarajućim koncentracijama uzrokovali oštećenja i zaustavljanje proliferacije tumorskih stanica, a ne bi djelovali citotoksično na zdrave stanice (Kvitek i sur. 2011, Zhang i sur. 2014, Kumar i sur. 2018).

Upotreba AgNP proizlazi iz njihovih svojstava – veličine, oblika, površinskog naboja te omotača na površini. Zbog velikog omjera površine i volumena povećana im je reaktivnost, a time i potencijalna toksičnost (Buzea i sur. 2007). Sposobnost AgNP da disociraju i agregiraju utječe na njihovu bioraspoloživost, biološku aktivnost, stabilnost, interakciju i učinak na druge molekule (Wei i sur. 2015). Stopa disocijacije nanočestica ovisi o kemijskim i površinskim svojstvima, a događa se zbog procesa oksidacije na površini čestice te rezultira otpuštanjem iona Ag^+ koji zajedno s AgNP uzrokuju povišenje koncentracije molekula reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) rezultirajući pojavom oksidacijskoga stresa, nekrozom i mogućom apoptozom. Često uočena pojava je agregacija AgNP, međusobno ili s drugim ionima i molekulama prisutnim u otopini, koja rezultira smanjenjem njihove toksičnosti (Levard i sur. 2014, Wei i sur. 2015). U stanici izloženoj nestabilnim i lako promjenjivim AgNP dolazi do pojave citotoksičnosti i genotoksičnosti; naime, AgNP te disocirani ioni Ag^+ induciraju pojačano stvaranje molekula ROS koje reagiraju s molekulom DNA, tiolnim skupinama proteina i lipidima, uzrokujući metaboličke poremećaje, uništavanje staničnih membrana te u konačnici smrt stanice (Zhang i sur. 2014, Wei i sur. 2015, Tkalec i sur. 2019). Duljom izloženosti stanice AgNP aktivira se odgovarajući stanični odgovor na aktualnu nanotoksičnost i započinju biokemijske promjene, aktivacija gena uključenih u oksidacijski stres, upalni odgovori, regulacija staničnog ciklusa, popravak molekule DNA i dr. (Zhang i sur. 2014).

Specifična svojstva AgNP ukazuju na njihov veliki tržišni potencijal i široku primjenu. Ipak, prije svake upotrebe novoga materijala potrebno je provesti studiju o procjeni sigurnosti i utjecaju na okoliš. Zbog velike reaktivnosti otežana je identifikacija i detekcija koncentracije AgNP u okolišu. Također, poznato je da ispuštanjem AgNP u okoliš dolazi do njegove transformacije (Kabir i sur. 2018). Važno je napomenuti da toksičnost AgNP proizlazi iz

svojstva samih nanočestica, kao što su veličina, oblik, koncentracija, prisutnost omotača i površinski naboj nanočestice, ali i o starosti i izloženom tkivu samog organizma (Sekhon 2014, Silva i sur. 2014). Svojstvo koje nanočesticama omogućava široku primjenu je velik omjer površine i volumena, čime se osiguravaju različita fizikalno-kemijska svojstva u odnosu na ranije upotrebljavane materijale većih dimenzija (Mody i sur. 2010). Navedeno povećava reaktivnost, ali i djelotvornost nanočestica. Unatoč svome jedinstvenom značaju, nanočestice imaju nepredvidivu promjenjivost struktura i svojstava, koji povećavaju rizik njihove upotrebe (Kabir i sur. 2018)

1.1.2. Karakterizacija nanočestica srebra

Stabilnost AgNP u biološkom mediju može se odrediti UV-VIS apsorpcijskom spektrofotometrijom, jednom od metoda za kvantifikaciju organskih tvari u otopini koja se temelji na interakciji elektromagnetskog zračenja i promatrane tvari. Prilikom analize određuje se koncentracija apsorbirane svjetlosti (elektromagnetskog zračenja) koja uzrokuje pobuđivanje molekula promatrane tvari te izbijanje elektrona iz osnovnog stanja u stanje više energetske razine. Poznavanjem valne duljine na kojoj analizirana molekula apsorbira svjetlost moguće je točno odrediti koncentraciju tvari (Nilapwar i sur. 2011). Ovom metodom moguće je pratiti i stabilnost AgNP u vremenu. Površinska plazmonska rezonancija (engl. *surface plasmon resonance*, SPR) predstavlja alat za mjerenje apsorbancije nanočestica, a uzrokuje jako raspršenje i apsorbanciju svjetlosti određene valne duljine. Narušavanjem stabilnosti AgNP smanjuje se energetska vrijednost SPR pika te se on pomiče od svoje standardne vrijednosti od 450 nm, pri kojima se AgNP veličine oko 50 nm nalaze u stabilnom stanju (www.nanocomposix.com).

1.1.3. Omotači za stabilizaciju nanočestica srebra

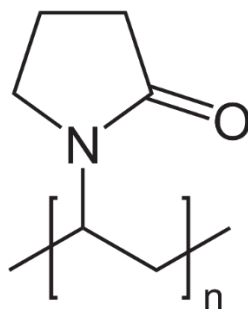
Zbog česte upotrebe AgNP nerijetko dolazi do njihova otpuštanja u okoliš, gdje različite promjene u okolišnim uvjetima, kao što su tlak, temperatura, vlaga i pH, uzrokuju promjenu kemijskih i fizikalnih svojstava te promjene u specijaciji, toksičnosti i stabilnosti nanočestica (Haramina 2008). Zbog navedenih pojava gotovo je nemoguće odrediti količinu otpuštenih AgNP, koje u različitim uvjetima disociraju, aglomeriraju te stvaraju složenije spojeve.

Tilaki i sur. (2006) analizirali su ponašanje AgNP u tri različita medija, vodi, acetonu i etanolu, prateći njihovu stabilnost i optička svojstva i na taj je način dobiven uvid u promjene u veličini i obliku AgNP te stopi agregacije. Stabilnost AgNP koje su inkubirane u acetonu ostala je nepromijenjena, dok su u etanolu već 48 sati nakon početka inkubacije sve AgNP u

potpunosti agregirale i istaložile se, čime se narušila njihova stabilnost. Taloženje AgNP inkubiranih u redestiliranoj vodi započelo je tek nakon dva tjedna. I veličina AgNP inkubiranih u različitim medijima se promijenila; najmanje AgNP detektirane su u acetonu, a najveće u etanolu. Oblik AgNP je u svim medijima ostao nepromijenjen.

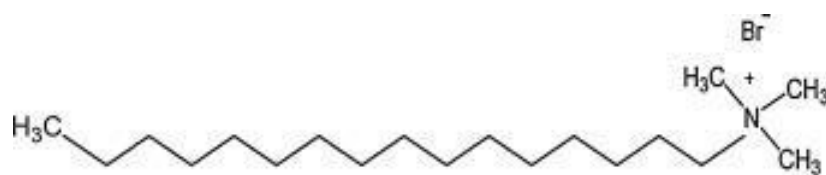
Kemijskom modifikacijom površine nanočestice, moguće je utjecati na stabilnost, smanjenje potencijalnog štetnog djelovanja te interakciju s drugim molekulama (Kvitek i sur. 2011, Zhang i sur. 2014, Wei i sur. 2015). Tijekom kemijske sinteze, AgNP se često okružuju organskim ligandima, za što se uglavnom koriste surfaktanti (npr. cetiltrimetilamonijev bromid, CTAB), mali ligandi (amini), polimeri (npr. polivinilpirolidon, PVP), polisaharidi i dr. (Campisi i sur. 2016). Različiti omotači zbog različitih površinskih svojstava djeluju na različite načine, a primarno sprječavaju aglomeraciju i disocijaciju AgNP (Zhang i sur. 2014).

PVP je sastavljen od monomera n-vinilpirolidona koji čine polimer veličine oko 40 kDa (Slika 1). Zbog svoje veličine teško je uklonjiv s površine nanočestice, zbog čega osigurava stabilnost. S površinom nanočestice povezuje se preko Van der Waalsovih sila te putem prijenosa naboja. Stabilan je u fiziološkoj otopini, vodi, etanolu, kloroformu i ostalim polarnim otapalima. Česticama AgNP daje blago negativan naboj koji u širokom rasponu pH vrijednosti (od 3 do 10) ostaje nepromjenjiv. PVP se kao omotač koristi za čestice koje mogu biti izložene različitim otapalima i solima, osiguravajući im stabilnost (www.nanocomposix.com).



Slika 1. Kemijska formula molekule PVP.

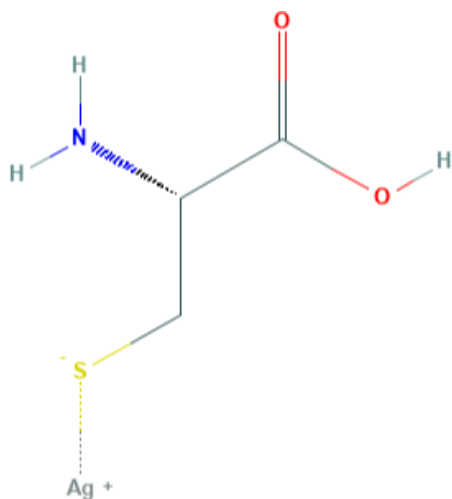
CTAB je kvaterni amonijev surfaktant sastavljen od 16 ugljikovih atoma dugog repa te amonijeve glave s tri metilne skupine (Slika 2). Način vezanja AgNP i molekula CTAB još nije dovoljno razjašnjen, no poznato je da na površini AgNP stvara dvosloj. Hidrofilni, kationski kraj molekule povezuje se s površinom nanočestice, a hidrofobni rep strši prema van te se na njega veže hidrofobni kraj druge molekule CTAB, čiji se kationski kraj nalazi na površini dvosloja i osigurava pozitivan naboj AgNP. Struktura dvosloja osigurava koloidnu stabilnost nanočestice (Park 2014).



Slika 2. Kemijska formula molekule CTAB.

1.1.4. Cistein kao kelator iona srebra

Kao što je već i ranije spomenuto, jednom kada se AgNP otpuste u okoliš, one mijenjaju svoja fizikalno-kemijska svojstva i toksičnost. Često disociraju na slobodne ione Ag^+ koji djeluju toksično na organizme u okolišu te u konačnici i na čovjeka. Aminokiselina cistein ima ključnu ulogu u smanjivanju toksičnog učinka iona Ag^+ jer djeluje kao kelator iona metala. Naime, cistein ima tendenciju interakcije s ionima metala koji se čvrsto vežu za tiolnu skupinu cisteina (Slika 3), što osigurava neutralizaciju njihove aktivnosti (Chen i sur. 2013). Promjene u okolišu, kao što je vrijednost pH, uvelike utječu na protonacijsko stanje i konformaciju samog cisteina, čime se mijenja njegova sposobnost uspješnog vezanja iona metala (Handing i sur. 2019).



Slika 3. Interakcija molekule cisteina i iona Ag^+ .

1.2. Biljni stres

Tijekom evolucije od velike važnosti biljkama je bilo razviti niz složenih obrambenih odgovora na stresne uvjete koji su stalno prisutni u prirodi, a biljka kao sesilni organizam nema mogućnosti samostalnog udaljavanja od istoga. Biljni stres predstavlja reakciju u biljnoj stanici koja nastaje kao posljedica djelovanja stresnog čimbenika izvan granica optimalnih vrijednosti. Razlikujemo biotički (napad patogena, predatora, alelopatija i dr.) i abiotički stres (promjene u intenzitetu svjetlosti, temperaturi, količini vode, kisika i dr.). Kad biljka percipira stresni čimbenik, aktivira prijenos signala te stvara odgovor na stres potaknut konkretnim događajem. Stvara se specifičan odgovor koji je ovisan o vrsti stresnog čimbenika te nespecifičan odgovor biljke na stres koji se javlja uvijek neovisno o vrsti stresa. U konačnici, odgovor biljke može biti otpornost koja rezultira prevladavanjem nepovoljnih uvjeta te preživljenjem i daljnjim rastom biljke ili osjetljivost biljke, zbog čega se javljaju oštećenja i poremećaji metabolizma koji rezultiraju smrću biljke (Buchanan i sur. 2002, Pevalek-Kozlina 2003).

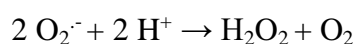
1.2.1. Oksidacijski stres

Jedan od prvih odgovora biljke na stresne uvjete je pojačano stvaranje molekula ROS koje imaju važnu ulogu kao signalne molekule i regulatori biljnih procesa. Najčešće se stvaraju singletni kisik ($^1\text{O}_2$), superoksidni radikal (O_2^-), vodikov peroksid (H_2O_2) i hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$). Nastaju u normalnim uvjetima u biljci tijekom procesa fotosinteze i staničnog disanja (Mittler 2002). Ipak, tijekom djelovanja stresnih uvjeta aktiviraju se metabolički putovi u kojima dolazi do pojačanog stvaranja molekula ROS. Visoka razina molekula ROS u stanici uzrokuje pojavu oksidacijskog stresa, stanja u stanici u kojem dolazi do neravnoteže između proizvodnje molekula ROS i neutralizacije slobodnih radikala antioksidansima, što se očituje oštećenjem staničnih komponenti i bioloških makromolekula (Tkalec i sur. 2019, Xie i sur. 2019). Kako bi se stanica obranila, mora aktivirati i strogo kontrolirati antioksidanse, koji se sastoje od enzimskih i neenzimskih komponenti. U enzimске antioksidanse ubrajaju se superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), askorbat peroksidaza (APX), pirogolol peroksidaza (PPX) i mnogi drugi enzimi, dok se u neenzimske antioksidanse ubrajaju askorbinska kiselina, glutation, karotenoidi, flavonoidi itd. Porast koncentracije antioksidansa ukazuje na pojavu oksidacijskoga stresa u stanici (Pandey i sur. 2017).

1.2.2. Antioksidacijski enzimi

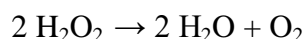
Antioksidacijski enzimi važna su komponentna antioksidacijske obrambene mašinerije koja ima ključnu ulogu u odgovoru biljke na stresni uvjet koji je doveo do povećanja koncentracije molekula ROS.

Superoksid dismutaza je središnji enzim u antioksidacijskoj obrani jer katalizira reakciju dismutacije O_2^- u molekulu kisika (O_2) i H_2O_2 prema sljedećoj jednadžbi:



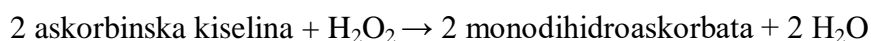
SOD nalazimo u svim staničnim odjeljcima biljaka te ga ubrajamo u skupinu metaloenzima. Prema metalnom kofaktoru razlikujemo enzime SOD sastavljene od iona željeza (Fe-SOD), mangana (Mn-SOD) te bakra i cinka (Cu/Zn-SOD). Navedene izoforme različito su locirane u stanici; Mn-SOD lokaliziran je u mitohondrijima, Fe-SOD u kloroplastima dok je Cu/Zn-SOD prisutan u tri izoforme lokalizirane u citosolu, kloroplastu, peroksisomu i mitohondriju (Sharma i sur. 2012). Povišena koncentracija enzima SOD tijekom djelovanja stresnog uvjeta ukazuje na pojavu oksidacijskog stresa u biljkama, ali i na povećanu otpornost biljke na oksidacijski stres (Gupta i sur. 1993).

Katalaza je enzim antioksidacijskog sustava koji H_2O_2 , koji nastaje tijekom fotorespiracije, transporta elektrona u lancu prijenosa elektrona u mitohondriju te tijekom β -oksidacije masnih kiselina (Sharma i sur. 2012), razlaže na vodu (H_2O) i O_2 (Willekens i sur. 1995) prema jednadžbi:



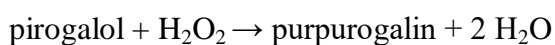
CAT je najčešće lokalizirana u peroksisomu, mjestu na kojem se generira najveća koncentracija H_2O_2 , dok je u ostalim organelima njena aktivnost slabija. Za svoju aktivnost ne zahtjeva stanični reducirajući ekvivalent, što je čini manje osjetljivom na redoks stanje u stanici. U odnosu na APX, CAT ima manji afinitet prema H_2O_2 . Istraživanja su pokazala da CAT ima zaštitnu ulogu u biljkama tijekom izlaganja stresnim uvjetima, ali da intenzitet, vrsta te trajanje stresa mogu povećati ili smanjiti njenu aktivnost (Sharma i sur. 2012). U kritosjemenjača poznata su tri gena koji kodiraju za CAT, a moguće ih je klasificirati u tri razreda, ovisno o mjestu ekspresije (Willekens i sur. 1995).

Askorbat peroksidaza jedan je od najzastupljenijih i esencijalnih enzima antioksidacijskoga sustava u biljkama (Sharma i sur. 2012). Za svoju aktivnost APX zahtjeva supstrat, askorbinsku kiselinu, koju oksidira što omogućava redukciju H_2O_2 do H_2O i monodihidroaskorbata prema jednadžbi (Mittler i Zilinskas 1993):



APX je centralna komponenta askorbat-glutation ciklusa, metaboličkog puta u kojemu dolazi do procesa regeneracije askorbinske kiseline. Navedeni ciklus odvija se u svim staničnim odjeljcima, što ukazuje na visoku zastupljenost APX u stanici te važnost ovoga procesa u obrambenim odgovorima biljke (Mittler 2002, Sharma i sur. 2012). Poznato je pet izoformi enzima koje su različito lokalizirane u stanici (Jiménez i sur. 1997), a svima je zajednički visoki afinitet za H₂O₂, što APX čini vrlo učinkovitim enzimom u uklanjanju H₂O₂ tijekom djelovanja stresnih uvjeta (Sharma i sur. 2012).

Pirogalol peroksidaza se ubraja u nespecifične peroksidaze koje imaju slabu supstratnu specifičnost. Kao donor elektrona, PPX koristi pirogalol te reducira H₂O₂ do H₂O prema jednadžbi:



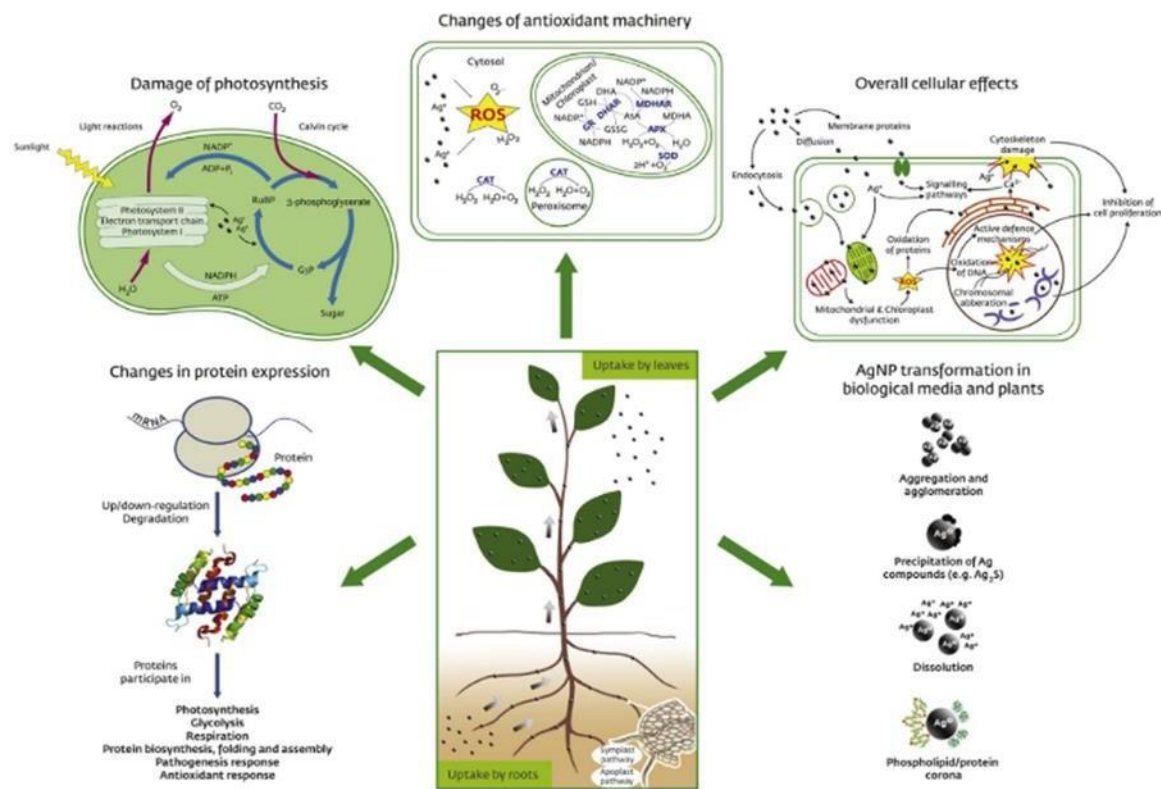
U normalnim uvjetima u stanici ima važnu ulogu u procesima diferencijacije stanica, izgradnje stanične stijenke – lignifikaciji, suberinizaciji, metabolizmu auksina, zarastanju rana te obrani od patogena (Gaspar i sur. 1991).

1.3. Utjecaj AgNP na biljke

Sve češća implementacija AgNP u komercijalne proizvode povećava zabrinutost zbog njihovog potencijalno štetnog utjecaja na okoliš. Ispuštanje AgNP u okoliš preko industrijskih odlagališta otpada i otpadnih voda omogućava njihovu akumulaciju u biljnom ekosustavu. Problem predstavlja i navodnjavanje poljoprivrednih polja kanalizacijskim muljem (Blaser i sur. 2008). Navedeno, osim što ima direktni utjecaj na biljke, preko hranidbenog lanca indirektno djeluje i na čovjeka te predstavlja potencijalni problem za cijeli ekosustav (Rico i sur. 2011). Toksičnost AgNP ovisi o vrsti i starosti biljke (Tkalec i sur. 2019), o svojstvima AgNP kao što su veličina, koncentracija, kemijska svojstva (Cvjetko i sur. 2017) te o stabilnosti AgNP u biološkom mediju (Wei i sur. 2015, Biba i sur. 2020). Istraživanja su pokazala da otpuštene AgNP ulaze u biljku te utječu na njezinu klijavost, rast, morfologiju, stopu fotosinteze, ukupnu ekspresiju proteina te pojavu oksidacijskog stresa (Qian i sur. 2013, Biba i sur. 2020) (Slika 4).

Oksidacijski stres jedan je od glavnih mehanizama toksičnosti AgNP koji za posljedicu ima oštećenje važnih bioloških molekula, kao što su molekula DNA, proteini i lipidi (Zhang i sur. 2014, Cvjetko i sur. 2017, Cvjetko i sur. 2018, Peharec Štefanić i sur. 2018). Stanica, kako bi se obranila od oksidacijskog stresa, aktivira brojne komponente antioksidacijskoga sustava. Ipak, dosadašnja istraživanja koja se bave promjenama aktivnosti antioksidacijskoga sustava usred pojave oksidacijskoga stresa izazvanog toksičnim djelovanjem AgNP nisu dala

jednoznačne rezultate, a fitotoksičnost AgNP pokazala se ovisnom o biljnoj vrsti, starosti i vrsti biljnog tkiva. Yasur i Rani (2013) zabilježili su povećanu aktivnost enzima PPX i SOD nakon izlaganja klijanaca vrste *Ricinus communis* 9,27 mM AgNP u odnosu na kontrolu, dok su Jiang i sur. (2014) detektirali povećanu aktivnosti enzima CAT i SOD nakon tretmana biljke *Spirodela polyrhiza* s 92,70 μ M AgNP u usporedbi s kontrolom. S druge strane, u istraživanjima na klijancima vrste *Pennisetum glaucum* (Khan i sur. 2019) i *Brassica sp.* (Vishwakarma i sur. 2017) uočeno je smanjenje aktivnosti enzima APX i CAT nakon tretmana s 1 i 3 mM AgNP i AgNO₃ u usporedbi s kontrolom, a autori su navedenu pojavu pripisali mogućem oštećenju antioksidacijskog sustava uslijed štetnog djelovanja AgNP i slobodnih iona Ag⁺. Nakon izlaganja korjenčića luka (*Allium cepa*) istim koncentracijama AgNP i AgNO₃, zabilježen je povećan oksidacijski stres i aktivnost enzima PPX nakon svih tretmana, iako je značajnije povećanje izmjereno nakon izlaganja AgNO₃ u usporedbi s AgNP (Cvjetko i sur. 2017). U istom radu, tretmani s AgNP smanjili su aktivnost enzima APX, a nisu djelovali na aktivnost enzima CAT, dok izlaganje AgNO₃ nije izazvalo promjene u aktivnosti CAT, ali je smanjilo aktivnost enzima APX. U radu Peharec Štefanić i sur. (2018) oksidacijski stres zabilježen je nakon izlaganja klijanca duhana svim ispitanim koncentracijama AgNO₃, dok je AgNP rezultirao oštećenjima biološki važnih molekula samo u najvećoj ispitanoj koncentraciji. Nadalje, u istom radu izmjerena je povećana aktivnost enzima SOD i APX nakon izlaganja tretmanima s AgNP, dok je enzim PPX pokazao smanjenje aktivnosti, a promjena u aktivnosti CAT nije bilo. Ipak, kada su isti tretmani s AgNP ispitani na odraslim biljkama duhana, oksidacijski stres nije zabilježen, a enzimi SOD i PPX nisu pokazali promjene aktivnosti (Cvjetko i sur. 2018); s druge strane aktivnost enzima APX bila je smanjena, a CAT povećana, što pokazuje da je toksičnost AgNP ovisna o starosti biljke. U oba rada veće promjene u aktivnosti antioksidacijskih enzima zabilježene su nakon tretmana klijanaca i odraslih biljaka duhana s AgNO₃ u usporedbi s istim koncentracijama AgNP (Cvjetko i sur. 2018, Peharec Štefanić i sur. 2018), što ukazuje na to da se toksičnost AgNP ne može pripisati isključivo disocijaciji iona Ag⁺ s AgNP.



Slika 4. Shematski prikazana ilustracija interakcije biljaka i AgNP. Preuzeto iz rada Tkalec i sur. (2019).

1.4. Modelni organizam

Duhan (*Nicotiana tabacum* L.) je jednogodišnja, zeljasta biljka koja se ubraja u porodicu pomoćnica (*Solanaceae*). Koristi se u komercijalne svrhe kao poljodjelski proizvod. Osušeni listovi ove biljke koriste se za žvakanje i pušenje. Listovi duhana sadržavaju alkaloid nikotin koji se sintetizira u korijenu biljke, a djeluje stimulatивно na središnji živčani sustav te izaziva ovisnost. Konzumacija duhana uzrokuje kronične opstruktivne plućne bolesti koje dovode do kroničnog bronhitisa, emfizema pluća, pojave karcinoma i smrti. Duhan ne predstavlja zdravstveni problem samo pušačima već i pasivnim pušačima te nerođenoj djeci čije majke konzumiraju duhan (Devereux 2006).

Duhan se vrlo često upotrebljava i kao modelni organizam u znanstvenim istraživanjima u biljnoj staničnoj biologiji, kulturi tkiva, molekularnoj biologiji te genetičkom inženjerstvu zbog jednostavnosti uzgoja, kratkog životnoga vijeka te mogućnosti lake transformacije (Flick i sur. 1984, Brar i sur. 1994). Istraživanja na duhanu intenzivno su provodila dva znanstvenika, Murashige i Skoog (1962). Njihov rad omogućio je definiciju i karakterizaciju hranjive podloge za uzgoj biljaka u uvjetima *in vitro*, što je dovelo do značajnog povećanja istraživanja rasta, razvoja te diferencijacije biljaka koje rezultiraju razvojem mikropropagacijskih metoda te metoda oplemenjivanja biljaka (Ganapathi 2004).

1.5. Cilj istraživanja

Svojstva AgNP i proizvoda koji ih sadrže jasno ukazuju na njihovu široku primjenu i veliki tržišni potencijal, no svaka nova tehnika sa sobom donosi i nove rizike. Uvođenjem AgNP u industriju potrebno je provesti procjenu sigurnosti i nedvojbeno razumjeti utjecaj tvari na okoliš i ljudsko zdravlje. Ovo istraživanje usmjereno je na ispitivanje toksičnosti 100 μM AgNO₃ i AgNP stabiliziranih s omotačima PVP (AgNP-PVP) i CTAB (AgNP-CTAB), samih te u kombinaciji s 500 μM cisteinom, poznatim kelatorom Ag⁺ iona na klijance duhana. Cilj istraživanja bio je odrediti stabilnost navedenih kombinacija AgNP i AgNO₃ u hranjivoj podlozi 1/2 MS te ispitati uzrokuju li navedeni tretmani razlike u ekspresiji topivih proteina te aktivnosti i ekspresiji enzima antioksidacijskoga sustava (SOD, CAT, APX, PPX). Također, istraživanjem sam pokušala utvrditi kako omotači PVP i CTAB te dodatak cisteina utječu na stabilnost AgNP u hranjivoj podlozi te izazivaju li takve modifikacije različit odgovor klijanaca duhana. Usporedni tretman AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, samih i u kombinaciji s cisteinom, razjasnit će potječe li toksičnost AgNP od samih nanočestica ili od iona Ag⁺ koji se s njih otpuštaju.

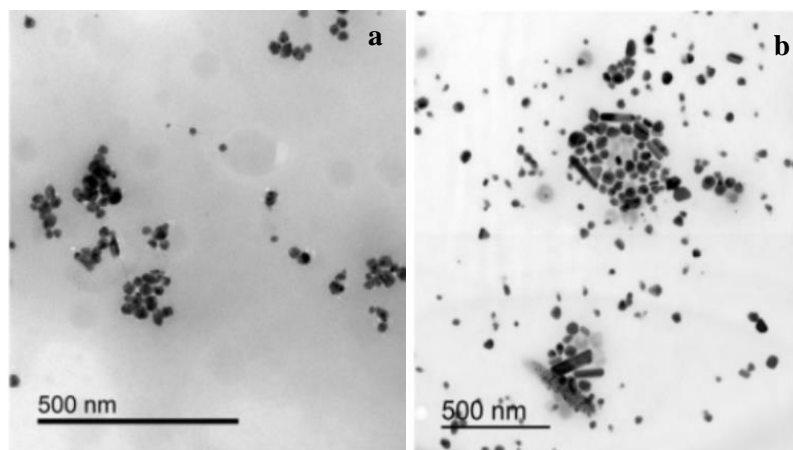
MATERIJALI I METODE

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. AgNP

Za provedbu eksperimenta koristila sam 100 μM AgNO_3 te jednaku koncentraciju laboratorijski sintetiziranih AgNP-PVP i AgNP-CTAB (Daniel Mark Lyons, Institut Ruđer Bošković) te njihovu kombinaciju s cisteinom koncentracije 500 μM . Različito stabilizirane AgNP (Slika 5) sintetizirane su prema protokolu Biba i sur. (2020) te su im određene osnovne karakteristike. Veličina većine AgNP iznosila je oko 50 nm te je prevladavao sferični oblik. Naboj AgNP-PVP iznosio je $-1,0 \pm 0,6$ mV, a koncentracija stock otopine 0,973 mM, dok je naboj AgNP-CTAB iznosio $11,4 \pm 1,1$ mV, a koncentracija stock otopine 0,7694 mM.



Slika 5. AgNP stabilizirane a) polivinilpirolidonom, AgNP-PVP i b) cetiltrimetilamonijevim bromidom, AgNP-CTAB. Fotografije su snimljene transmisijskim elektronskim mikroskopom. Preuzeto iz rada Biba i sur. (2020).

2.1.2. Biljni materijal

Pripremila sam hranjivu podlogu Murashige i Skoog s polovičnom koncentracijom makroelemenata, $\frac{1}{2}$ MS (Murashige i Skooge 1962) (Tablica 1). Pripremljenu podlogu razdijelila sam u tikvice, zatvorila vatom i aluminijskom folijom te sterilizirala u autoklavu (Bari, Hrvatska).

Tablica 1. Sastav hranjive podloge MS s polovičnom ($\frac{1}{2}$ MS) koncentracijom makroelemenata.

Sastojci	$\frac{1}{2}$ MS
Saharoza	7,5 g
Pufer MES (Sigma, Njemačka)	0,250 g
Mioinozitol (Sigma, Njemačka)	0,05 g
B1	50 μ L
Makroelementi ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2EDTA , $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NH_4NO_3 , KNO_3)	2,5 mL
Makroelement (FeSO_4)	1,25 mL
Mikroelementi (H_3BO_3 , $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, KI , $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)	500 μ L
pH	5,6
deH ₂ O	do 500 mL

Sjemenke duhana sterilizirala sam inkubacijom u 50%-tnoj otopini natrijeva hipoklorita (Gram-mol, Hrvatska) na miješalici (Kartell Labware, Australija) u trajanju od 15 minuta. Daljnje radnje provela sam unutar laminara (Heraeus, Njemačka). Sjemenke duhana tri puta sam isprala destiliranom vodom te u konačnici nasadila na pripremljenu hranjivu podlogu. Sjemenke sam ostavila da rastu u biljnoj komori u sljedećim uvjetima: temperatura 24 ± 1 °C, intenzitet svjetlosti $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, ciklus dana i noći 16/8 sati na tresilici (Koncept media, Hrvatska) pri 100 rpm okretaja u trajanju od tri tjedna (Slika 6). Kako bih postigla $100 \mu\text{M}$ koncentraciju AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ (Sigma, Njemačka) te $500 \mu\text{M}$ koncentraciju cisteina (Sigma, Njemačka) pripremila sam radne otopine potrebne za pojedini tretman i u njih postavila klijance. Nakon 7 dana tretmana, uzorkovala sam cjelokupne klijance te ih koristila za daljnje analize.



Slika 6. Prikaz rasta klijanaca u odgovarajućim uvjetima u biljnoj komori. Fotografirala Lucija Kotarski.

Za sve analize korišteni su netretirani klijanci (kontrola), klijanci tretirani sa 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB ili AgNO₃ te klijanci tretirani sa 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB ili AgNO₃ uz dodatak 500 μM cisteina.

2.2. Metode

2.2.1. Mjerenje stabilnosti AgNP u hranjivoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS

U UV-kiveti pripremila sam po 1 mL 100 μM otopine AgNP-PVP, AgNP-CTAB, AgNO₃ te njihovih kombinacija s cisteinom u hranjivoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS i u redestiliranoj vodi. Stabilnost pripremljenih AgNP i AgNO₃ mjerila sam 7 dana UV-Vis spektrofotometrom (Analytik Jena, Njemačka). Svakoj otopini mjerila sam spektar u rasponu od 300 do 800 nm u nultoj minuti, 1., 5., 10., 20., 30. minuti, nakon 1, 2, 3 i 4 h te nakon 2., 3., 4., 5., 6. i 7. dana. Po završetku svakog mjerenja UV-kivete sam prekrila parafilmom kako ne bi došlo do sušenja podloge te ih pohranila u komori u istim uvjetima u kojima su rasli i klijanci duhana. Dobivene podatke analizirala sam računalnim programom Microsoft Excel.

2.2.2. Ekstrakcija topivih proteina

Na svježe tkivo klijanaca duhana, približne mase 450 mg, dodala sam polivinilpirolidon (Sigma, Njemačka) približne mase 15 mg. Tkivo sam usitnila uz dodatak tekućeg dušika u hladnom tarioniku. Pripremila sam 1 M K₂HPO₄ otapanjem 8,709 g K₂HPO₄ (Kemika, Hrvatska) u 50 mL redestilirane vode te 1 M KH₂PO₄ (Kemika, Hrvatska) otapanjem 6,804 g KH₂PO₄ u 50 mL redestilirane vode. U praškasti uzorak postepeno sam dodavala po 1 mL hladnog 0,1 M kalij-fosfatnog pufera, pH 7,0. Za pripremu 100 mL navedenog pufera koristila sam 6,15 mL 1 M K₂HPO₄ i 3,85 mL 1 M KH₂PO₄ te nadopunila destiliranom vodom do zadanog volumena. Homogenizirano tkivo prebacila sam u tubice (Eppendorf, Njemačka) te

centrifugirala (Eppendorf, Njemačka) u trajanju od 15 minuta, na 14 000 rpm, pri temperaturi od 4 °C. Dobiveni supernatant dekantirala sam u čisti set tubica te ponovno centrifugirala u trajanju od 45 min, na 14 000 rpm, pri temperaturi od 4 °C. Dobiveni supernatant dekantirala sam u čisti set tubica. Ukupno je napravljeno 6 replika svakog tretmana koje sam pohranila na -20 °C te koristila za sljedeće analize: razdvajanje topivih proteina natrijevom dodecil sulfat - poliakrilamid gel elektroforezom (engl. *sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE), razdvajanje proteina poliakrilamidnom gel elektroforezom u nativnim uvjetima, određivanje aktivnosti enzima na gelu, spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima i imunokemijsku detekciju proteina na membrani.

2.2.3. Određivanje koncentracije topivih proteina

Za potrebe daljnjih eksperimenata spektrofotometrijski sam odredila koncentraciju topivih proteina metodom po Bradfordu (1976) na valnoj duljini od 595 nm. Metoda se temelji na reakciji vezanja boje *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 na proteine, zbog čega dolazi do pojave plavog obojenja čiji je intenzitet proporcionalan koncentraciji proteina u uzorku.

Pripremila sam Bradford matičnu otopinu sastava: 0,01% CBB G-250 (Sigma, Njemačka); 31,35% (v/v) etanol (Kefo, Hrvatska); 58,6% (v/v) H₃PO₄ (T.T.T., Hrvatska) te Bradford radnu otopinu sastava: 2,58% (v/v) etanol; 5,28% (v/v) H₃PO₄ i 6% (v/v) Bradford matična otopina. Za određivanje koncentracije topivih proteina pripremila sam baždarni pravac izradom niza razrjeđenja matične otopine goveđeg serumskog albumina (engl. *bovine serum albumin*, BSA) (Sigma, Njemačka). Pripremila sam niz razrjeđenja (0,1 – 1,0 mg mL⁻¹) u otopini 0,1 M kalij-fosfatnog pufera, pH 7,0. U zasebnu tubicu dodala sam 1 mL Bradford radne otopine i 20 µL pojedinog razrjeđenja. Sadržaj tubice promiješala sam na vorteks mješalici (Ika, Njemačka) te inkubirala 10 minuta u mraku. Svako razrjeđenje mjerila sam u dvjema tehničkim replikama. Na jednak način mjerila sam i uzorke, miješanjem 1 mL Bradford radne otopine i 20 µL pojedinog uzorka, također u dvjema tehničkim replikama. Sadržaj tubice prebacila sam u kivete, izmjerila apsorbanciju pojedinog uzorka te na temelju baždarnog pravca odredila koncentraciju uzorka koju sam izrazila kao mg mL⁻¹ otopine.

2.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima

2.2.4.1. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima SOD

Mjerenje aktivnosti enzima SOD provela sam prema protokolu Beauchamp i Fridovich (1971). Pripremila sam otopine potrebne za mjerenje slijepe probe, mjerenje maksimuma apsorbancije neinhibirane kontrole koja sadržava O^{2-} , ali ne i SOD, mjerenje uzoraka proteinskih ekstrakata te razrjeđenja standarda enzima SOD potrebnih za izradu baždarnе krivulje. Sva su mjerenja bila provedena na valnoj duljini od 560 nm. Za potrebe mjerenja slijepe probe pomiješala sam 800 μL reakcijske smjese (13 mM metionin; Sigma, Njemačka); 75 μM nitro plavi tetrazolij (engl. *nitroblue tetrazolium*, NBT; Alfa Aesar, SAD) i 0,1 M etilendiaminetetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA; T.T.T., Hrvatska) otopljeni u 200 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera, pH 7,8), 190 μL 50 mM kalij-fosfatnog pufera, pH 7,8 te 10 μL 1 mM riboflavina (Sigma, Njemačka). Navedenu otopinu nisam izložila izvoru enzima SOD niti svjetlosti transiluminatora, zbog čega nije došlo do produkcije O^{2-} . Jednaku otopinu priredila sam i za mjerenje maksimuma produkcije O^{2-} koji se na svjetlosti generiraju redukcijom iz riboflavina. Superoksidni anioni reduciraju NBT u netopivi plavo obojeni produkt, formazan, čiju sam apsorbanciju mjerila. Po 6 replika navedene otopine izložila sam djelovanju svjetlosti transiluminatora (15 W) u trajanju od 8 minuta te zatim izmjerila njihovu apsorbanciju. Očekivane vrijednosti mjerenja apsorbancije iznose 0,5. Ukoliko nakon prvog mjerenja nisu dobivene približno takve vrijednosti, potrebno je izmijeniti odnose volumena riboflavina i kalij-fosfatnog pufera. Apsorpcijski maksimum neinhibirane kontrole potrebno je mjeriti iz razloga što se u navedenoj otopini ne otapa sav riboflavin. Za potrebe mjerenja kontrolnih uzoraka, uzimaju se jednaki volumeni reaktanata kao volumeni uzeti prilikom dobivanja zadovoljavajućih vrijednosti mjerenja maksimuma asorbancije neinhibirane kontrole, uz proporcionalno smanjenje volumena kalij-fosfatnog pufera za volumen dodanog uzorka. Vrijednosti mjerenja apsorbancije kontrolnih uzoraka trebaju prikazati smanjenje apsorbancije od 50% u odnosu na apsorpcijski maksimum neinhibirane kontrole. Identičan postupak mjerenja provela sam sa svim uzorcima te sa serijom razrjeđenja SOD standarda poznatih aktivnosti u rasponu od 0,025 do 1 U μL^{-1} . Za izračun aktivnosti SOD u pojedinom uzorku izradila sam baždarnu krivulju na temelju izmjerenih apsorbancija SOD standarda. Dobivene rezultate, mjerenja apsorbancije SOD standarda te promatranih uzoraka, linearizirala sam tako da sam vrijednost maksimalne apsorbancije neinhibirane kontrole podijelila s apsorbancijom dobivenom za pojedine uzorke i SOD standarde. Specifičnu aktivnost enzima SOD prikazala sam kao srednju vrijednost 6 replika \pm standardna pogreška,

a izrazila kao $U \text{ mg}^{-1}$ proteina gdje je 1 U definirana kao količina enzima SOD potrebna za stvaranje 50% inhibicije redukcije NBT u formazan.

2.2.4.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima CAT

Mjerenje aktivnosti enzima CAT provela sam prema protokolu Aebi (1984). Metoda se temelji na mjerenju pada apsorbancije uslijed trošenja H_2O_2 u ovisnosti o vremenu. Pripremila sam reakcijsku smjesu dodatkom 51 μL H_2O_2 (Gram-mol, Hrvatska) u 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera, pH 7,0. Za potrebe mjerenja slijepe probe pomiješala sam 970 μL reakcijske smjese s 30 μL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera, pH 7,0, a za mjerenje aktivnosti enzima CAT svakog pojedinačnog uzorka pomiješala sam 970 μL reakcijske smjese s 30 μL proteinskog ekstrakta. Aktivnost enzima CAT mjerila sam u UV-kivetama na 290 nm svakih 10 sekundi tijekom 1 minute. Rezultat sam prikazala kao srednju vrijednost 6 replika \pm standardna pogreška, a izračunala prema jednadžbi:

Aktivnost CAT

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

Specifična aktivnost CAT

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

Oznake:

$\Delta A(\text{s.v.})$ – srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 240 nm tijekom 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 (0,03 mL)

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

l – duljina optičkog puta (1 cm)

y – masena koncentracija proteina (mg mL^{-1})

Specifičnu aktivnost enzima CAT izrazila sam kao količinu utrošenog produkta, H_2O_2 , u mol min^{-1} po mg proteina.

2.2.4.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima APX

Mjerenje specifične aktivnosti enzima APX provela sam prema protokolu Nakano i Asada (1981). Metoda se temelji na mjerenju pada apsorbancije kao posljedice oksidacije askorbinske kiseline u ovisnosti o vremenu. Za potrebe mjerenja pripremila sam 10 mM EDTA; 50 mM kalij-fosfatni pufer, pH 7,0; 12 mM H₂O₂; 10 mM askorbinsku kiselinu (Sigma, Njemačka) te pufer 1 pripremljen dodatkom 500 μL 10 mM EDTA u 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera, pH 7,0. Pripremila sam smjesu za mjerenje slijedeće potrebe miješanjem 800 μL pufera 1; 180 μL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera; pH 7,0; 10 μL 10 mM askorbinske kiseline i 10 μL 12 mM H₂O₂. Za mjerenje aktivnosti enzima APX za svaki pojedinačni uzorak pomiješala sam 800 μL pufera 1, 180 μL proteinskog ekstrakta, 10 μL 10 mM askorbinske kiseline i 10 μL 12 mM H₂O₂. Mjerenje je provedeno u UV-kivetama na valnoj duljini od 290 nm svakih 15 sekundi tijekom 1 minute. Rezultat sam prikazala kao srednju vrijednost 6 replika ± standardna pogreška, a izračunala prema jednadžbi:

Aktivnost APX

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

Specifična aktivnost APX

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

Oznake:

$\Delta A(s.v.)$ – srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 290 nm tijekom 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 mM⁻¹ cm⁻¹)

l – duljina optičkog puta (1 cm)

y – masena koncentracija proteina (mg mL⁻¹)

Specifičnu aktivnost enzima APX izrazila sam kao količinu nastalog produkta, monodihidroaskorbata, u mol min⁻¹ po mg proteina.

2.2.4.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima PPX

Mjerenje aktivnosti enzima PPX provela sam prema protokolu Nakano i Asada (1981). Metoda se temelji na mjerenju pada apsorbancije kao posljedice oksidacije pirogalola u ovisnosti o vremenu. Pripremila sam reakcijsku smjesu otapanjem 0,126 g pirogalola (Sigma, Njemačka) u 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera, pH 7,0 te dodatkom 5,5 μL H_2O_2 neposredno prije korištenja reakcijske smjese. Za potrebe mjerenja slijepe probe pomiješala sam 980 μL reakcijske smjese s 20 μL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera, pH 7,0, a za mjerenje aktivnosti PPX svakog pojedinačnog uzorka pomiješala sam 980 μL reakcijske smjese s 20 μL proteinskog ekstrakta. Mjerenja su napravljena u kivetama na 430 nm svakih 15 sekundi tijekom 2 minute. Rezultat sam prikazala kao srednju vrijednost 6 replika \pm standardna pogreška, a izračunala prema jednadžbi:

Aktivnost PPX

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

Specifična aktivnost PPX

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

Oznake:

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

4 – 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 (0,02 mL)

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

l – duljina optičkog puta (1 cm)

γ – masena koncentracija proteina (mg mL^{-1})

Specifičnu aktivnost enzima PPX izrazila sam kao količinu nastalog produkta, purpurogalina, u mol min^{-1} po mg proteina.

2.2.5. Razdvajanje proteina poliakrilamidnom gel elektroforezom u nativnim uvjetima

Poliakrilamidnom gel elektroforezom u nativnim uvjetima moguće je razdvajati proteine kojima je sačuvana nativna struktura, tj. očuvane su sve interakcije između proteinskih podjedinica, što omogućava analizu biološke aktivnosti proteina (Balen i sur. 2011). Navedenu metodu koristila sam za analizu aktivnosti izoformi pojedinih enzima na gelu.

Nativnu elektroforezu provela sam prema protokolu opisanom u Balen i sur. (2011). Staklene ploče potrebne za izradu gelova prebrisala sam s 96%-tnim etanolom te ih pričvrstila na držač (BioRad, SAD). Pripremila sam otopine za donji gel prema sastavu prikazanom u Tablici 2. te na izliveni gel dodala nekoliko kapi 20%-tnog etanola s dodatkom boje bromfenol plavo (Sigma, Njemačka). Nakon uspješne polimerizacije donjeg gela, isprala sam ga s destiliranom vodom te izlila i gornji gel prema sastavu prikazanom u Tablici 2. Povrh gornjeg gela namjestila sam češljice (BioRad, SAD) radi formiranja jažica. Po završetku polimerizacije, staklene ploče sam pričvrstila na elektrodni nosač (BioRad, SAD) kojeg sam postavila u kadnicu (BioRad, SAD) u kojoj se nalazio elektrodni pufer sastava 0,25 M Tris (Sigma, Njemačka) i 1,92 M glicin (Sigma, Njemačka). Uzorke sam pomiješala s 0,5%-tnom otopinom boje bromfenol plavo važne radi lakšeg praćenja fronte uzorka u gelu i saharoze (Gram-mol, Hrvatska) koja povećava gustoću uzoraka i osigurava zadržavanje uzoraka na dnu jažice gela. Na gel sam nanosila 90 µg proteina po pojedinom uzorku. Elektroforezu sam provela u sustavu *PROTEAN® II xi Cell* (Bio-Rad, SAD) prvih 45 minuta pri 100 V, te do kraja elektroforeze (približno 5 h) pri 220 V. Po završetku elektroforeze, svaki gel sam pojedinačno tretirala prema protokolu za detekciju aktivnosti izoformi specifičnog enzima. Intenzitet vrpce pojedinih izoformi enzima analizirala sam računalnim programom *Image J* (National Institutes of Health, SAD).

Tablica 2. Sastav gela za elektroforezu u nativnim uvjetima.

	Donji gel, gel za razdvajanje (12%)	Gornji gel, gel za koncentriranje (4%)
Destilirana voda	21 mL	9,15 mL
Tris/HCl (1,5 M pH 8,8 za donji, 0,5 M pH 6,8 za gornji gel)	15 mL	3,75 mL
Akrlamid/bisakrlamid (AA/Bis) (Sigma, Njemačka)	24 mL	1,95 mL
vakuum		
10% amonijev peroksodisulfat (APS) (Gram-mol, Hrvatska)	300 μ L	100 μ L
Tetrametiletilendiamin (TEMED) (Sigma, Njemačka)	25 μ L	15 μ L

2.2.6. Određivanje aktivnosti i broja izoformi enzima na gelu

2.2.6.1. Određivanje aktivnosti i broja izoformi enzima SOD

Nakon razdvajanja proteina elektroforezom u nativnim uvjetima, gel sam tretirala prema protokolu Beauchamp i Fridovich (1971). Gel sam 25 minuta inkubirala u 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera, pH 7,8 s dodatkom 0,1 g NBT. Zatim sam gel inkubirala u mraku, u otopini 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera, pH 7,8 uz dodatak 100 μ L 2 mM riboflavina i 425 μ L TEMED-a, u trajanju od 15 minuta, nakon čega sam ga izložila djelovanju svjetlosti transiluminatora do pojave bijelih vrpca na ljubičastoj pozadini. Gel sam isprala u destiliranoj vodi i skenirala (Epson perfection V700 photo, UK).

2.2.6.2. Određivanje aktivnosti i broja izoformi enzima CAT

Proteine sam razdvojila elektroforezom u nativnim uvjetima, a gel tretirala prema protokolu Woodbury i sur. (1971). Dobiveni gel isprala sam u destiliranoj vodi u trajanju od 15 minuta. Postupak sam ponovila tri puta te sam zatim gel inkubirala 10 minuta u otopini 100 mL destilirane vode i 102 μ L H₂O₂, nakon čega sam ga kratko isprala u destiliranoj vodi te inkubirala 1 h u mješavini dviju otopina soli željeza. Jednu otopinu pripremila sam otapanjem 0,5 g K₃Fe(CN)₆ (Alfa Aesar, SAD) u 50 mL destilirane vode, a drugu otapanjem 0,5 g FeCl₃ (Carlo Erba, Francuska) u 50 mL destilirane vode. Dobiveni gel zelene pozadine sa žutim vrpcama sam skenirala.

2.2.6.3. Određivanje aktivnosti i broja izoformi enzima APX

Nakon razdvajanja proteina elektroforezom u nativnim uvjetima uz dodatak 1,761 g askorbinske kiseline u 5 L pufera za nativnu elektroforezu, gel sam tretirala prema protokolu Mittler i Zilinkas (1993). Pripremila sam 300 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera, pH 7,0 s dodatkom 0,106 g askorbinske kiseline. Navedenu otopinu razdijelila sam na tri dijela te koristila za tri uzastopne inkubacije gela u trajanju od 10 minuta. Gel sam zatim inkubirala 20 minuta u prethodno pripremljenoj otopini 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera, pH 7,0 uz dodatak 0,07 g askorbinske kiseline te 41 μL H_2O_2 . Po završetku inkubacije gel sam isprala u 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera, pH 7,0 u trajanju od jedne minute te inkubirala 10 do 15 minuta u otopini 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera, pH 7,8 uz dodatak 0,035 g NBT-a te 215 μL TEMED-a. Dobiveni gel plavoljubičaste pozadine s vidljivim bijelim vrpčama sam skenirala.

2.2.6.4. Određivanje aktivnosti i broja izoformi enzima PPX

Proteine sam razdvojila elektroforezom u nativnim uvjetima, a gel tretirala prema protokolu Chance i Maehly (1955). Gel sam prvo inkubirala 30 minuta u 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera, pH 7,0, a zatim u otopini 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera, pH 7,0 uz dodatak 0,252 g pirogalola i 40 μL H_2O_2 u maksimalnom trajanju od 20 minuta. Po pojavi smeđih vrpki na žutoj pozadini gel sam odmah skenirala jer brzo dolazi do gubitka obojenja proteinskih vrpki.

2.2.7. Razdvajanje topivih proteina SDS-PAG elektroforezom i vizualizacija proteina

Često korištena metoda za razdvajanje topivih proteina je SDS-PAGE. Zahvaljujući djelovanju deterdženta SDS-a, razaraju se disulfidne veze te se otapa, denaturira i disocira većina proteina u pojedinačne polipeptidne lance. Nastali kompleksi SDS-proteini imaju ujednačenu gustoću naboja što osigurava elektroforetsko razdvajanje proteina ovisno o relativnoj molekularnoj masi (Balen 2016). Navedenu metodu koristila sam za analizu ekspresije proteina imunokemijskom detekcijom proteina na membrani te kao metodu koja prethodi bojanju gelova bojom *Coomassie Brilliant Blue* i srebrovim nitratom radi vizualizacije dobivenih vrpki.

2.2.7.1. SDS-PAG elektroforeza

SDS-PAG elektroforezu provela sam prema protokolu po Laemmli-u (Laemmli 1970). Staklene ploče potrebne za izradu gelova prebrisala sam s 96%-tnim etanolom kako bih uklonila potencijalne nečistoće te ih pričvrstila u držač. Pripremila sam otopine za donji gel prema sastavu prikazanom u Tablici 3. te na izliveni gel dodala nekoliko kapi 20%-tnog etanola s dodatkom boje bromfenol plavo radi sprječavanja kontakta gela s kisikom koji djeluje kao inhibitor polimerizacije. Nakon uspješne polimerizacije donjeg gela, isprala sam ga s destiliranom vodom te izlila i gornji gel prema sastavu prikazanom u Tablici 3. Povrh gornjeg gela namjestila sam češljice radi formiranja jažica. Po završetku polimerizacije staklene ploče sam pričvrstila na elektrodni nosač (BioRad, SAD) kojeg sam postavila u kadu (BioRad, SAD) u kojoj se nalazio elektrodni pufer sastava: 0,25 M Tris; 1,92 M glicin i 10% (w/v) SDS (Sigma, Njemačka). Prije nanošenja uzoraka na gel, u svim uzorcima ujednačila sam koncentraciju proteina dodatkom odgovarajućeg volumena pufera za denaturaciju na 100 μ L uzorka, pazeći da zadržim omjer pufera za denaturaciju i uzorka minimalno 4:1. Pufer za denaturaciju sadržavao je 125 mM Tris pH 6,8; 4% (w/v) SDS; 10% (v/v) β -merkaptotanol (Alfa Aesar, SAD); 32% (v/v) glicerol (Kemika, Hrvatska) te oko 100 μ L 0,5% boje bromfenol plavo. Denaturaciju proteina provela sam zagrijavanjem uzoraka u termobloku (Eppendorf, Njemačka) pet minuta na 95 °C te nanijela odgovarajuće volumene uzoraka na gel. U prvu jažicu svakog gela nanijela sam 2 μ L biljega molekulskih masa ColorBURST™ *Electrophoresis Marker* (Sigma-Aldrich, Njemačka). Za potrebe bojanja gela bojom *Coomassie Brilliant Blue* te za metodu imunokemijske detekcije proteina na membrani u svaku jažicu nanosila sam 12 μ g pojedinog proteinskog ekstrakta, dok sam za potrebe bojanja gela srebrovim nitratom nanosila 8 μ g pojedinog proteinskog ekstrakta. Elektroforezu sam provela u sustavu *Mini-PROTEAN® II Cell* (Bio-Rad, SAD) prvih 15 minuta pri 100 V, te do kraja (približno 45 minuta) elektroforeze pri 180 V.

Tablica 3. Sastav gela za SDS-PAG elektroforezu.

	Donji gel, gel za razdvajanje (12%)	Gornji gel, gel za koncentriranje (4%)
Redestilirana voda	3,35 mL	3,05 mL
Tris/HCl (1,5 M pH 8,8 za donji, 0,5 M pH 6,8 za gornji gel)	2,5 mL	1,25 mL
(AA/Bis)	4 mL	665 µL
vakuum		
10% SDS	100 µL	50 µL
10% APS	50 µL	35 µL
TEMED	5 µL	8 µL

2.2.7.2. Bojanje gelova bojom *Coomassie Brilliant Blue*

Bojanje gelova bojom *Coomassie Brilliant Blue* provela sam prema metodi Balen i sur. (2011). Pripremila sam otopinu za bojanje sljedećeg sastava: 0,1% (w/v) CBB R-250 (Sigma, Njemačka); 45% (v/v) metanol (Lach-Ner, Hrvatska); 10% (v/v) ledena octena kiselina (Avantor, SAD) i redestilirana voda do ukupnog volumena od 100 mL i prije korištenja je profiltrirala. Po završetku elektroforeze gel sam inkubirala 1 h u navedenoj otopini na tresilici (Koncept media, Hrvatska) pri sobnoj temperaturi. Za odbojavanje sam pripremila otopinu sljedećeg sastava: 10% (v/v) octena kiselina; 20% (v/v) metanol i destilirana voda do ukupnog volumena od 1 L. Gel sam ostavila u navedenoj otopini tijekom noći na tresilici pri sobnoj temperaturi. Otopinu za odbojavanje zamijenila sam nekoliko puta sve dok se u potpunosti nije odbojala pozadina gela, nakon čega sam gel skenirala.

2.2.7.3. Bojanje gelova srebrovim nitratom

Bojanje gelova srebrovim nitratom provela sam prema metodi Blum i sur. (1987). Otopine koje sam koristila za bojanje gela pripremila sam neposredno prije njihova korištenja. Po završetku elektroforeze, gel sam inkubirala 1 h u fiksativu sastava: 50% etanol, 12% octena kiselina, 500 µL formaldehida (T.T.T., Hrvatska) i destilirana voda do ukupnog volumena od 1 L. Zatim sam gel isprala tri puta s 30%-tnim etanolom. Svako ispiranje trajalo je 20 minuta. Usljedila je obrada gela s neposredno pripremljenom otopinom 20 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (T.T.T., Hrvatska) u 100 mL redestilirane vode u trajanju od 1 minute te 3 nova ispiranja po 20 sekundi s redestiliranom vodom. Gel sam zatim impregnirala 20 minuta u otopini sljedećeg sastava: 200 mg AgNO_3 , 75 µL formaldehid i redestilirana voda do ukupnog volumena od 100

mL, nakon čega sam ga isprala dva puta po 20 sekundi redestiliranom vodom. Razvijanje proteinskih vrpca provela sam inkubacijom u trajanju od nekoliko minuta u otopini za razvijanje (6 g Na₂CO₃ (Kemika, Hrvatska); 50 µL formaldehida; 2 mL ranije pripremljene otopine Na₂S₂O₃). Nakon pojave smeđih vrpca, razvijanje sam zaustavila inkubacijom gela u stop otopini (50% etanol, 12% octena kiselina i destilirana voda do ukupnog volumena od 1 L). Dobiveni gel sam skenirala.

2.2.8. Imunokemijska detekcija proteina na membrani

Analiza ekspresije proteina imunokemijskom detekcijom proteina na membrani podrazumijeva nekoliko koraka: ekstrakciju proteina (poglavlje 2.2.2.), mjerenje koncentracije proteina (poglavlje 2.2.3.), SDS-PAG elektroforezu (poglavlje 2.2.7.1.), prijenos proteina na nitroceluloznu membranu te detekciju vrpca kako je opisano u Balen i sur. (2011). Prije provedbe imunokemijske detekcije proteina na membrani pripremila sam pufer za prijenos (28 mM Tris, 192 mM glicin, 10% (v/v) metanol otopljeni su u destiliranoj vodi ukupnog volumena od 1 L) te sam u njemu namočila spužvice, *Whatmann* filter papir (Sigma, Njemačka) te nitroceluloznu membranu (Sigma, Njemačka) koju sam koristila za prijenos proteina. U kazeti (Bio-Rad, SAD) sam redom složila spužvicu, *Whatmann* filter papir, nitroceluloznu membranu, gel dobiven nakon elektroforeze, *Whatmann* filter papir te spužvicu. Dobro sam istisnula mjehuriće zraka iz sustava te položila kazetu u kadicu (Bio-Rad, SAD) koja je sadržavala pufer za prijenos i led pazeći na orijentaciju kazete. Gel mora biti položen uz negativnu elektrodu, a membrana uz pozitivnu kako bi se negativno nabijeni kompleksi protein-SDS s gela mogli kretati prema membrani. Pokrenula sam prijenos u sustavu *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad, SAD) u trajanju od 60 minuta na 60 V. Po završetku prijenosa, membranu sam obojala 0,5% bojom *Rouge Ponceau* (Thermo Fisher Scientific, SAD) pripremljenoj u 1% octenoj kiselini kako bih potvrdila uspješnost prijenosa proteina s gela na membranu. Nekoliko minuta sam odbojavala membranu u destiliranoj vodi te ju dodatno odbojala dva puta po 2 minute u puferu TBS (eng. *tris-buffered saline*; 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl (Gram-mol, Hrvatska), pH 7,5). Grafitnom olovkom označila sam vrpce biljega molekulskih masa na membrani. Pripremila sam 1% (w/v) puferiranu otopinu fosfatnih soli (engl. *phosphate buffer saline*, PBS) sastava: 10 mM Na₂HPO₄ (Kemika, Hrvatska), 1,7 mM KH₂PO₄, 130 mM NaCl i 2,7 mM KCl (Kemika, Hrvatska), pH 7,4; te otopinu A (pufer PBS; 1% Tween 20 (Sigma, Njemačka); 2% (w/v) mlijeko u prahu (Gram, Italija) za antitijela anti-SOD, anti-CAT i anti-APX, odnosno 5% (w/v) mlijeko u prahu za

antitijelo anti-PPX i otopinu B (pufer PBS; 1% Tween 20). Svaku sam membranu pojedinačno inkubirala u otopini A na tresilici u trajanju od 60 minuta, nakon čega sam je inkubirala preko noći u pripremljenoj otopini odgovarajućeg primarnog antitijela u otopini A pri 4 °C (Tablica 4). Sljedeći dan sam tri puta isprala svaku membranu u odgovarajućoj 2% ili 5% otopini A u trajanju od 10 minuta te zatim 60 minuta u otopini A uz dodatak sekundarnog antitijela (Tablica 4). Membrane sam potom dva puta isprala u otopini B u trajanju od 10 minuta te na njih djelovala otopinama za kemiluminiscenciju. Za detekciju enzima SOD, CAT i APX korištena je *WesternSure Premium* otopina za detekciju (LI-COR Biotechnology, SAD), a za detekciju enzima PPX korištena je otopina *ECL Western Blotting* (Promega, SAD). Dobivene sam vrpce skenirala na uređaju LiCor (Bioscience, SAD).

Tablica 4. Primarna i sekundarna antitijela korištena za imunokemijsku detekciju proteina na membrani.

	SOD	CAT	APX	PPX
primarno antitijelo	Poliklonalno kunićje antitijelo anti-SOD (razrjeđenje 1:1000) (Agrisera, Švedska)	Poliklonalno kunićje antitijelo anti-CAT (razrjeđenje 1:1000) (Agrisera, Švedska)	Poliklonalno kunićje antitijelo anti-APX (razrjeđenje 1:1000) (Agrisera, Švedska)	Poliklonalno kunićje antitijelo anti-PPX (razrjeđenje 1:1000) (Agrisera, Švedska)
sekundarno antitijelo	Anti-kunićji IgG-HRP (razrjeđenje 1:10000) (Agrisera, Švedska)			

2.3. Analiza i statistička obrada podataka

Rezultati iz poglavlja 3.2. i 3.3. analizirani su u programu Statistica 12.5. (StatSoft, SAD) te prikazani kao srednja vrijednost 6 tehničkih replika \pm standardna pogreška. Navedeni pokusi ponovljeni su dva puta s različitim biološkim replikama. Za usporedbu podataka i utvrđivanje statistički značajne razlike koristila sam jednosmjernu analizu varijance (eng. *one-way analysis of variance*, ANOVA). Za utvrđivanje međusobne razlike između promatranih skupina koristila sam post hoc Duncan test. Statistički značajnom razlikom smatrala sam razliku $p \leq 0,05$. Statistički sam usporedila kontrolnu skupinu s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ te odnose prikazala različitim malim tiskanim slovima ukoliko su se tretmani međusobno statistički značajno razlikovali. Zatim sam usporedila kontrolnu skupinu s

tretmanima srebrom uz dodatak cisteina te odnose prikazala velikim tiskanim slovima. Također, usporedila sam i tretmane s odgovarajućom otopinom AgNP-PVP, AgNP-CTAB ili AgNO₃ te njihovom kombinacijom s cisteinom te ukoliko je postojala statistička razlika označila sam ju zvjezdicom (*).

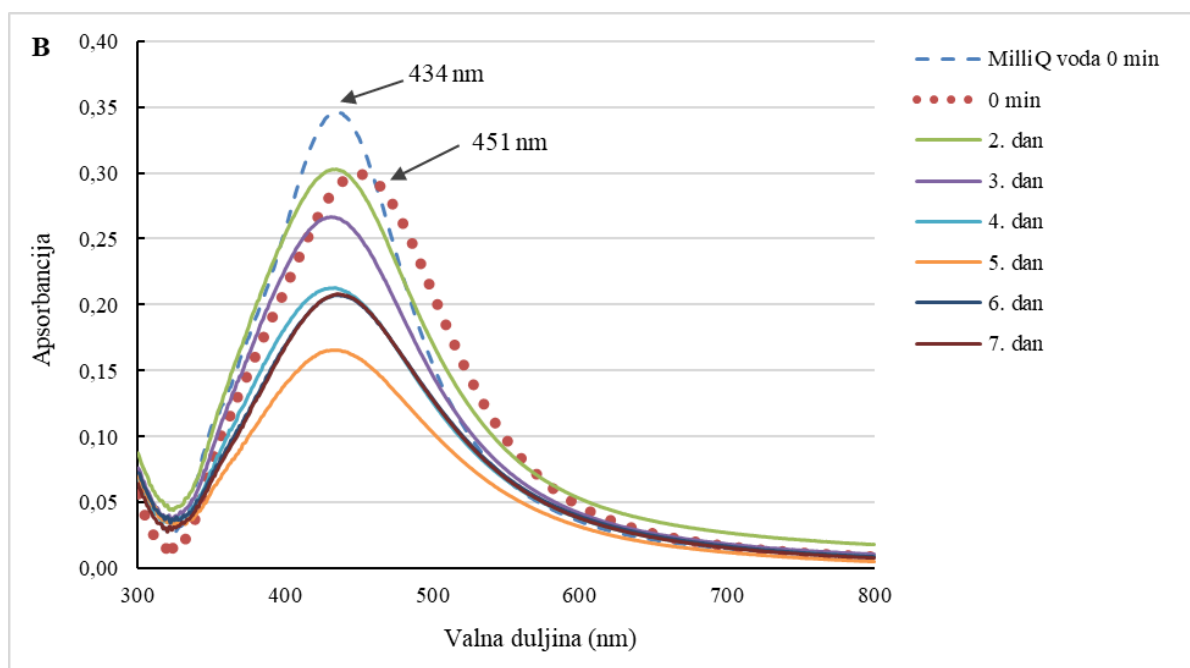
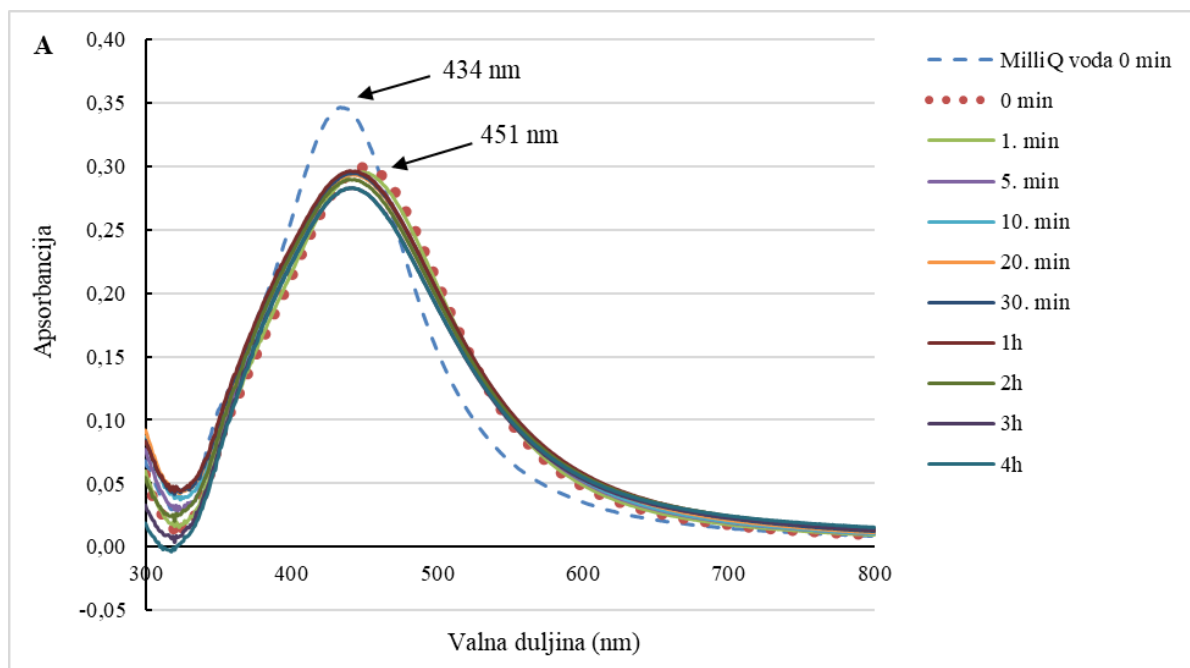
REZULTATI

3. REZULTATI

3.1. Spektrofotometrijska analiza otopina AgNP i AgNO₃ u hranjivoj podlozi ½ MS

3.1.1. Analiza otopine AgNP-PVP

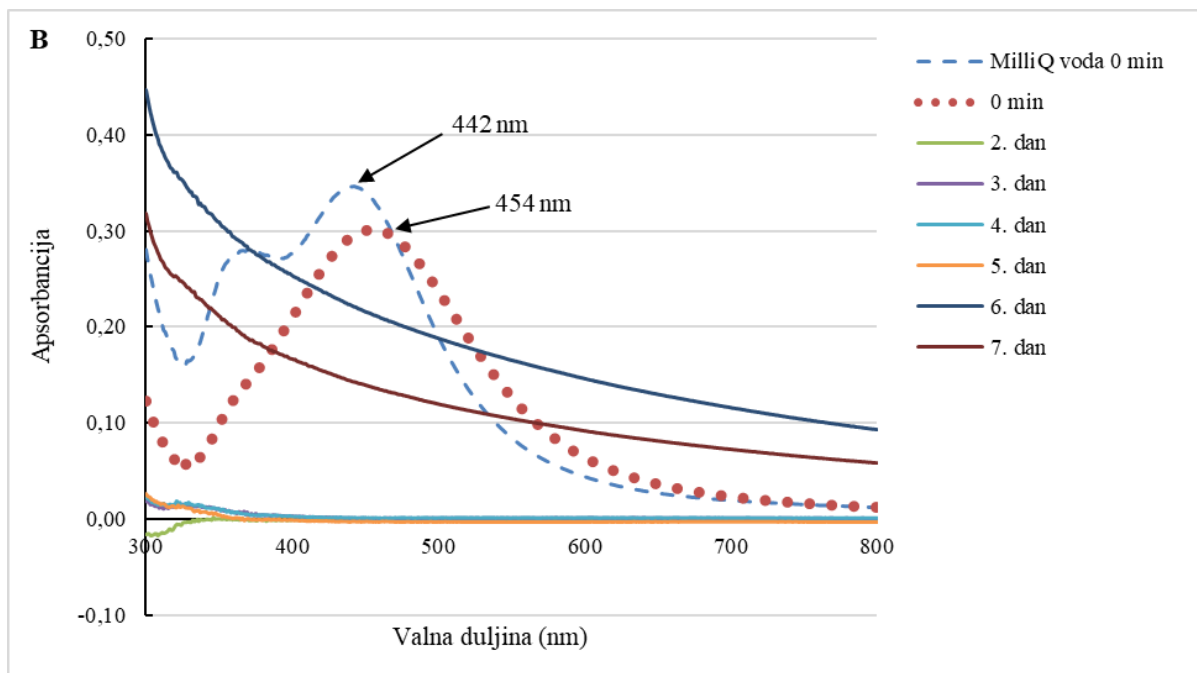
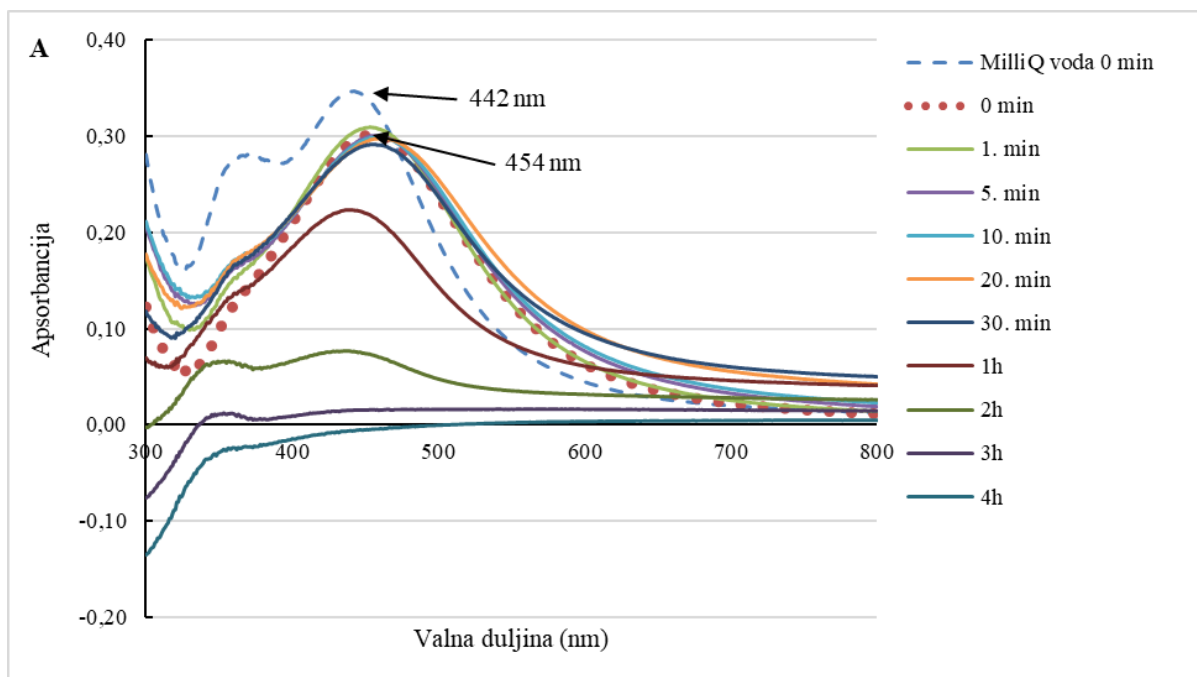
Na grafičkom prikazu (Slika 7) prikazani su rezultati analize stabilnosti 100 µM AgNP-PVP u hranjivoj podlozi ½ MS mjereni kroz vremenski period od 7 dana. U nultoj minuti analiziran je spektar AgNP-PVP u ultračistoj MilliQ vodi i dobiven je apsorpcijski maksimum na valnoj duljini od 434 nm. U hranjivoj podlozi ½ MS apsorpcijski maksimum u nultoj minuti izmjeren je na valnoj duljini od 451 nm i taj pomak prema većoj valnoj duljini ukazuje na agregaciju AgNP-PVP (Slika 7A). Uz pomak valne duljine apsorpcijskog maksimuma zabilježeno je i smanjenje apsorpcije sa 0,35 (MilliQ voda) na 0,30 (hranjiva podloga). Kroz promatrano vremensko razdoblje valna duljina apsorpcijskog maksimuma AgNP-PVP u hranjivoj podlozi samo se blago pomicala prema manjim valnim duljinama u odnosu na apsorpcijski maksimum dobiven u nultoj minuti, ali je zabilježen značajniji pad vrijednost apsorpcije, što upućuje na disocijaciju iona Ag⁺. U prvome danu apsorpcijski maksimum nanočestica ostao je gotovo nepromijenjen s minimalnom promjenom apsorpcije. Promjena je detektirana u drugom danu te se nastavila do posljednjeg dana mjerenja. Vrijednost apsorpcije počela se smanjivati u odnosu na apsorpciju izmjerenu u nultoj minuti, no pozicija apsorpcijskog maksimuma ostala je nepromijenjena (Slika 7B).



Slika 7. Apsorpcijski spektri 100 μM AgNP-PVP u hranjivoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS. Apsorbancija je mjerena u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm. A) u 0., 1., 5., 10., 20., 30. minuti te nakon 1., 2., 3., 4. sata; i B) svakodnevno od 2. do 7. dana. Za usporedbu rezultata korišten je kontrolni uzorak pripremljen u MilliQ vodi (MilliQ voda 0 min). Strelicama su označeni apsorpcijski maksimumi u nultoj minuti u MilliQ vodi i hranjivoj podlozi.

3.1.2. Analiza otopine AgNP-PVP uz dodatak cisteina

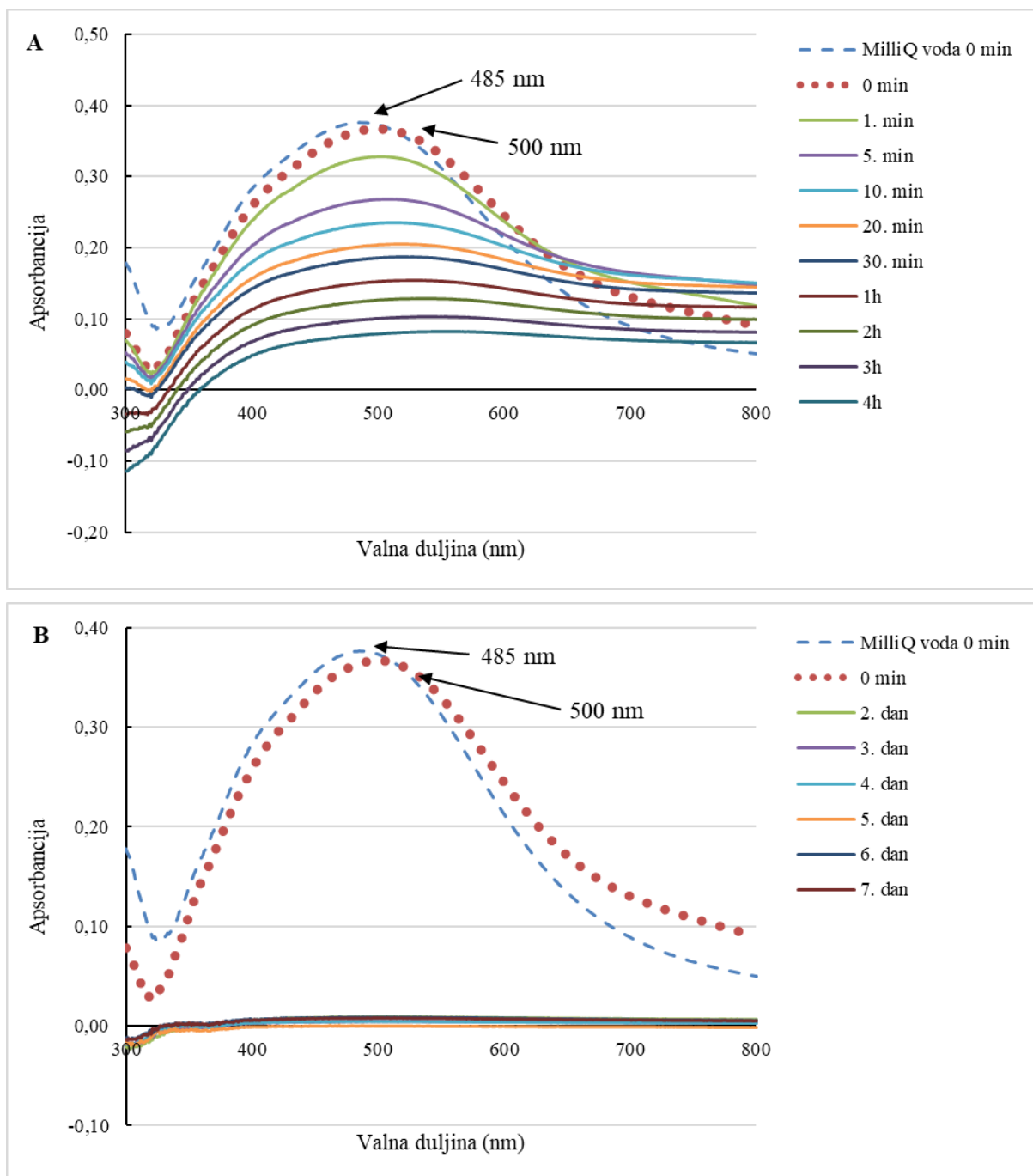
Slika 8. prikazuje rezultate analize stabilnosti 100 μM AgNP-PVP uz dodatak 500 μM cisteina u hranjivoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS kroz vremenski period od 7 dana. U nultoj minuti izmjeren je spektar AgNP u MilliQ vodi te je dobiven apsorpcijski maksimum na valnoj duljini od 442 nm i dodatni pik na valnoj duljini od 369 nm, dok je analiza hranjive podloge $\frac{1}{2}$ MS u nultoj minuti rezultirala pojavom apsorpcijskog maksimuma na valnoj duljini od 454 nm, što ukazuje na agregaciju AgNP (Slika 8A). Tijekom prvih 30 minuta mjerenja u hranjivoj podlozi nisu detektirane promjene u valnoj duljini apsorpcijskog maksimuma i apsorbanciji. Nakon jednog sata zabilježeno je smanjenje apsorbancije te kroz daljnja mjerenja postepeni nestanak apsorpcijskog maksimuma na valnoj duljini od 454 nm uz pojavu pika male apsorbancije na valnoj duljini od 359 nm, što ukazuje na proces disocijacije te mogući nastanak malih agregata (Slika 8A). Od drugog dana mjerenja na dalje nije detektiran niti jedan SPR pik, što ukazuje na potpuni raspad AgNP (Slika 8B).



Slika 8. Apsorpcijski spektri $100 \mu\text{M}$ AgNP-PVP i $500 \mu\text{M}$ cisteina u hranjivoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS. Apsorbancija je mjerena u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm. A) u 0., 1., 5., 10., 20., 30. minuti te nakon 1., 2., 3., 4. sata; i B) svakodnevno od 2. do 7. dana. Za usporedbu rezultata korišten je kontrolni uzorak pripremljen u MilliQ vodi (MilliQ voda 0 min). Strelicama su označeni apsorpcijski maksimumi u nultoj minuti u MilliQ vodi i hranjivoj podlozi.

3.1.3. Analiza otopine AgNP-CTAB

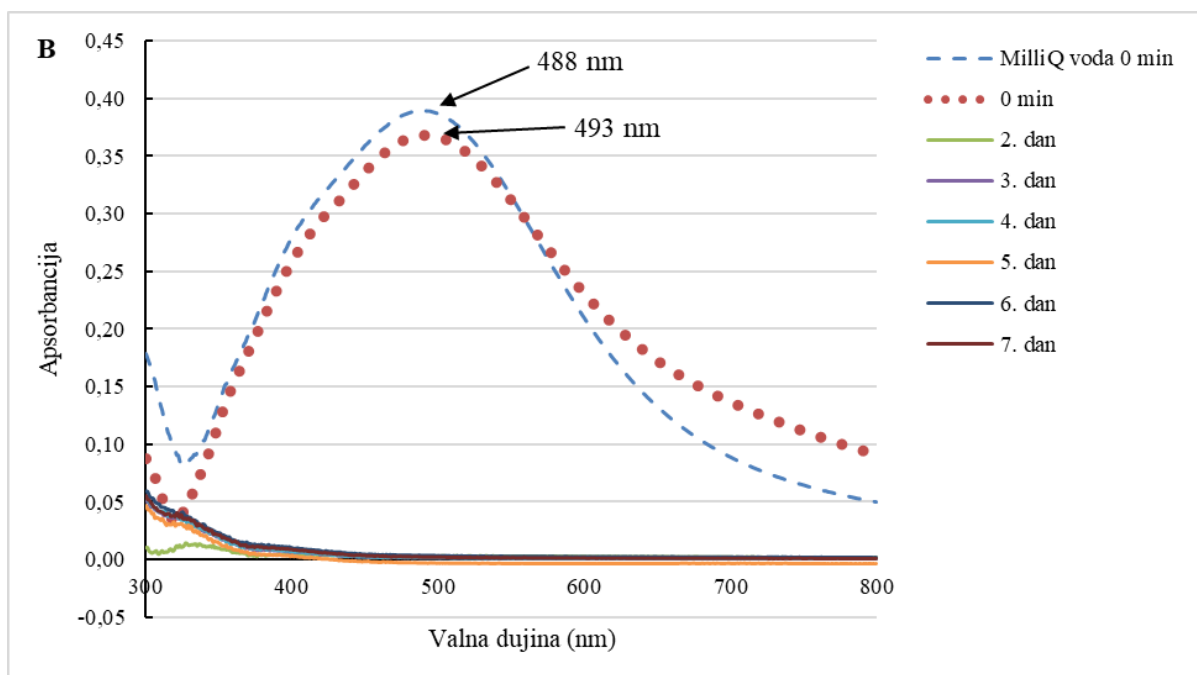
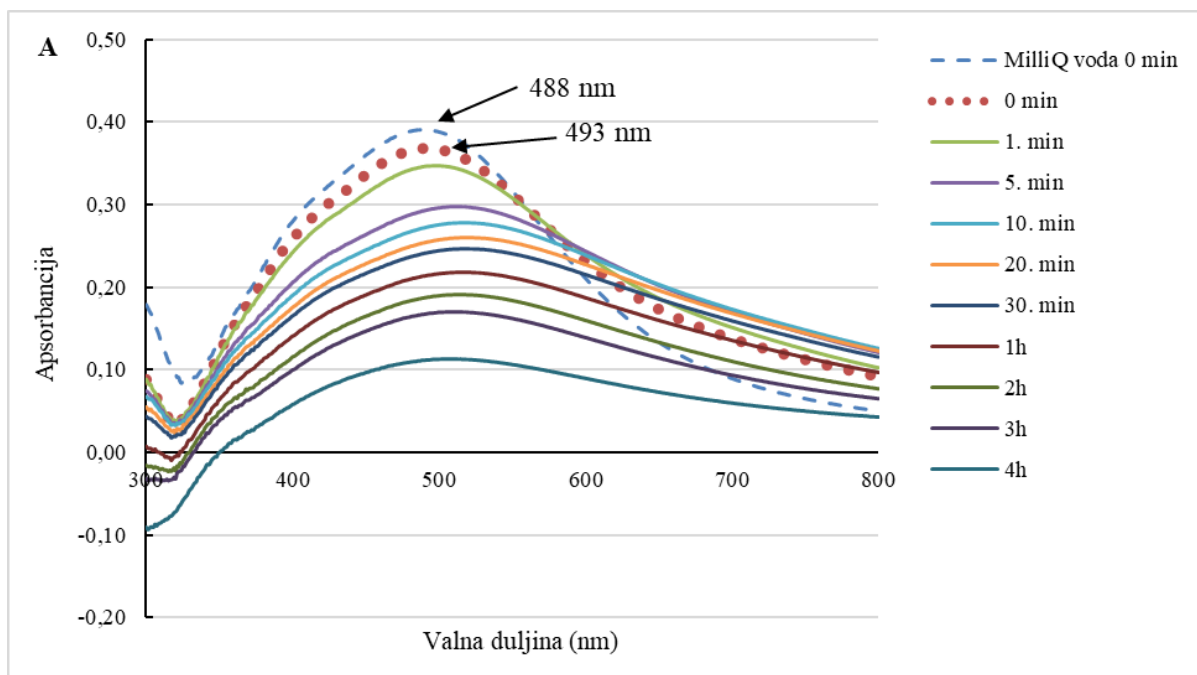
Na Slici 9. prikazani su rezultati analize stabilnosti 100 μ M AgNP-CTAB u hranjivoj podlozi 1/2 MS kroz vremenski period od 7 dana. U nultoj minuti izmjeren je spektar AgNP u MilliQ vodi i dobiven je apsorpcijski maksimum na valnoj duljini od 485 nm (Slika 9A). Analiza spektra AgNP-CTAB u hranjivoj podlozi 1/2 MS u nultoj minuti rezultirala je pojavom apsorpcijskog maksimuma na valnoj duljini od 500 nm, što ukazuje na malu agregaciju AgNP. Od prve minute praćenja stabilnosti AgNP-CTAB u hranjivoj podlozi detektirano je kontinuirano smanjenje apsorbancije te postepeni nestanak apsorpcijskog maksimuma, koji nakon prvog dana mjerenja više nije bio prisutan, što ukazuje na potpuni raspad AgNP-CTAB u hranjivoj podlozi ili interakciju s prisutnim ionima iz podloge (Slika 9B).



Slika 9. Apsorpcijski spektri 100 μ M AgNP-CTAB u hranjivoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS. Apsorbancija je mjerena u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm. A) u 0., 1., 5., 10., 20., 30. minuti te nakon 1., 2., 3., 4. sata; i B) svakodnevno od 2. do 7. dana. Za usporedbu rezultata korišten je kontrolni uzorak pripremljen u MilliQ vodi (MilliQ voda 0 min). Strelicama su označeni apsorpcijski maksimumi u nultoj minuti u MilliQ vodi i hranjivoj podlozi.

3.1.4. Analiza otopine AgNP-CTAB uz dodatak cisteina

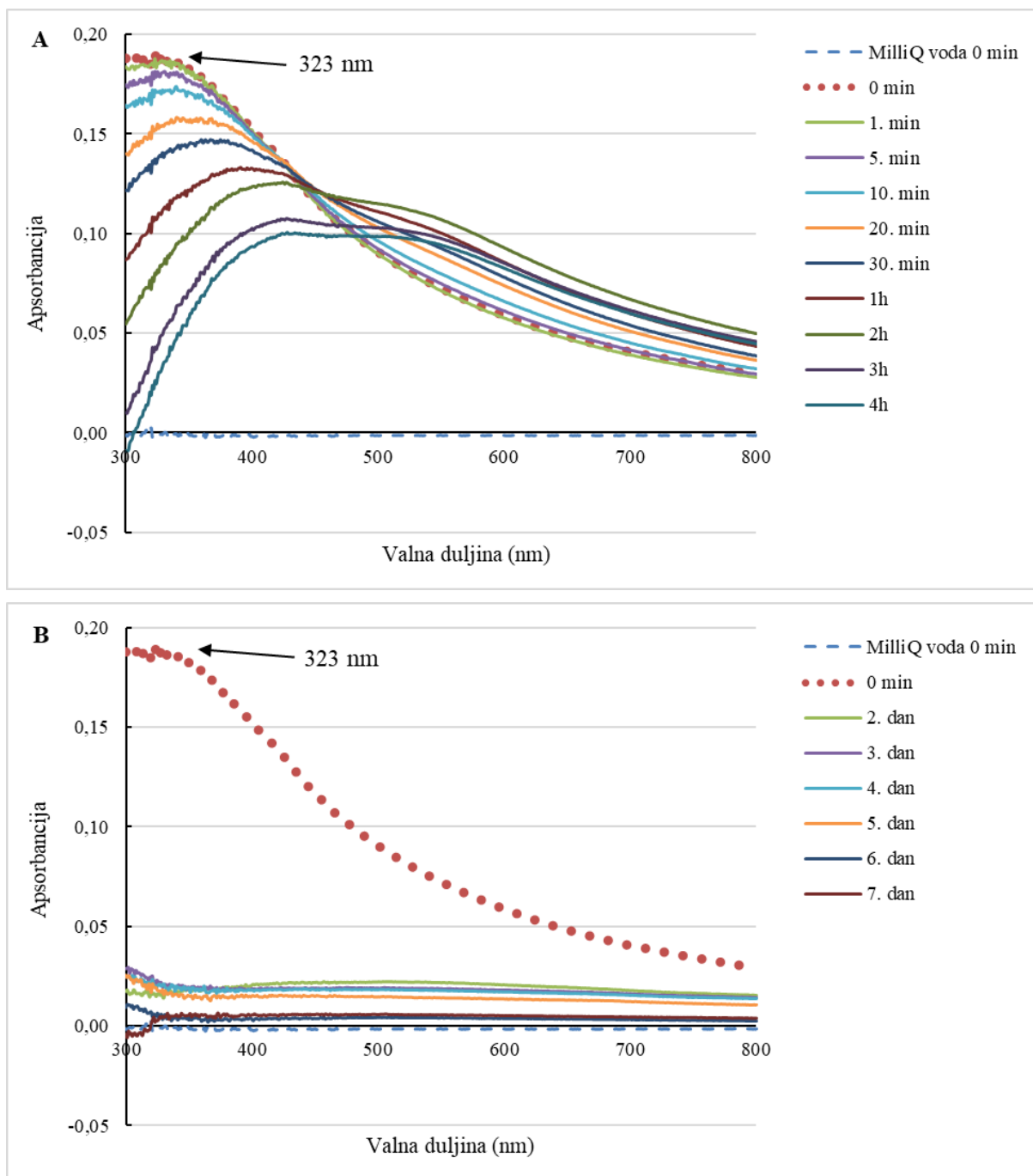
Na grafičkom prikazu (Slika 10) prikazani su rezultati analize stabilnosti 100 μM AgNP-CTAB uz dodatak 500 μM cisteina u hranjivoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS kroz vremenski period od 7 dana. U nultoj minuti izmjeren je spektar AgNP u MilliQ vodi i dobiven apsorpcijski maksimum na valnoj duljini od 488 nm (Slika 10A). Analiza spektra AgNP-CTAB u hranjivoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS u nultoj minuti rezultirala je pojavom apsorpcijskog maksimuma na valnoj duljini od 493 nm (Slika 10A), što ukazuje na proces agregacije AgNP u podlozi. Daljnjom analizom stabilnosti AgNP-CTAB u hranjivoj podlozi utvrđeno je postupno smanjenje apsorpcije i pomak apsorpcijskog maksimuma prema većim valnim duljinama, što također ukazuje na agregaciju AgNP. Vrijednost apsorpcijskog maksimuma do drugog sata nije se mijenjala, nakon čega se apsorpcija postepeno smanjivala i nakon drugog dana mjerenja pik više nije bio prisutan (Slika 10B).



Slika 10. Apsorpcijski spektri $100 \mu\text{M}$ AgNP-CTAB i $500 \mu\text{M}$ cisteina u hranjivoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS. Apsorbancija je mjerena u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm. A) u 0., 1., 5., 10., 20., 30. minuti te nakon 1., 2., 3., 4. sata; i B) svakodnevno od 2. do 7. dana. Za usporedbu rezultata korišten je kontrolni uzorak pripremljen u MilliQ vodi (MilliQ voda 0 min). Strelicama su označeni apsorpcijski maksimumi u nultoj minuti u MilliQ vodi i hranjivoj podlozi.

3.1.5. Analiza otopine AgNO₃

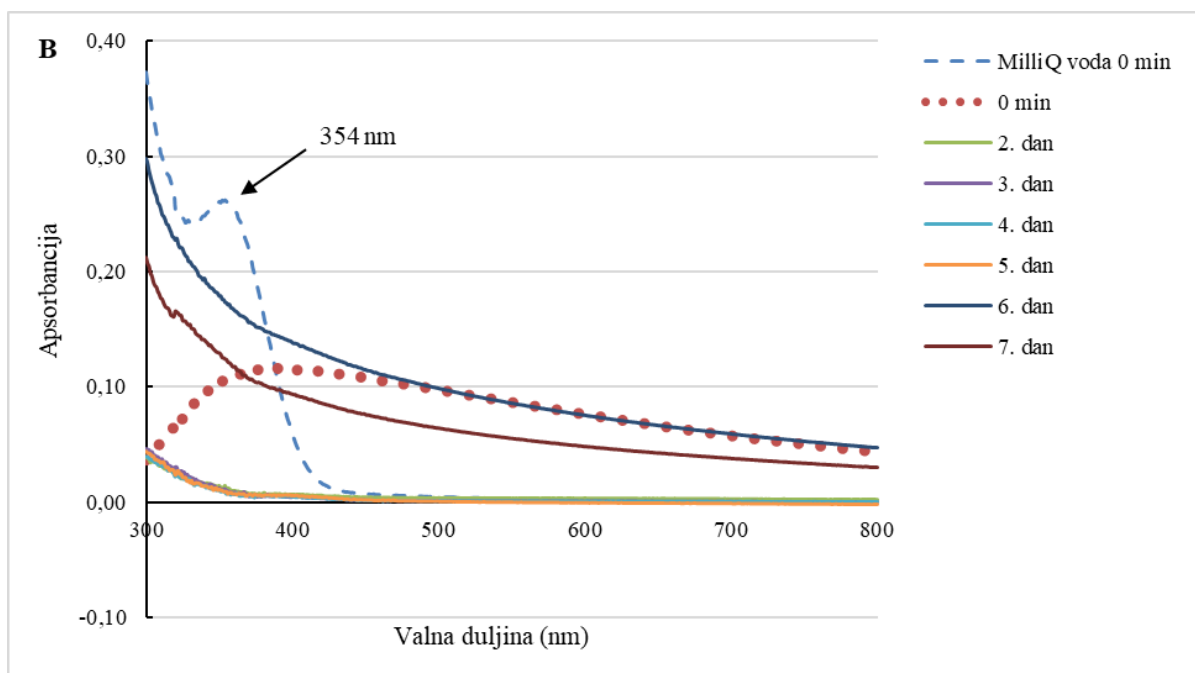
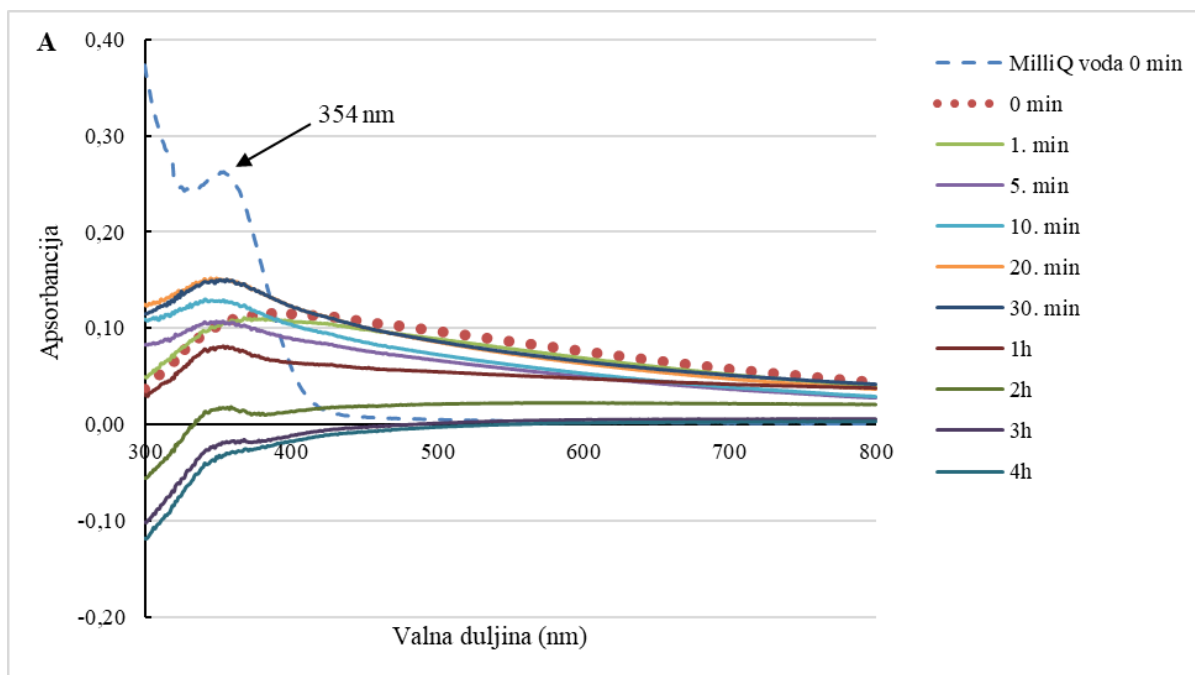
Slika 11. prikazuje rezultate analize 100 μM AgNO₃ u hranjivoj podlozi ½ MS u vremenskom periodu od 7 dana. Mjerenjem spektra AgNO₃ u nultoj minuti u hranjivoj podlozi detektiran je slabo definirani pik na valnoj duljini od 323 nm, dok analizom spektra AgNO₃ u MilliQ vodi nije detektiran pik u izabranom rasponu valnih duljina (Slika 11A), što pokazuje da u otopini nisu bile prisutne nanočestice. Daljnjom analizom utvrđeno je postepeno smanjenje apsorbancije i pomak apsorpcijskog maksimuma prema većim valnim duljinama (Slika 11B), što ukazuje na povezivanje slobodnih iona Ag⁺ s komponentama hranjive podloge.



Slika 11. Apsorpcijski spektri $100 \mu\text{M}$ AgNO_3 u hranjivoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS. Apsorbancija je mjerena u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm. A) u 0., 1., 5., 10., 20., 30. minuti te nakon 1., 2., 3., 4. sata; i B) svakodnevno od 2. do 7. dana. Za usporedbu rezultata korišten je kontrolni uzorak pripremljen u MilliQ vodi (MilliQ voda 0 min). Strelicom je označen apsorpcijski maksimum u nultoj minuti u hranjivoj podlozi.

3.1.6. Analiza otopine AgNO₃ uz dodatak cisteina

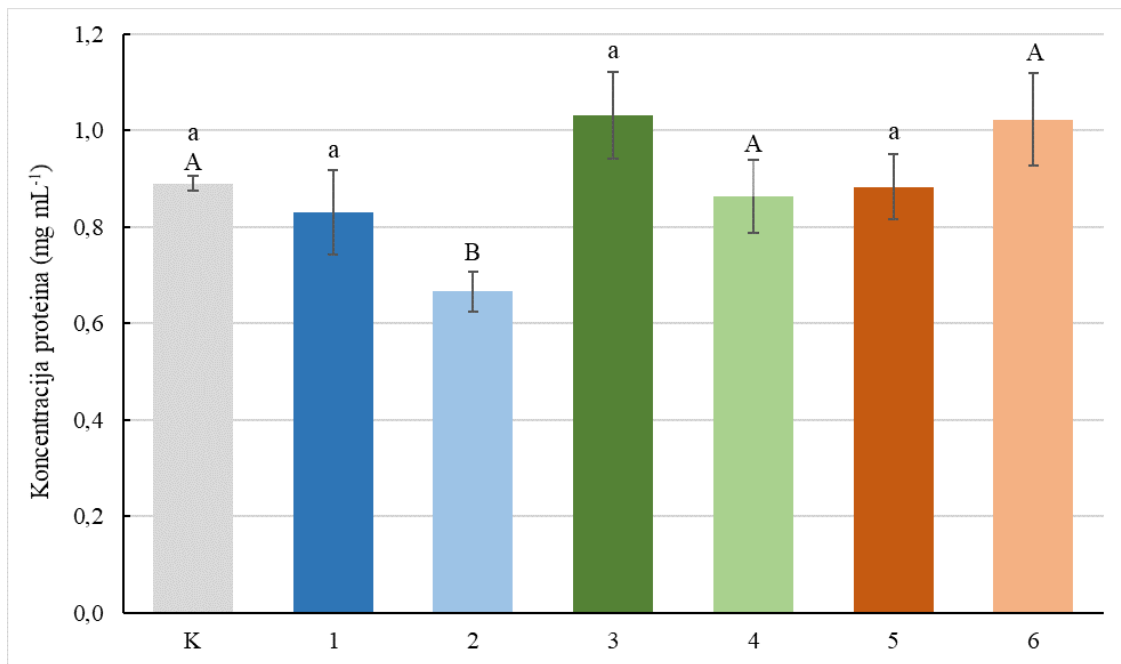
Slika 12. prikazuje spektar otopine 100 μM AgNO₃ s dodatkom 500 μM cisteina u hranjivoj podlozi ½ MS kroz vremenski period od 7 dana. Spektar izmjeren u MilliQ vodi pokazuje apsorpcijski maksimum na valnoj duljini od 354 nm (Slika 12A). Analiza u nultoj minuti u hranjivoj podlozi nije pokazala stvaranje apsorpcijskog maksimuma, ali je već u petoj minuti zabilježen pik na valnoj duljini od 349 nm (Slika 12A). Sve do tridesete minute mjerenja povećavala se apsorbanacija apsorpcijskog maksimuma, nakon čega se postepeno smanjivala te nakon prvog dana analize pik više nije bio prisutan (Slika 12B).



Slika 12. Apsorpcijski spektri $100 \mu\text{M}$ AgNO_3 i $500 \mu\text{M}$ cisteina u hranjivoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS. Apsorbancija je mjerena u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm. A) u 0., 1., 5., 10., 20., 30. minuti te nakon 1., 2., 3., 4. sata; i B) svakodnevno od 2. do 7. dana. Za usporedbu rezultata korišten je kontrolni uzorak pripremljen u MilliQ vodi (MilliQ 0 voda min). Strelicom je označen apsorpcijski maksimum u nultoj minuti u MilliQ vodi.

3.2. Koncentracija topivih proteina

Na Slici 13. prikazane su koncentracije topivih proteina izmjerene u klijanacima duhana koji su tretirani 100 μM otopinama AgNP-PVP, AgNP-CTAB ili AgNO₃, samih i u kombinaciji s 500 μM cisteinom. Nije zabilježena statistički značajna razlika između kontrole i tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃. Statistički značajno smanjenje koncentracije topivih proteina zabilježeno je nakon tretmana klijanaca s AgNP-PVP uz dodatak cisteina u odnosu na kontrolu.

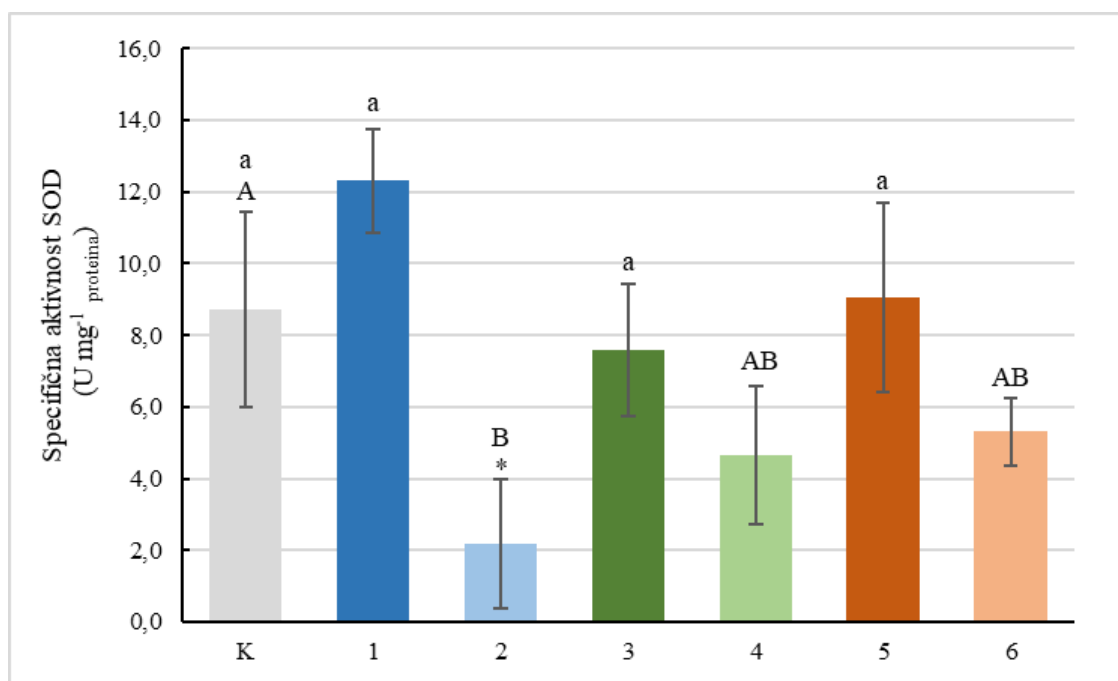


Slika 13. Koncentracija topivih proteina u klijanacima duhana. K – kontrola, 1 – 100 μM AgNP-PVP, 2 – 100 μM AgNP-PVP i 500 μM cistein, 3 – 100 μM AgNP-CTAB, 4 – 100 μM AgNP-CTAB i 500 μM cistein, 5 – 100 μM AgNO₃, 6 – 100 μM AgNO₃ i 500 μM cistein. Koncentracija je prikazana kao srednja vrijednost 6 replika \pm standardna pogreška. Slova iznad stupaca ukazuju na rezultate statističkoga testa ($p \leq 0,05$; Duncan test). Različita mala slova označavaju statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃. Različita velika slova označavaju statistički značajnu razliku između kontrole i kombiniranih tretmana s cisteinom.

3.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima

3.3.1. Aktivnost enzima SOD

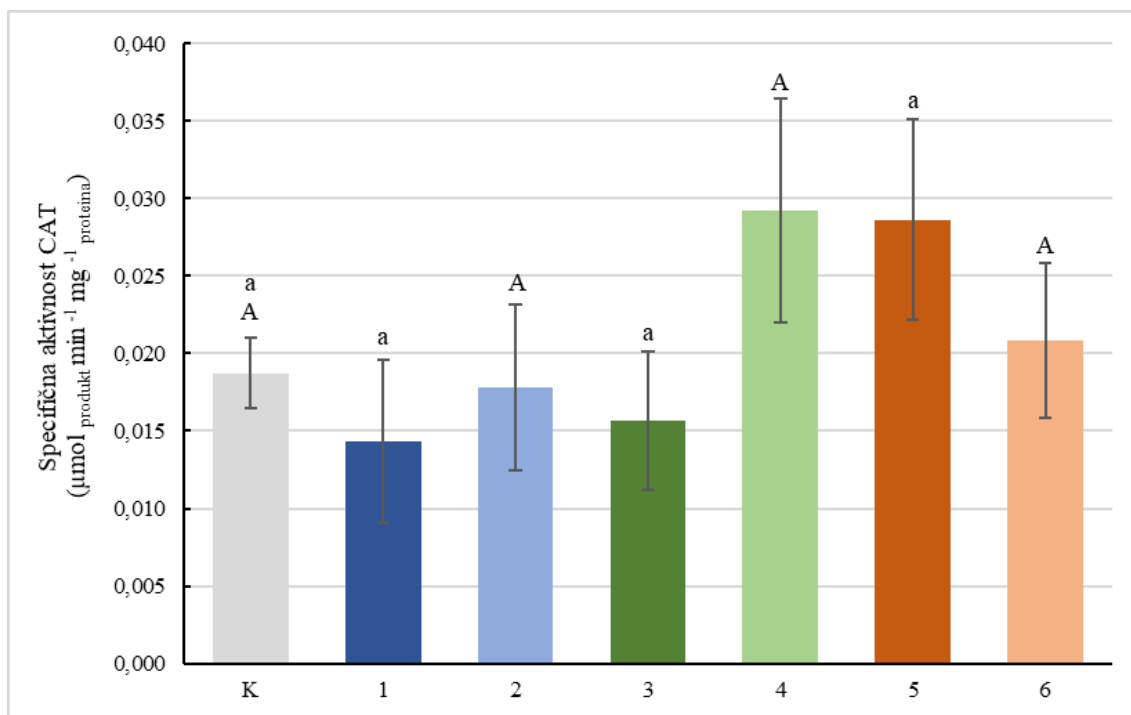
Nije zabilježena značajna razlika u aktivnosti enzima SOD između kontrole i tretmana s AgNP i AgNO₃ (Slika 14). Usporedbom kontrole i kombiniranih tretmana s cisteinom, statistički značajno smanjenje utvrđeno je nakon kombiniranog tretmana AgNP-PVP i cisteina, koji je također rezultirao i značajno nižom vrijednosti u usporedbi s tretmanom sa samim AgNP-PVP (Slika 14).



Slika 14. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima SOD u klijancima duhana. K – kontrola, 1 – 100 μM AgNP-PVP, 2 – 100 μM AgNP-PVP i 500 μM cistein, 3 – 100 μM AgNP-CTAB, 4 – 100 μM AgNP-CTAB i 500 μM cistein, 5 – 100 μM AgNO₃, 6 – 100 μM AgNO₃ i 500 μM cistein. Aktivnost enzima SOD prikazana je kao srednja vrijednost 6 replika ± standardna pogreška. Slova iznad stupaca ukazuju na rezultate statističkoga testa ($p \leq 0,05$; Duncan test). Različita mala slova označavaju statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃. Različita velika slova označavaju statistički značajnu razliku između kontrole i kombiniranih tretmana s cisteinom. Zvezdica (*) označava statistički značajnu razliku između tretmana AgNP-PVP, AgNP-CTAB ili AgNO₃ u odnosu na njihovu kombinaciju s cisteinom.

3.3.2. Aktivnost enzima CAT

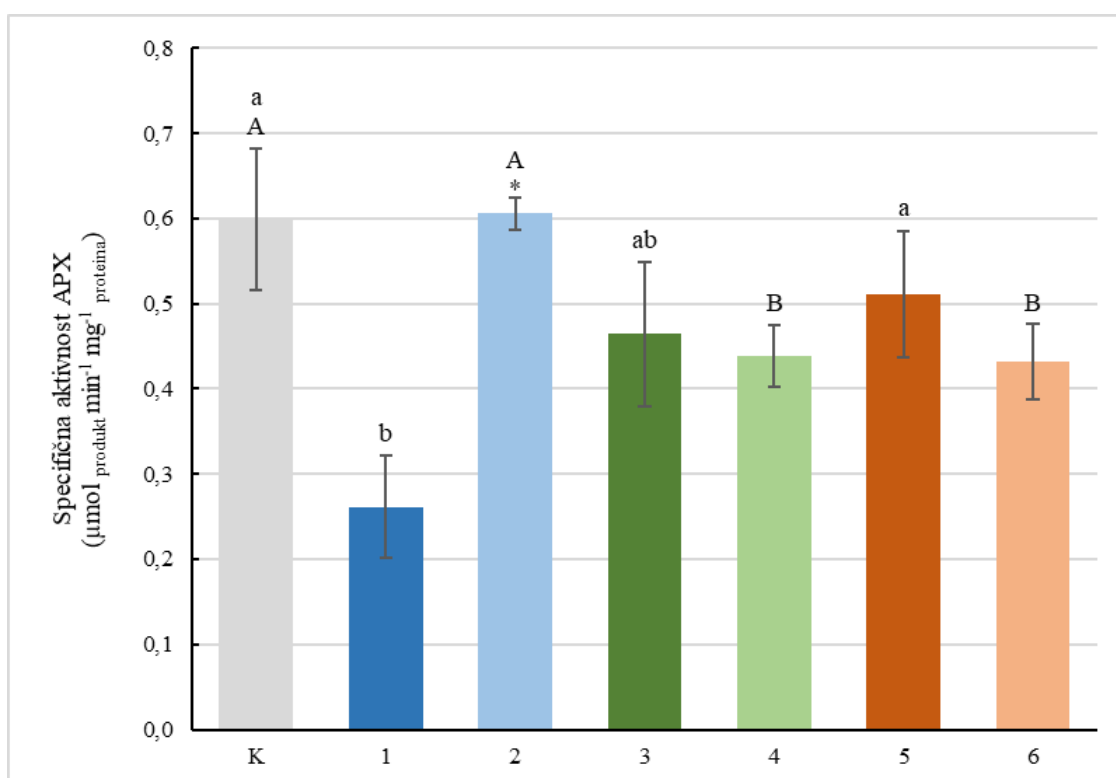
Statistički značajna razlika u aktivnosti enzima CAT nije zabilježena ni u jednom tretmanu u odnosu na kontrolu, kao niti između tretmana AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ u odnosu na kombinirane tretmane s cisteinom (Slika 15).



Slika 15. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima CAT u klijancima duhana. K – kontrola, 1 – 100 μM AgNP-PVP, 2 – 100 μM AgNP-PVP i 500 μM cistein, 3 – 100 μM AgNP-CTAB, 4 – 100 μM AgNP-CTAB i 500 μM cistein, 5 – 100 μM AgNO₃, 6 – 100 μM AgNO₃ i 500 μM cistein. Aktivnost enzima CAT prikazana je kao srednja vrijednost 6 replika ± standardna pogreška. Slova iznad stupaca ukazuju na rezultate statističkoga testa ($p \leq 0,05$; Duncan test). Različita mala slova označavaju statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃. Različita velika slova označavaju statistički značajnu razliku između kontrole i kombiniranih tretmana s cisteinom.

3.3.3. Aktivnost enzima APX

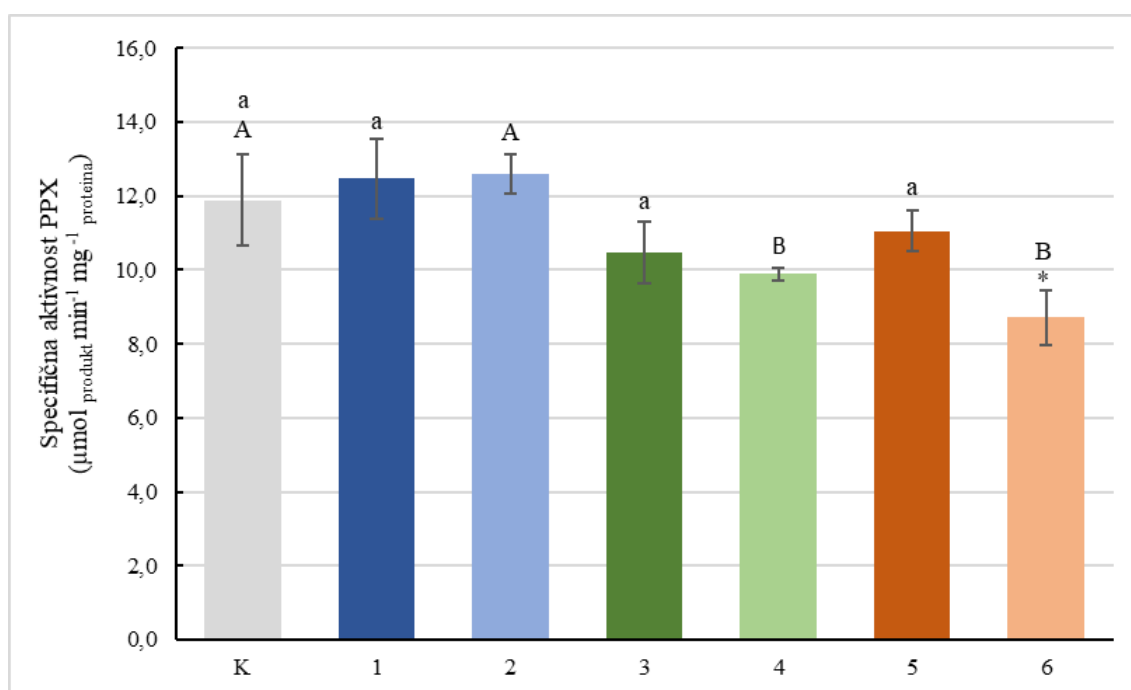
Značajno smanjenje aktivnosti enzima APX zabilježeno je nakon izlaganja klijanaca tretmanu s AgNP-PVP u usporedbi s kontrolom (Slika 16). Pri usporedbi kontrole i kombiniranih tretmana s cisteinom, detektirano je statistički značajno smanjenje aktivnosti enzima APX nakon tretmana s AgNP-CTAB i cisteina te AgNO₃ i cisteina. Statistički značajna razlika u aktivnosti enzima APX zabilježena je i između tretmana s AgNP-PVP i AgNP-PVP u kombinaciji s cisteinom, gdje je cistein uzrokovao značajni porast aktivnosti, koja je bila približne vrijednosti kao u kontroli (Slika 16).



Slika 16. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima APX u klijanima duhana. K – kontrola, 1 – 100 μM AgNP-PVP, 2 – 100 μM AgNP-PVP i 500 μM cistein, 3 – 100 μM AgNP-CTAB, 4 – 100 μM AgNP-CTAB i 500 μM cistein, 5 – 100 μM AgNO₃, 6 – 100 μM AgNO₃ i 500 μM cistein. Aktivnost enzima APX prikazana je kao srednja vrijednost 6 replika ± standardna pogreška. Slova iznad stupaca ukazuju na rezultate statističkoga testa ($p \leq 0,05$; Duncan test). Različita mala slova označavaju statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃. Različita velika slova označavaju statistički značajnu razliku između kontrole i kombiniranih tretmana s cisteinom. Zvezdica (*) označava statistički značajnu razliku između tretmana AgNP-PVP, AgNP-CTAB ili AgNO₃ u odnosu na njihovu kombinaciju s cisteinom.

3.3.4. Aktivnost enzima PPX

Nije utvrđena statistički značajna razlika između kontrole i tretmana s različito stabiliziranim AgNP i AgNO₃, ali je zabilježeno statistički značajno smanjenje aktivnosti enzima PPX nakon izlaganja klijanaca kombiniranim tretmanima AgNP-CTAB i AgNO₃ s cisteinom u odnosu na kontrolu (Slika 17). Statistički značajna razlika u aktivnosti enzima PPX zabilježena je i između tretmana s AgNO₃ i njegove kombinacije s cisteinom, gdje je dodatak cisteina značajno smanjio aktivnost (Slika 17).

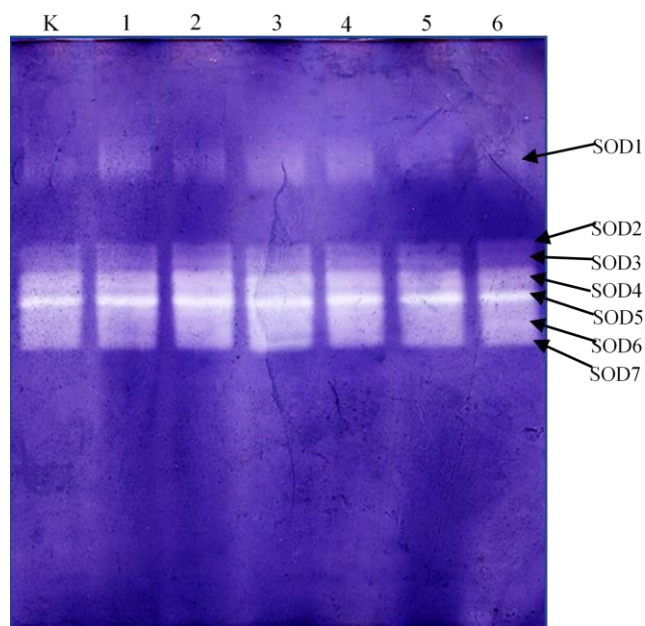


Slika 17. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti enzima PPX u klijancima duhana. K – kontrola, 1 – 100 μM AgNP-PVP, 2 – 100 μM AgNP-PVP i 500 μM cistein, 3 – 100 μM AgNP-CTAB, 4 – 100 μM AgNP-CTAB i 500 μM cistein, 5 – 100 μM AgNO₃, 6 – 100 μM AgNO₃ i 500 μM cistein. Aktivnost enzima PPX prikazana je kao srednja vrijednost 6 replika ± standardna pogreška. Slova iznad stupaca ukazuju na rezultate statističkoga testa ($p \leq 0,05$; Duncan test). Različita mala slova označavaju statistički značajnu razliku između kontrole i tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃. Različita velika slova označavaju statistički značajnu razliku između kontrole i kombiniranih tretmana s cisteinom. Zvezdica (*) označava statistički značajnu razliku između tretmana AgNP-PVP, AgNP-CTAB ili AgNO₃ u odnosu na njihovu kombinaciju s cisteinom.

3.4. Aktivnost i broj izoformi enzima na gelu

3.4.1. Aktivnost enzima SOD

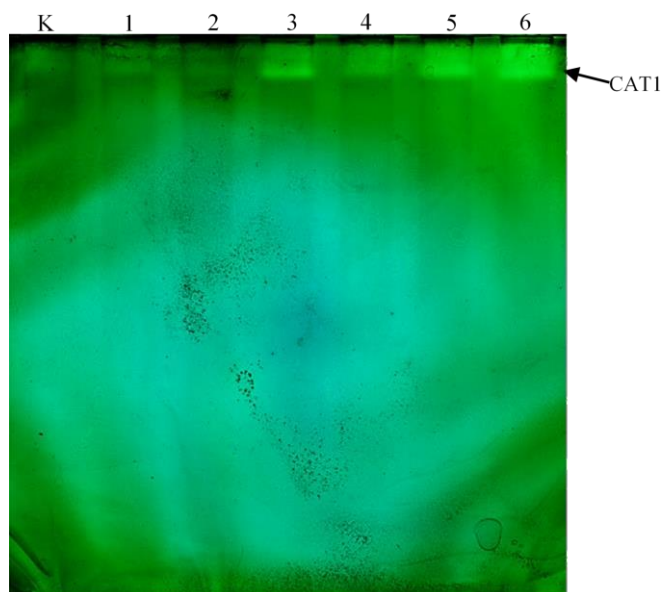
Nakon razdvajanja proteina elektroforezom u nativnim uvjetima detektirano je 7 različito pokretljivih izoformi enzima SOD, koje su označene kao SOD1 - SOD7 (Slika 18). Samo je izoforma SOD1 pokazala razliku u intenzitetu nakon različitih tretmana; slabiji intenzitet ove izoforme detektiran je u kontroli i tretmanima s AgNO_3 u usporedbi s tretmanima s AgNP-PVP i AgNP-CTAB, samima i kombinaciji s cisteinom (Slika 18).



Slika 18. Aktivnost izoformi enzima SOD u klijancima duhana u gelu nakon elektroforeze u nativnim uvjetima. K – kontrola, 1 – 100 μM AgNP-PVP, 2 – 100 μM AgNP-PVP i 500 μM cistein, 3 – 100 μM AgNP-CTAB, 4 – 100 μM AgNP-CTAB i 500 μM cistein, 5 – 100 μM AgNO_3 , 6 – 100 μM AgNO_3 i 500 μM cistein.

3.4.2. Aktivnost enzima CAT

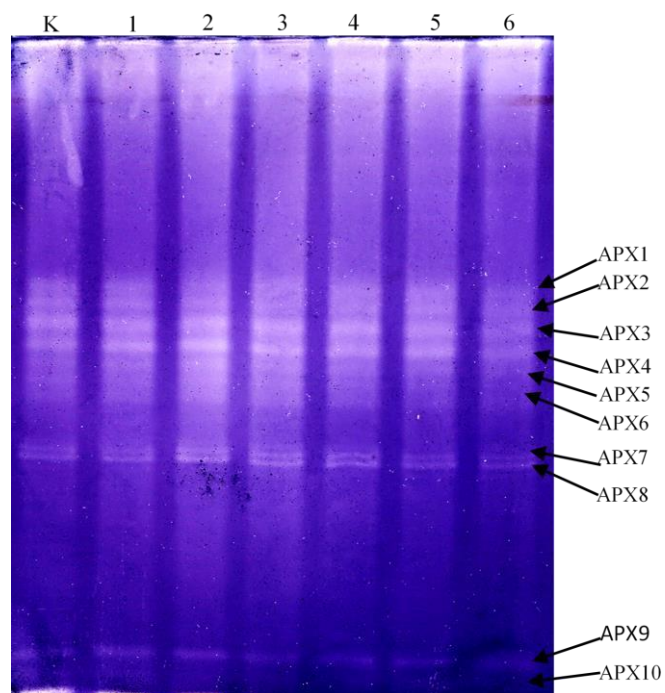
Nakon provedene elektroforeze u nativnim uvjetima, u gelu je detektirana samo jedna izoforma katalaze, označena kao CAT1 (Slika 19), čija je ekspresija u kontroli bila vrlo slaba. Detektiran je pojačan intenzitet ove izoforme nakon tretmana s AgNP-CTAB i AgNO_3 u odnosu na kontrolu i tretmane s AgNP-PVP. Zabilježena je i razlika između tretmana AgNP-PVP i AgNP-CTAB i pripadajućih kombinacija s cisteinom, gdje je u oba tretmana dodatak cisteina smanjio jakost signala izoforme CAT1.



Slika 19. Aktivnost izoforme enzima CAT u klijancima duhana u gelu nakon elektroforeze u nativnim uvjetima. K – kontrola, 1 – 100 μM AgNP-PVP, 2 – 100 μM AgNP-PVP i 500 μM cistein, 3 – 100 μM AgNP-CTAB, 4 – 100 μM AgNP-CTAB i 500 μM cistein, 5 – 100 μM AgNO₃, 6 – 100 μM AgNO₃ i 500 μM cistein.

3.4.3. Aktivnost enzima APX

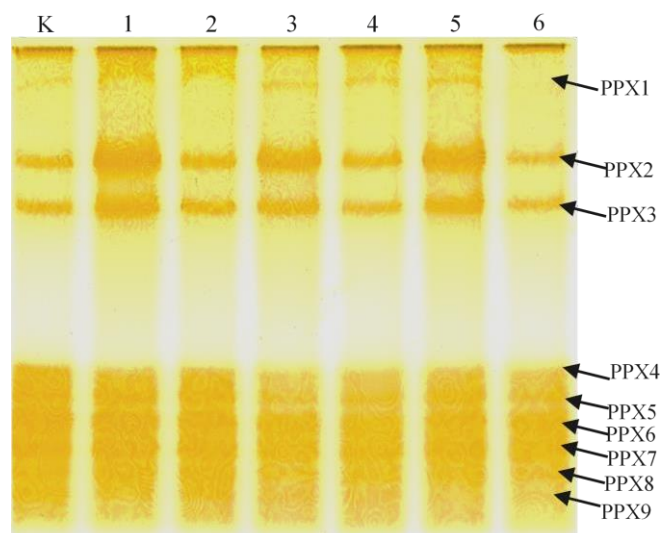
Aktivnost enzima APX prikazana je na Slici 20. Detektirano je 10 različito pokretljivih izoformi enzima APX, koje su označene kao APX1 - APX10. Utvrđeno je povećanje intenziteta izoformi APX7 i APX8 nakon tretmana s AgNP-CTAB u odnosu na kontrolu. Usporedbom kontrole i kombiniranog tretmana AgNO₃ i cisteina, detektirano je smanjenje intenziteta izoformi APX1 - APX3, APX6 i APX9. Razlike između tretmana s AgNO₃ i kombiniranog tretmana s cisteinom zabilježene su za izoforme APX1 - APX6 i APX9, gdje je dodatak cisteina rezultirao smanjenjem intenziteta vrpca. Za izoforme APX7 i APX8 detektiran je porast intenziteta signala nakon kombiniranog tretmana s AgNP-PVP i cisteinom u odnosu na tretman s AgNP-PVP (Slika 20).



Slika 20. Aktivnost izoformi enzima APX u klijancima duhana u gelu nakon elektroforeze u nativnim uvjetima. K – kontrola, 1 – 100 μM AgNP-PVP, 2 – 100 μM AgNP-PVP i 500 μM cistein, 3 – 100 μM AgNP-CTAB, 4 – 100 μM AgNP-CTAB i 500 μM cistein, 5 – 100 μM AgNO₃, 6 – 100 μM AgNO₃ i 500 μM cistein.

3.4.4. Aktivnost enzima PPX

Aktivnost enzima PPX prikazana je na Slici 21. Detektirano je 9 različito pokretljivih izoformi enzima koje su označene kao PPX1 - PPX9. Nakon tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ utvrđeno je povećanje intenziteta izoformi PPX2 i PPX3 u odnosu na kontrolu, dok je za izoforme PPX1 - PPX3 zabilježen smanjeni intenzitet nakon kombiniranog tretmana AgNO₃ i cisteina. Svi kombinirani tretman pokazali su smanjeni intenzitet vrpce PPX1 - PPX3 u odnosu na odgovarajuće tretmane bez cisteina (Slika 21).



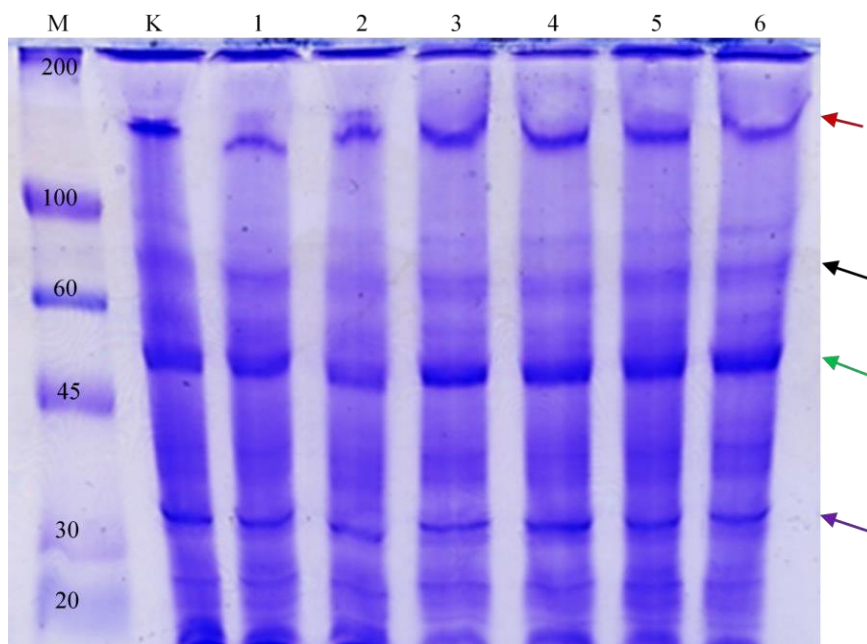
Slika 21. Aktivnost izoformi enzima PPX u klijancima duhana u gelu nakon elektroforeze u nativnim uvjetima. K – kontrola, 1 – 100 μM AgNP-PVP, 2 – 100 μM AgNP-PVP i 500 μM cistein, 3 – 100 μM AgNP-CTAB, 4 – 100 μM AgNP-CTAB i 500 μM cistein, 5 – 100 μM AgNO₃, 6 – 100 μM AgNO₃ i 500 μM cistein.

3.5. Ekspresija topivih proteina

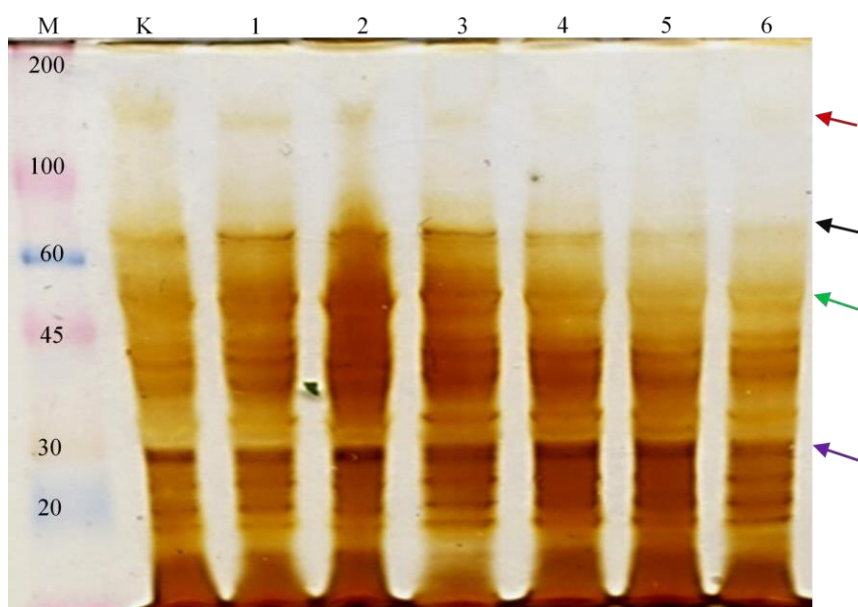
Na Slikama 22. i 23. prikazana je ekspresija topivih proteina u klijancima duhana. Nakon bojanja gela bojom CBB (Slika 22) detektiran je manji broj vrpca u odnosu na gel obojan srebrovim nitratom (Slika 23). Analiza intenziteta vrpca u gelu obojanom bojom CBB pokazala je smanjenu ekspresiju proteina veličine oko 150 kDa nakon svih tretmana u odnosu na kontrolu (crvena strelica) (Slika 22). Ekspresija proteina od oko 60 kDa smanjena je nakon kombiniranog tretmana s AgNP-PVP u odnosu na kontrolu i ostale tretmane (crna strelica). Protein veličine oko 50 kDa pokazao je smanjenu ekspresiju nakon kombiniranog tretmana s AgNP-PVP i cisteina u odnosu na kontrolu i tretman sa samim AgNP-PVP, dok je nakon tretmana s AgNP-CTAB i AgNO₃ i njihovih kombinacija s cisteinom zabilježeno povećanje ekspresije istog proteina (zeleni strelica). Ekspresija proteina veličine oko 30 kDa (ljubičasti strelica) nakon bojanja gela bojom CBB (Slika 22) bila je slabija u odnosu na protein iste veličine na gelu obrađenom srebrovim nitratom (Slika 23).

Nakon bojanja srebrovim nitratom detektirana je smanjena ekspresija proteina veličine oko 150 kDa nakon svih tretmana u odnosu na kontrolu (crvena strelica) (Slika 23). Ekspresija proteina od oko 60 kDa bila je povećana nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNP-CTAB i njihovih kombinacija s cisteinom u usporedbi s kontrolom, dok je isti protein pokazao smanjenu ekspresiju nakon oba tretmana s AgNO₃ (crna strelica). Zabilježena je i jača ekspresija

proteina od oko 30 kDa (ljubičasta strelica) te smanjena ekspresija proteina od oko 50 kDa (zelena strelica) u odnosu na proteine iste veličine na gelu obojanom bojom CBB.



Slika 22. Ekspresija topivih proteina u klijancima duhana dobivena bojanjem gela bojom CBB nakon provedene SDS-PAG elektroforeze. M – biljeg molekularnih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 100 μM AgNP-PVP, 2 – 100 μM AgNP-PVP i 500 μM cistein, 3 – 100 μM AgNP-CTAB, 4 – 100 μM AgNP-CTAB i 500 μM cistein, 5 – 100 μM AgNO₃, 6 – 100 μM AgNO₃ i 500 μM cistein.

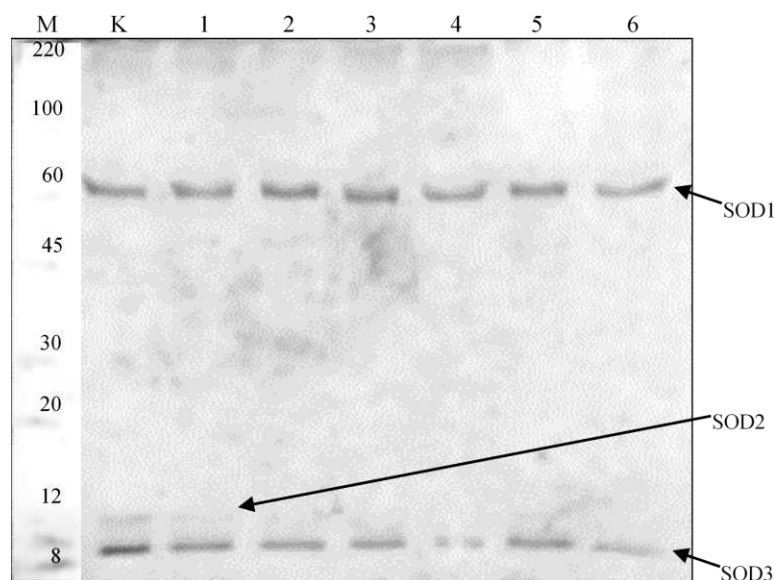


Slika 23. Ekspresija topivih proteina u klijancima duhana dobivena bojanjem gela srebrovim nitratom nakon provedene SDS-PAG elektroforeze. M – biljeg molekularnih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 100 μM AgNP-PVP, 2 - 100 μM AgNP-PVP i 500 μM cistein, 3 – 100 μM AgNP-CTAB, 4 – 100 μM AgNP-CTAB i 500 μM cistein, 5 – 100 μM AgNO₃, 6 – 100 μM AgNO₃ i 500 μM cistein.

3.6. Imunokemijska detekcija proteina na membrani

3.6.1. Ekspresija proteina SOD

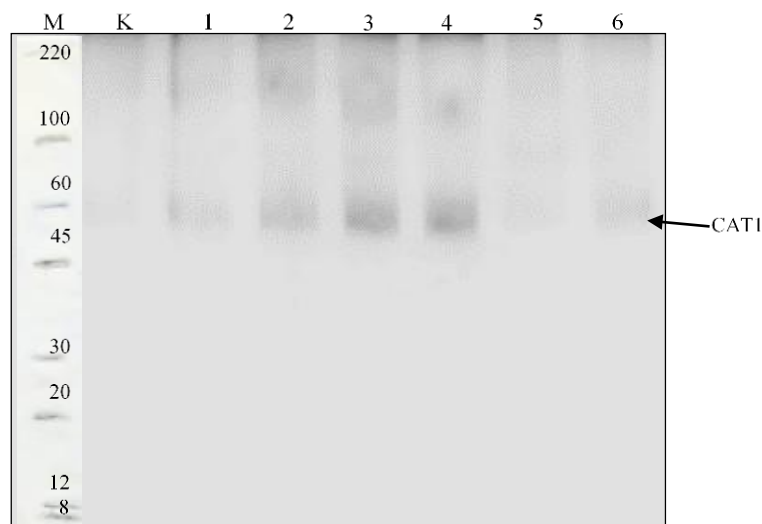
Imunodetekcijom na membrani detektirane su tri izoforme proteina SOD: SOD1 (60 kDa), SOD2 (10 kDa) i SOD3 (8 kDa) (Slika 24). Izoforma SOD1 pokazala je jednaku ekspresiju u kontroli i svim tretmanima, dok je izoforma SOD2 detektirana samo u kontroli i tretmanu s AgNP-PVP. Izoforma SOD3 pokazala je najjači intenzitet u kontroli, dok je bila slabija u svim tretmanima. Između tretmana s AgNP-PVP i kombinacije s cisteinom nije zabilježena razlika u intenzitetu vrpce SOD3, dok je nakon kombiniranih tretmana AgNP-CTAB i AgNO₃ s cisteinom, intenzitet vrpce bio značajno slabiji u odnosu na tretmane sa samim AgNP-CTAB i AgNO₃ (Slika 24).



Slika 24. Imunokemijska detekcija proteina SOD u klijancima duhana. M – biljeg molekularnih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 100 μ M AgNP-PVP, 2 – 100 μ M AgNP-PVP i 500 μ M cistein, 3 – 100 μ M AgNP-CTAB, 4 – 100 μ M AgNP-CTAB i 500 μ M cistein, 5 – 100 μ M AgNO₃, 6 – 100 μ M AgNO₃ i 500 μ M cistein.

3.6.2. Ekspresija proteina CAT

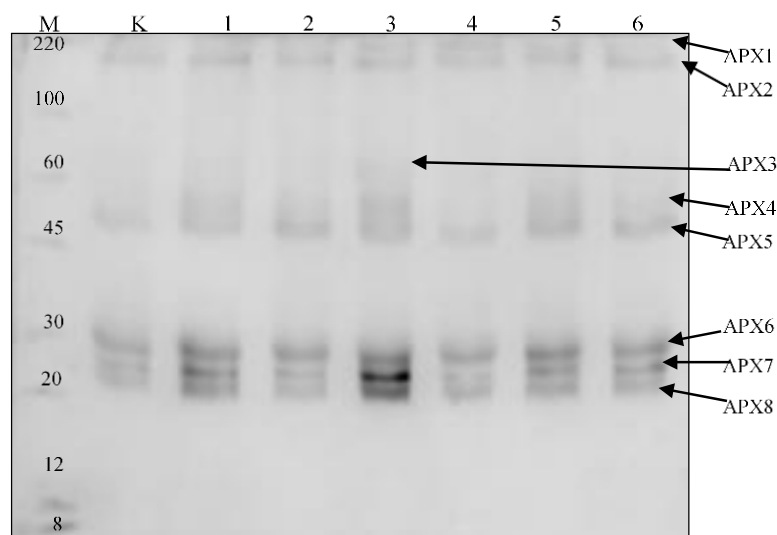
Analizom membrane nakon imunodetekcije utvrđena je jedna izoforma katalaze, CAT1, od 50 kDa (Slika 25). U kontroli je ekspresija proteina CAT1 bila znatno slabija u odnosu na sve tretmane. Najjači intenzitet ove izoforme zabilježen je nakon tretmana s AgNP-CTAB i kombiniranog tretmana s cisteinom. Kombinirani tretmani AgNP-PVP i AgNO₃ s cisteinom uzrokovali su povećanje ekspresije izoforme CAT1 u odnosu na tretmane sa samim AgNP-PVP i AgNO₃ (Slika 25).



Slika 25. Imunokemijska detekcija proteina CAT u klijancima duhana. M – biljeg molekulskih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 100 μM AgNP-PVP, 2 – 100 μM AgNP-PVP i 500 μM cistein, 3 – 100 μM AgNP-CTAB, 4 – 100 μM AgNP-CTAB i 500 μM cistein, 5 – 100 μM AgNO₃, 6 – 100 μM AgNO₃ i 500 μM cistein.

3.6.3. Ekspresija proteina APX

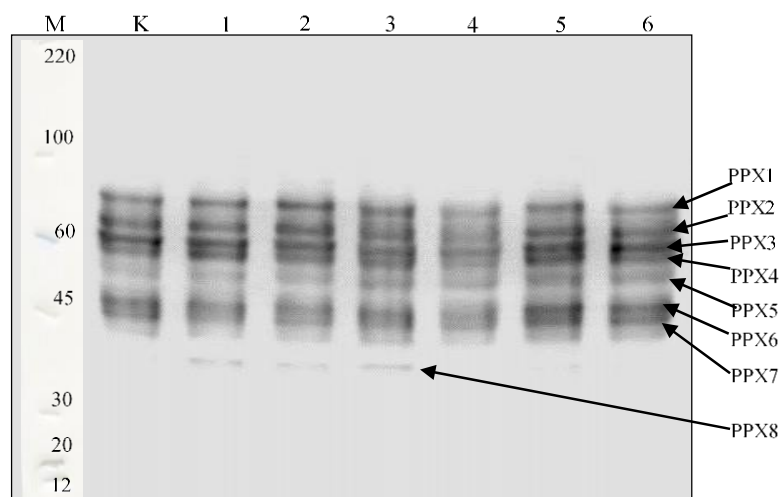
Imunodetekcijom askorbat peroksidaze detektirano je 8 izoformi ovog proteina: APX1 (220 kDa), APX2 (180 kDa), APX3 (60 kDa), APX4 (55 kDa), APX5 (50 kDa), APX6 (30 kDa), APX7 (25 kDa) i APX8 (22 kDa) (Slika 26). Izoforma APX1 eksprimirana je samo nakon tretmana s AgNP-CTAB i njegovog kombiniranog tretmana s cisteinom. Izoforma APX2 bila je jednako je eksprimirana u svim tretmanima. Izoforma APX3 zabilježena je nakon tretmana s AgNP-CTAB, dok je izoforma APX4 detektirana nakon tretmana s AgNP-CTAB i AgNO₃. Izoforma APX5 pokazala je signal u kontroli i nakon svih tretmana, ali je njezina ekspresija bila jača nakon kombiniranog tretmana AgNP-PVP i cisteina, AgNP-CTAB i AgNO₃. Ekspresija izoformi APX6, APX7 i APX8 zabilježena je u kontroli i svim tretmanima, a najjača je bila nakon tretmana s AgNP-CTAB. Usporedbom kontrole i tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, detektirana je jača ekspresija izoformi enzima APX u svim tretmanima. Tretman s AgNP-CTAB rezultirao je dodatnim izoformom APX3, koja nije zabilježena u kontroli i ostalim tretmanima.



Slika 26. Imunokemijska detekcija proteina APX u klijancima duhana. M – biljeg molekularnih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 100 μM AgNP-PVP, 2 – 100 μM AgNP-PVP i 500 μM cistein, 3 – 100 μM AgNP-CTAB, 4 – 100 μM AgNP-CTAB i 500 μM cistein, 5 – 100 μM AgNO₃, 6 – 100 μM AgNO₃ i 500 μM cistein.

3.6.4. Ekspresija proteina PPX

Na membrani koja prikazuje ekspresiju peroksidaze detektirano je 8 izoformi ovog proteina: PPX1 (85 kDa), PPX2 (80 kDa), PPX3 (60 kDa), PPX4 (58 kDa), PPX5 (50 kDa), PPX6 (45 kDa), PPX7 (42 kDa) i PPX8 (40 kDa) (Slika 27). Izoforme PPX1 i PPX2 pokazale su slabiju ekspresiju nakon kombiniranog tretmana AgNP-CTAB i cisteina u odnosu na kontrolu i ostale tretmane. Ekspresija izoforme PPX3 bila je smanjena nakon tretmana s AgNP-CTAB i njegovog kombiniranog tretmana s cisteinom, a povećana nakon tretmana s AgNO₃ i njegove kombinacije s cisteinom u odnosu na kontrolu. Izoformi PPX4 smanjena je ekspresija nakon kombiniranog tretmana AgNP-CTAB i cisteina, a povećana nakon tretmana s AgNP-PVP te AgNO₃ i kombinacije AgNO₃ i cisteina u odnosu na kontrolu. Izoforma PPX5 pokazala je jednaku ekspresiju u kontroli i svim tretmanima. Ekspresija izoformi PPX6 i PPX7 bila je povećana nakon izlaganja AgNO₃, a smanjena nakon kombiniranog tretmana AgNP-CTAB i cisteina u odnosu na kontrolu. Izoforma PPX8 detektirana je nakon tretmana s AgNP-PVP i kombiniranog tretmana s cisteinom te AgNP-CTAB. Usporedbom tretmana s AgNP-CTAB i kombiniranog tretmana s cisteinom zabilježeno je smanjenje ekspresije svih izoformi nakon dodatka cisteina.



Slika 27. Imunokemijska detekcija proteina PPX u klijancima duhana. M – biljeg molekulskih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 100 μM AgNP-PVP, 2 – 100 μM AgNP-PVP i 500 μM cistein, 3 – 100 μM AgNP-CTAB, 4 – 100 μM AgNP-CTAB i 500 μM cistein, 5 – 100 μM AgNO₃, 6 – 100 μM AgNO₃ i 500 μM cistein.

RASPRAVA

4. RASPRAVA

AgNP bilježe široku primjenu i veliki tržišni potencijal, ali njihova sklonost biotransformaciji u okolišu predstavlja važan problem i ima direktan utjecaj na njihovu fitotoksičnost. Kako bih pridonijela razumijevanju navedene tematike, ispitala sam učinak AgNP stabiliziranih s dva različita omotača (PVP i CTAB) na aktivnost i ekspresiju važnih enzima antioksidacijskog sustava (SOD, CAT, APX i PPX) u klijancima duhana. Kako bih odredila potječe li toksičan učinak AgNP od otpuštenih iona Ag^+ ili od samih AgNP, usporedila sam utjecaj istih koncentracija AgNP i srebra u ionskom obliku, AgNO_3 , te sam navedene tretmane kombinirala s pet puta većom koncentracijom cisteina, snažnog kelatora iona srebra. Fitotoksičnost AgNP moguće je regulirati kemijskom modifikacijom njihove površine koja povećava njihovu stabilnost. U svom radu ispitala sam stabilnost AgNP-PVP i AgNP-CTAB, u hranjivoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS, korištenoj za izlaganje klijanaca duhana, u vremenskom razdoblju od 7 dana (koliko je trajao i tretman), kako bih utvrdila utječe li tip omotača na ponašanje AgNP u biološkom mediju. Naime, prije izlaganja biljaka nanočesticama metala potrebno je odrediti stabilnost samih nanočestica u hranjivoj podlozi u istim uvjetima koji se primjenjuju za tretman modelnog organizma jer dobiveni rezultati predstavljaju osnovne informacije za razumijevanje interakcija nanočestica s makromolekulama u stanici (Reidy i sur. 2013). U svome istraživanju zabilježila sam promjene u apsorpcijskom spektru oba tipa AgNP u hranjivoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS, na što je upućivao pomak apsorpcijskog maksimuma prema većim valnim duljinama i smanjenje apsorbancije u odnosu na rezultate u MilliQ vodi, u kojoj su se AgNP pokazale stabilnijima u odnosu na hranjivu podlogu. Navedeno ukazuje na agregaciju AgNP, ali i na disocijaciju iona Ag^+ jer proces agregacije AgNP ne sprječava njihovu disocijaciju (Zhao i Wang 2012). U svome istraživanju Pang i sur. (2020) opisali su kako pojedine hranjive podloge utječu na stopu agregacije AgNP. Stopa agregacije AgNP stabiliziranih s omotačem citratom (AgNP-citrat) bila je veća u otopini PBS u odnosu na fiziološku otopinu ili fetalni goveđi serum zbog različitih koncentracija iona u otopini, dok je izloženost AgNP-citrat hranjivoj podlozi $\frac{1}{4}$ Hoagland (Hoagland i Snyder 1933) rezultirala agregacijom i disocijacijom AgNP (Geisler-Lee i sur. 2014). U istraživanju Sharma i sur. (2014) objavljeno je kako velika ionska jakost i pH hranjive podloge mogu utjecati na povećanu stopu disocijacije AgNP. Istraživanje provedeno s AgNP-citrat pripremljenima u hranjivoj podlozi za uzgoj vodene biljke *Lemna minor* pokazalo je visoku stopu agregacije AgNP zbog velike ionske jakosti korištene hranjive podloge (Gubbins i sur. 2011). Također, na stabilnost AgNP utječe agregatno stanje hranjive podloge. U radu Biba i sur. (2021) pokazano je kako su AgNP-citrat pripremljene u $150 \mu\text{M}$ koncentraciji u krutoj hranjivoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS pokazale veću stabilnost tijekom perioda od

pet dana u odnosu na 150 μM AgNP-citrat u tekućoj hranjivoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS, koje su vrlo brzo agregirale i u potpunosti nestale nakon petog sata mjerenja. Moji rezultati ukazuju na veću stabilnost i dulju postojanost AgNP-PVP u odnosu na AgNP-CTAB. U otopini AgNP-PVP u hranjivoj podlozi SPR pik bio je prisutan tijekom svih 7 dana mjerenja, što ukazuje na prisutnost AgNP u otopini tijekom cijelog trajanja tretmana biljaka. S druge strane, stabilnost AgNP-CTAB narušila se odmah nakon dodavanja AgNP u hranjivu podlogu, što sam detektirala kao smanjenje apsorbancije uzrokovano brzom agregacijom AgNP. Naime, smanjenje apsorbancije prati širenje SPR pika, što ukazuje na pojavu agregata većih dimenzija (Gunsolus i sur. 2015). Nakon tridesete minute mjerenja nije bilo moguće detektirati SPR pik, što ukazuje na potpuni raspad AgNP-CTAB (Tejamaya i sur. 2012). Istraživanjem autora Biba i sur. (2020) utvrđena je veća stopa disocijacije AgNP-PVP u odnosu na AgNP-CTAB, pripremljenih u krutoj hranjivoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS, za koje je zabilježena veća stabilnost i relativno konstantan apsorpcijski maksimum tijekom 5 dana mjerenja uz blagu stopu disocijacije i agregacije, što je suprotno rezultatima mogla istraživanja. Ipak, moji se rezultati slažu s rezultatima autora Komazec (2020), koji je analizom spektra 100 μM AgNP-PVP pripremljenih u krutoj hranjivoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS zabilježio visoku stabilnost AgNP. Svojstva i jakost vezanja omotača na AgNP utječu na njihovu stabilizaciju. Omotač CTAB labilno je, nekovalentnom vezom vezan za površinu AgNP. PVP je zbog svoje građe i duljih lanaca jače vezan za površinu AgNP, također nekovalentnom vezom (Biba i sur. 2020) te stoga djeluje stabilizirajuće na AgNP onemogućavajući im brzo otpuštanje Ag^+ .

Na isti način analizirala sam i ponašanje srebrove soli, AgNO_3 , u hranjivoj podlozi i rezultate usporedila s rezultatima dobivenim za AgNP-PVP i AgNP-CTAB. Yasur i Rani (2013) pokazali su da se stabiliziranim AgNP usporava disocijacija u odnosu na AgNO_3 . Rezultati mogla istraživanja pokazali su visoku koncentraciju slobodnih iona Ag^+ u otopini AgNO_3 koji su se u promatranom vremenu mjerenja stabilnosti vezali s komponentama hranjive podloge.

Analize stabilnosti AgNP u hranjivoj podlozi provela sam i uz dodatak cisteina. Cistein snažno privlači i potiče otpuštanje iona Ag^+ s površine AgNP i time povećava koncentraciju slobodnih iona Ag^+ te utječe na površinske modifikacije AgNP (Gondikas i sur. 2012). Naime, cistein se pomoću tiolne skupine (-SH) veže za površinu AgNP te stvara kompleks s ionima Ag^+ , što potiče agregaciju susjednih AgNP stvaranjem vodikovih veza između cisteina lociranih na različitim AgNP (Mandal i sur. 2001, Zhao i Wang 2012). U svome istraživanju uočila sam da je dodatak cisteina izazvao različiti učinak na stabilnost AgNP-PVP i AgNP-

CTAB u hranjivoj podlozi. Naime, u otopini AgNP-PVP, koje su se pokazale vrlo stabilnima svih 7 dana mjerenja, nakon dodatak cisteina već u prvom satu mjerenja uočila sam pomak pika prema manjim valnim duljinama, što ukazuje na raspad AgNP i otpuštanje iona Ag^+ (Zhu i sur. 2012), vjerojatno zbog mogućeg stvaranja kompleksa Ag-cistein (Zhang i Wang 2019). Nakon dva sata, SPR pik više nije bio mjerljiv, što ukazuje na potpuni raspad AgNP-PVP, a u skladu je s od ranije poznatom sposobnošću cisteina da privlači ione Ag^+ s površine AgNP (Gondikas i sur. 2012) i time olakšava agregaciju nanočestica (Zhao i Wang 2012). S druge strane, dodatak cisteina nije značajnije utjecao na ponašanje AgNP-CTAB u hranjivoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS; čak je malo i doprinio njihovoj stabilnosti. Naime, u otopini AgNP-CTAB uz dodatak cisteina SPR pik se izgubio u drugom satu mjerenja, dok je bez dodatka cisteina raspad AgNP zabilježen već nakon trideset minuta mjerenja, što sugerira da cistein na AgNP-CTAB djeluje pozitivno, produžujući im životni vijek. Dobiveni rezultati ne slažu se s istraživanjem autora Biba i sur. (2020), gdje je zabilježena brža disocijacija AgNP-CTAB uz dodatak cisteina u odnosu na AgNP-PVP uz dodatak cisteina, ali u tom radu je ispitivana stabilnost AgNP u krutoj podlozi. Povećanu stopu agregacije AgNP-citrat u prisustvu cisteina pokazali su Zhao i Wang (2012) u modificiranoj hranjivoj podlozi M7. U prisustvu cisteina može doći do zamjene omotača na površini nanočestice i samog cisteina koji se preko svoje tiolne skupine veže za površinu AgNP, što su pokazali Gondikas i sur. (2012), koji su u svom istraživanju mjerili koncentraciju slobodnog cisteina u otopini na početku pokusa te nakon dva dana u otopini AgNP s cisteinom. Rezultati su ukazali na smanjenu koncentraciju cisteina nakon dva dana, što je objašnjeno zamjenom cisteina i omotača na površini AgNP te potencijalnom oksidacijom cisteina koji je agregirao sa slobodnim ionima Ag^+ . S obzirom da AgNP-CTAB puno brže otpušta ione Ag^+ u odnosu na AgNP-PVP, moguće je i da dolazi do bržeg otpuštanja samog omotača (Biba i sur. 2020). U tom slučaju, omotač CTAB postaje samostalna i slobodna molekula, o čijoj su fitotoksičnosti ranije izvijestili Cvjetko i sur. (2017) te Biba i sur. (2020), a cistein potencijalno odlučujuća komponentna sudbine AgNP na koju se vezao (Gondikas i sur. 2012).

Analiza otopine AgNO_3 u MilliQ vodi uz dodatak cisteina rezultirala je pojavom apsorpcijskog maksimuma na valnoj duljini od 354 nm, koji nije detektiran nakon mjerenja stabilnosti otopine samog AgNO_3 . Mogući razlog je interakcija između cisteina i velike količine slobodnih iona Ag^+ u MilliQ vodi (Zhang i Wang 2019). Apsorbancija navedenog pika rasla je do tridesete minute, a zatim se počela smanjivati. Početna manja apsorbcija vjerojatno je rezultat interakcije cisteina s ostalim slobodnim ionima iz otopine, a ne samo s ionima Ag^+ (Tejamaya i sur. 2012). Porast apsorbcije objasnila bih mogućim nastankom

novih AgNP iz postojećih slobodnih iona Ag^+ ili formiranjem malih agregata ionskoga srebra (Biba i sur. 2020). Agregati malih dimenzija i AgNP, zbog izrazito velike nestabilnosti, imaju tendenciju međusobnog agregiranja kako bi reducirali veliki omjer površine i volumena (Zhao i Wang 2012). Nastanak AgNP u 100 μM otopini AgNO_3 pripremljenih u modificiranoj, krutoj hranjivoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS ranije je objavio autor Komazec (2020).

Ranije sam spomenula da AgNP i otpušteni ioni Ag^+ započinju biokemijske promjene koje podrazumijevaju pojačano stvaranje molekula ROS, što može izazvati pojavu oksidacijskoga stresa (Zhang i sur. 2014). Jedan od pokazatelja oksidacijskoga stresa je karbonilacija proteina, koja dovodi do promjena u aktivnosti proteina te uzrokuje njihovu inhibiciju. Visoka koncentracija AgNP uzrokuje narušavanje tercijarne strukture proteina, zbog čega dolazi do konformacijskih promjena i promjena u aktivnosti proteina (Viswakarma i sur. 2017). Kako bih ispitala utjecaj različito stabiliziranih AgNP i AgNO_3 na promjene u sadržaju topivih proteina, izmjerila sam njihovu koncentraciju i utvrdila statistički značajno smanjenje nakon tretmana s AgNP-PVP uz dodatak cisteina, dok ostali tretmani s AgNP nisu pokazali značajno smanjenje u usporedbi s kontrolom. Smanjena koncentracija proteina može biti posljedica degradacije i narušavanja strukture proteina zbog djelovanja povišene koncentracije AgNP, što je induciralo pojavu oksidacijskog stresa i rezultiralo oksidacijom proteina (Jiang i sur. 2014). S druge strane, moguće je da na količinu proteina utječu i otpušteni ioni Ag^+ , o čijem su negativnom utjecaju na količinu proteina ranije izvijestili Rostami i Ehsanpour (2009), no navedeno je manje vjerojatno jer u svojim eksperimentima nisam uočila značajne razlike u koncentraciji topivih proteina između tretmana sa i bez cisteina. Nadalje, tretman s AgNO_3 nije značajno promijenio koncentraciju proteina u odnosu na kontrolu, što ukazuje na to da otpušteni ioni Ag^+ nisu negativno djelovali na proteine, vjerojatno zbog stvaranja soli sa sastojcima hranjive podloge.

Osim koncentracije topivih proteina, analizirala sam i njihovu ekspresiju SDS-PAG elektroforezom i bojanjem gelova bojom CBB i srebrovim nitratom. Bojanje gelova bojom CBB omogućava naknadne analize metodama spektrometrije masa s ciljem identifikacije proteina, dok je bojanje gelova srebrovim nitratom metoda koju načelno nije moguće kombinirati sa spektrometrijom masa, ali je puno veće osjetljivosti u odnosu na boju CBB (Weiss i sur. 2009). Navedeno objašnjava zašto sam nakon bojanja srebrovim nitratom detektirala veći broj proteinskih vrpca u odnosu na bojanje gela s bojom CBB. Tretman s AgNO_3 uz dodatak cisteina smanjio je ekspresiju gotovo svih proteina u stanici, a nešto manje smanjenje ekspresije detektirala sam i nakon tretmana s AgNP-CTAB uz dodatak cisteina u

odnosu na kontrolu. Smanjenje ekspresije proteina moguća je posljedica odgovora biljke na uvjete kojima je izložena. Autorica Biba (2016) detektirala je smanjenje ekspresije ukupnih proteina nakon tretmana klijanaca duhana s 500 μM AgNO_3 , dok je autorica Jarnević (2017) otkrila promjene u ekspresiji većine proteina koji sudjeluju u metabolizmu ugljikohidrata, fotosintezi, odgovoru na stres te odgovoru na oksidacijski stres nakon izlaganja klijanaca duhana 100 μM AgNP-citrat i AgNO_3 .

Fitotoksični učinak AgNP analiziran je u velikom broju radova (Nair i Chung 2014, Barbasz i sur. 2016, Cvjetko i sur. 2017, Tripathi i sur. 2017, Vishwakarma i sur. 2017), u kojima je pokazano da je glavni mehanizam toksičnosti AgNP pojava oksidacijskoga stresa. Naime, izlaganje česticama AgNP u biljnim stanicama inducira pojačano stvaranje molekula ROS koje oštećuju biološki važne molekule poput lipida, proteina i nukleinskih kiselina (Yasur i Rani 2013, Cvjetko i sur. 2017, Tkalec i sur. 2019). Međusobno kontradiktorne informacije dobivene prilikom istraživanja toksičnosti AgNP rezultat su raznovrsnih i promjenjivih svojstava nanočestica – veličine (Zhang i Wang 2019), koncentracije (Mylona i sur. 2020), površinskog naboja (Cvjetko i sur. 2017), vrste omotača (Yasur i Rani 2013), stope disocijacije i agregacije (Rani i sur. 2016) te eksperimentalnih uvjeta (Khan i sur. 2019) kao i odabira biljnog modela (Cvjetko i sur. 2018). Male promjene u nekim od navedenih parametara mogu drastično utjecati na ponašanje AgNP (Pang i sur. 2020). Ipak ono što je zajedničko svim biljkama, neovisno o svojstvima AgNP kojima se izlažu, jest indukcija obrambenog odgovora aktivacijom antioksidacijskoga sustava zbog novonastale promijenjene situacije u stanicama (Zaeem i sur. 2020). Kao odgovor na pojavu oksidacijskog stresa, biljke aktiviraju enzimske i neenzimske komponente antioksidacijskog sustava. Središnji enzim antioksidacijskog sustava te prvi na obrambenoj liniji je SOD, koji katalizira pretvorbu O^{2-} u H_2O_2 i O_2 . U ovom istraživanju niti jedan od ispitanih tretmana nije izazvao statistički značajnu promjenu u aktivnosti i ekspresiji enzima SOD. Ipak, nešto veću aktivnost enzima SOD zabilježila sam nakon tretmana s AgNP-PVP u odnosu na kontrolu i ostale tretmane, što se slaže s istraživanjima Peharec Štefanić i sur. (2018) te Biba (2016), koji su nakon tretmana klijanaca duhana sa 100 μM AgNP-citrat u krutoj hranjivoj podlozi MS zabilježili statistički značajno povećanje aktivnosti enzima SOD. Nakon tretmana s AgNO_3 , aktivnost SOD bila je gotovo jednaka aktivnosti kao u kontroli, što se slaže s istraživanjem Peharec Štefanić i sur. (2018), ali ne s autoricom Biba (2016) koja je zabilježila statistički značajno povećanje aktivnosti nakon tretmana klijanaca sa 100 μM AgNO_3 . Povećanje aktivnosti enzima SOD nakon tretmana s 4 mM AgNP i AgNO_3 detektirali su i Khan i sur. (2019) u kljancima vrste *Pennisetum*

glaucum koji su rasli u hranjivoj podlozi Hoagland s polovičnom koncentracijom makroelemenata, što može biti posljedica vrlo visoke koncentracije AgNP i AgNO₃ primijenjene u njihovom istraživanju u usporedbi s mojim. Promjene u aktivnosti enzima SOD analizirala sam nakon razdvajanja proteina elektroforezom u nativnim uvjetima, te zabilježila povećanje aktivnosti izoforme SOD1 nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNP-CTAB, ali ne i s AgNO₃. S navedenim rezultatima slažu se rezultati autorice Biba (2016), koja je u svome istraživanju detektirala povećanje aktivnosti svih izoformi enzima SOD nakon tretmana s AgNP-citrat, dok je tretman s AgNO₃ smanjio intenzitet većine izoformi enzima SOD. Promjene u ekspresiji enzima SOD analizirala sam imunodetekcijom te utvrdila smanjenu ekspresiju izoforme SOD3 nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNP-CTAB u odnosu na kontrolu, što se slaže s rezultatima Biba (2016). Kombinirani tretmani AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ s cisteinom izazvali su smanjenje aktivnosti enzima SOD u odnosu na kontrolu i tretmane bez dodatka cisteina, iako je statistički značajno smanjenje aktivnosti zabilježeno nakon kombiniranog tretmana AgNP-PVP i cisteina. Navedeno je moguća posljedica akumulacije molekula ROS koje su uzrokovale smanjenje ili inaktivaciju enzima SOD, čime je narušena sposobnost antioksidacijskog sustava da popravi novonastalo stanje u stanici (Cvjetko i sur. 2018, Souza i sur. 2020). Analiza ekspresije izoformi SOD pokazala je da je dodatak cisteina u sve tretmane uzrokovao smanjenje ekspresije izoformi SOD2 i SOD3 u odnosu na tretmane bez cisteina. Istraživanje autora Yin i sur. (2011), koji su klijance *Lolium multiflorum* tretirali kombinacijama 0,37 mM AgNP stabiliziranih s arapskom gumom (AgNP-GA) i AgNO₃ s cisteinom, pokazalo je da cistein ima učinak na smanjenje toksičnosti AgNO₃ u kombiniranim tretmanima u odnosu na same AgNO₃, dok isto nije bilo potvrđeno nakon kombiniranog tretmana s AgNP-GA.

Katalaza i brojne peroksidaze sudjeluju u uklanjanju H₂O₂ koji nastaje kao produkt dismutacije O²⁻, a potrebno ga je neutralizirati. Katalaza je jedinstveni enzim antioksidacijskog sustava koji katalizira reakciju pretvorbe H₂O₂ u H₂O i O₂ (Sharma i sur. 2012). Spektrofotometrijskim mjerenjem aktivnosti enzima CAT nisam zabilježila promjene ni u jednom tretmanu s AgNP u odnosu na kontrolu, što je u skladu s rezultatima koje su dobili Pereira i sur. (2018) nakon izlaganja vodene leće *L. minor* česticama AgNP-PVP, Peharec Štefanić i sur. (2018) nakon tretiranja klijanaca duhana česticama AgNP-citrat te Shaikhaldein i sur. (2020) u vrsti *Maerua oblongifolia* nakon tretmana s AgNP bez omotača. Tretman s AgNO₃ nije izazvao promjenu u aktivnosti enzima CAT, što je oprečno rezultatima koje su zabilježili Biba (2016), Peharec Štefanić i sur. (2018) i Khan i sur. (2019), u čijim je istraživanjima detektirano statistički značajno smanjenje aktivnosti enzima CAT nakon

tretmana s AgNO_3 u odnosu na kontrolu. Imunokemijskom detekcijom zabilježila sam pojačanu ekspresiju enzima CAT nakon tretmana s AgNP-CTAB te smanjenu ekspresiju nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO_3 u odnosu na kontrolu, što je u skladu s rezultatima autorice Biba (2016). Navedeni rezultati moguća su posljedica interakcije otpuštenih Ag^+ s tiolnom skupinom na proteinu CAT, zbog čega je došlo do narušavanja tercijarne strukture i inhibicije funkcije katalaze. Sličan fenomen opisali su Atli i sur. (2006) nakon izlaganja slatkovodne ribe *Oreochromis niloticus* različitim koncentracijama iona Ag^+ .

Askorbat peroksidaza najzastupljeniji je enzim antioksidacijskog sustava. Katalizira reakciju pretvorbe H_2O_2 u H_2O i O_2 , a prisutan je u svim dijelovima stanice (Sharma i sur. 2012). U svom istraživanju zabilježila sam statistički značajno smanjenje aktivnosti enzima APX nakon tretmana s AgNP-PVP, što je u skladu s rezultatima istraživanja Khan i sur. (2019) na klijancima vrste *P. glaucum* te istraživanju autora Vishwakarma i sur. (2017) na klijancima vrste *Brassica sp.*, nakon tretmana s AgNP. Jadcak i sur. (2020) su nakon izlaganja lavande *Lavandula angustifolia* tretmanu s $46 \mu\text{M}$ AgNP u krutoj modificiranoj hranjivoj podlozi MS (Andrys i Kulpa 2018) izmjerili povećanje aktivnosti APX u odnosu na kontrolu, no s daljnjim povećanjem koncentracije AgNP detektirano je smanjenje njegove aktivnosti. Navedeno ukazuje na vjerojatnu inhibiciju enzima APX usred djelovanja visoke koncentracije AgNP. Nakon tretmana s AgNP-CTAB i AgNO_3 nisam zabilježila značajnu promjenu u aktivnost enzima APX u odnosu na kontrolu. Jednake rezultate dobili su Cvjetko i sur. (2017) nakon tretmana korijena luka *Allium cepa* sa $100 \mu\text{M}$ AgNP-CTAB i AgNO_3 u MilliQ vodi. Analizom aktivnosti APX u gelu detektirala sam povećan intenzitet izoformi APX4 i APX5 nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO_3 te izoformi APX7 i APX8 nakon tretmana s AgNP-CTAB u odnosu na kontrolu. Većina izoformi bile su jednakog intenziteta u kontroli i svim tretmanima, što se slaže s istraživanjem autorice Biba (2016). Imunodetekcijom anti-APX antitijelom detektirala sam pojačanu ekspresiju izoformi APX6 - APX8 nakon svih tretmana u odnosu na kontrolu, dok je autorica Biba (2016) zabilježila vrlo slabe intenzitete tih vrpce nakon tretmana s AgNP-citrat i AgNO_3 u krutoj hranjivoj podlozi; suprotni rezultati vjerojatno su posljedica različitih uvjeta izlaganja i/ili omotača primijenjenih za stabilizaciju AgNP. Kombinirani tretman AgNP-PVP i cistein uzrokovao je značajno povećanje aktivnosti u odnosu na tretman AgNP-PVP. Nadalje, analizom aktivnosti enzima u gelu detektirala sam izoforme APX7 i APX8 koje su bile intenzivnijeg signala nakon tretmana AgNP-PVP uz dodatak cisteina u odnosu na kontrolu i tretman s AgNP-PVP, dok je imunodetekcijom detektirana pojačana ekspresija izoformi APX5 i APX6 nakon kombiniranog tretmana AgNP-PVP i cisteina. Navedeni rezultati mogu se povezati s pozitivnim učinkom cisteina na smanjenje

fitotoksičnosti AgNP (Biba i sur. 2020). Kombinirani tretman AgNP-CTAB s cisteinom izazvao je značajno smanjenje aktivnosti enzima APX u odnosu na kontrolu. Iako je dodatak cisteina na tretman s AgNP-CTAB povećao stabilnost samih nanočestica, uzrokovao je smanjenje aktivnosti i ekspresije enzima APX u odnosu na kontrolu i tretman samog AgNP-CTAB, što je moguća posljedica zamjene cisteina i omotača CTAB na površini AgNP. Sličan fenomen ranije su opisali Biba i sur. (2020) koji su u svome istraživanju utvrdili povećanu fitotoksičnost nakon kombiniranog tretmana AgNP-CTAB i cisteina u odnosu na same AgNP-CTAB. Autorica Matić (2018) u svome je istraživanju opisala negativan učinak samog omotača CTAB, koji je uzrokovao značajno smanjenje aktivnosti enzima APX u klijancima duhana. Navedeno ukazuje na moguću inhibiciju APX usred djelovanja visoke koncentracije AgNP (Navarro i sur. 2008). Kombinirani tretmani AgNO₃ s cisteinom izazvali su značajno smanjenje aktivnosti enzima te slabiji intenzitet izoformi APX1 - APX3, APX6 i APX9 u gelu u odnosu na kontrolu. Ovaj rezultat moguće je povezati s ranije spomenutim nastankom AgNP u navedenom tretmanu, koje nisu stabilizirane, zbog čega uzrokuju smanjenje aktivnosti enzima.

Pirogalol peroksidaza nespecifična je peroksidaza koja katalizira reakciju pretvorbe H₂O₂ u H₂O i O₂. U svom istraživanju nisam zabilježila značajne promjene u aktivnosti enzima PPX u ispitanim tretmanima u odnosu na kontrolu. Moji rezultati nisu u skladu s do sada objavljenim rezultatima drugih istraživanja u kojima je zabilježeno ili smanjenje (Biba 2016, Peharec Štefanić i sur. 2018, Khan i sur. 2019) ili povećanje aktivnosti enzima PPX (Cvjetko i sur. 2017) nakon tretmana a AgNP i AgNO₃. No, ovdje je važno napomenuti da su u navedenim istraživanjima kao medij za izlaganje korištene ili voda ili kruta hranjiva podloga te da su ispitane različite biljne vrste i AgNP s različitim omotačima, što ima veliki utjecaj na konačne rezultate (Tkalec i sur. 2019). S druge strane, nakon provedene elektroforeze u nativnim uvjetima detektirala sam pojačan intenzitet izoformi PPX2 i PPX3 u svim tretmanima sa samim AgNP i AgNO₃ u odnosu na kontrolu, što se slaže s istraživanjem autorice Biba (2016). Imunodetekcijom detektirala sam pojačanu ekspresiju izoforme PPX4 (tretman AgNP-PVP), smanjenu ekspresiju izoforme PPX3 (tretman AgNP-CTAB) te pojačanu ekspresiju nekoliko izoformi nakon tretmana s AgNO₃, dok je autorica Biba (2016) zabilježila smanjenje ekspresije izoformi enzima PPX nakon tretmana s AgNP-citrat i AgNO₃. Dodatak cisteina uzrokovao je značajno smanjenje aktivnosti enzima PPX nakon tretmana s AgNP-CTAB te AgNO₃, dok je u gelu zabilježeno smanjenje aktivnosti nakon svih kombiniranih tretmana s cisteinom u odnosu na tretmane bez cisteina. Smanjenje aktivnosti u gelu između kombiniranih tretmana i kontrole detektirala sam nakon kombiniranog tretmana AgNO₃ i cisteina. Dodatak cisteina nije ublažio učinak ionskoga srebra što je suprotno

opažanjima Yin i sur. (2011), koji su pokazali da cistein ima učinak na smanjenje toksičnosti AgNO₃ u kombiniranim tretmanima s cisteinom u odnosu na same AgNO₃. Bitno je napomenuti da uloga enzima PPX nije samo obrana od oksidacijskoga stresa već i brojni drugi fiziološki procesi poput metabolizma stanične stijenke i auksina, što predstavlja važan razlog održavanja relativno nepromijenjene aktivnosti enzima (Pandey i sur. 2017).

Tijekom analize rezultata aktivnosti enzima u gelu važno je imati na umu da su se nativnom elektroforezom razdvojile samo izoforme proteina negativnog naboja, koje su se nastavile kretati prema pozitivnoj anodi. Navedeno predstavlja mogući razlog odstupanja aktivnosti enzima u gelu u odnosu na aktivnost dobivenu spektrofotometrijskim mjerenjem. Također, spektrofotometrijskim mjerenjem aktivnosti nekih enzima zabilježene su velike standardne pogreške unutar tretmana, što je posljedica analize rezultata iz dva neovisna pokusa. Zbog duljeg vremena skladištenja jednog seta uzoraka moguće je da je došlo do razgradnje ili narušavanja stabilnosti enzima. Poznato je da na stabilnost enzima mogu utjecati male promjene u razlici temperatura, pH i sl. (Eijsink i sur. 2005).

Tretmani s AgNP-PVP, AgNP-CTAB, AgNO₃ te njihove kombinacije s cisteinom utjecali su na promjenu aktivnosti i ekspresije analiziranih enzima, što ukazuje na pojavu oksidacijskoga stresa u stanici. U uvjetima blagog stresa biljka povećava aktivnost antioksidacijskih enzima te se uspješno brani od povećanog broja molekula ROS. U uvjetima jakog ili kontinuiranog stresa, antioksidacijski sustav postaje zasićen i preopterećen, tj. doživljava vrhunac svoje sposobnosti rada zbog čega se počinju događati neočekivane aktivnosti kao što je smanjenje aktivnosti enzima važnih za obranu (Qian i sur. 2013). Prisutnost AgNP djeluje i na smanjenje sinteze enzima te njihovu direktnu inhibiciju (Souza i sur. 2020). Nemogućnost odgovora enzimskih komponenti na oksidacijski stres u stanici povećava važnost neenzimskih komponenti antioksidacijskoga sustava u odgovoru i obrani stanice (Barbasz i sur. 2016). Radi stvaranja kompleksnije slike predlažem provedbu dodatnih eksperimenata - mjerenje slobodnih iona Ag⁺ te neenzimskih komponenti kao što su prolin, glutation, fenoli itd. Poželjno bi bilo ispitati svojstva AgNP nakon dodatka cisteina, odrediti ostale oksidacijske parametre – stupanj oštećenosti lipida i molekule DNA te odrediti koncentraciju molekula ROS u stanici. Dobiveni podaci pružili bi vrlo detaljan uvid u toksičnost AgNP.

ZAKLJUČAK

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja mogu se izvesti sljedeći zaključci:

- AgNP-PVP pokazale su se stabilnijima u hranjivoj podlozi ½ MS u odnosu na AgNP-CTAB.
- Dodatak cisteina narušio je stabilnost AgNP-PVP te kratkoročno produžio stabilnost AgNP-CTAB u hranjivoj podlozi ½ MS.
- Usporebom tretmana s različito stabiliziranim AgNP može se zaključiti da fitotoksičnost AgNP ovisi o omotaču za stabilizaciju; AgNP-CTAB toksičnije su u odnosu na AgNP-PVP, što je rezultiralo većom promjenom u aktivnosti i ekspresiji enzima antioksidacijskog sustava.
- Usporedbom tretmana s AgNP i AgNO₃ može se zaključiti da fitotoksičnost AgNP ne proizlazi isključivo od otpuštanja iona Ag⁺; AgNP-CTAB pokazale su najveću toksičnost, dok su AgNP-PVP pokazale manje toksične učinke u odnosu na AgNO₃.
- Dodatak cisteina nije utjecao na fitotoksičnost AgNP-PVP, što pokazuje da u navedenom tretmanu toksičnost proizlazi iz samih nanočestica, ali je djelomično ublažio toksičan učinak AgNP-CTAB, čija toksičnost proizlazi iz otpuštenih Ag⁺ ili samog omotača CTAB.

POPIS LITERATURE

6. POPIS LITERATURE

- Aebi M. (1984): Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105: 121-126.
- Andrys D., Kulpa D. (2018): *In vitro* propagation affects the composition of narrow-leaved lavender essential oils. *Acta Chromatographica* 30: 225-230.
- Atli G., Alptekin Ö., Tükel S., Canli M. (2006): Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 143: 218-224.
- Balen B., Pavoković D., Peharec Štefanić P., Krsnik-Rasol M. (2011): Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. Hrvatska sveučilišna naknada, Zagreb.
- Balen B. (2016): Promjene u ekspresiji biljnih proteina izazvane nanočesticama srebra. *Educatio Biologiae* 2: 115-131.
- Barbasz A., Kreczmer B., Oćwieja M. (2016): Effects of exposure of callus cells of two wheat varieties to silver nanoparticles and silver salt (AgNO₃). *Acta Physiologiae Plantarum* 38: 1-11.
- Beauchamp C., Fridovich I. (1971): Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44: 276-287.
- Biba R. (2016): Utjecaj nanočestica srebra na pojavu oksidacijskog stresa i ekspresiju proteina u klijancima duhana (*Nicotiana tabacum*). Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb.
- Biba R., Matić D., Lyons D.M., Peharec Štefanić P., Cvjetko P., Tkalec M., Pavoković D., Balen B. (2020): Coating-dependent effects of silver nanoparticles on tobacco seed germination and early growth. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 3441-3460.
- Biba R, Tkalec M, Cvjetko P, Peharec Štefanić P, Šikić S, Pavoković D, Balen B. (2021): Silver nanoparticles affect germination and photosynthesis in tobacco seedlings. *Acta Botanica Croatica* doi: 10.37427/botcro-2020-029.
- Blaser S.A., Scheringer M., MacLeod M., Hungerbühler K. (2008): Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *Science of the Total Environment* 390: 396-409.
- Blum H., Beier H., Gross H.J. (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical*

Biochemistry 72: 248-254.

- Brar D.S., Khush. G.S. (1994): Cell and tissue culture for plant improvement. U: Basra A.S. (ur.) Mechanisms for plant growth and improved productivity – Modern approaches. New York. Marcel Dekker Inc, str. 229-278.
- Buchanan B., Gruissem W., Jones R.L. (2002): Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville.
- Buzea C., Pacheco I., Robbie K. (2007): Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. Biointerphases 2: 17-71.
- Campisi S., Schiavoni M., Chan-Thaw C.E., Villa A. (2016): Untangling the role of the capping agent in nanocatalysis: Recent advances and perspectives. Catalysts 6: 185-206.
- Chance B., Maehly A.C. (1955): Assay of catalases and peroxidases. Methods in Enzymology 2: 764-775.
- Chen X., Chen Y., Zhou X., Hu J. (2013): Detection of Ag⁺ ions and cysteine based on chelation actions between Ag⁺ ions and guanine bases. Talanta 107: 277-283.
- Cvjetko P., Milošić A., Domijan A., 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.
- Cvjetko P., Zovko M., Peharec Štefanić P., Biba R., Tkalec M., Domijan A., Vinković Vrček I., Letofsky-Papst I., Šikić S., Balen B. (2018): Phytotoxic effects of silver nanoparticles in tobacco plants. Environmental Science and Pollution Research 25: 5590-5602.
- Devereux G. (2006): ABC of chronic obstructive pulmonary disease. Definition, epidemiology, and risk factors. British Medical Journal 332: 1142–1144.
- Eijsink V.G.H., Gåseidnes S., Borchert T. V., van den Burg B. (2005): Directed evolution of enzyme stability. Biomolecular Engineering 22: 21-30.
- Flick C.E., Evans D.A. (1984): Tobacco. U: Sharp W.R., Evans D.A., Ammirato P.V., Yamada Y. (ur.) Hand book of plant cell culture. London. Collier Macmillan Publishers, str. 606-630.
- Ganapathi T.R., Suprasanna P., Rao P.S., Bapat V.A. (2004): Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)- A model system for tissue culture interventions and genetic engineering. Indian Journal of Biotechnology 3: 171-184.
- Gaspar T., Penel C., Hagege D., Greppin H. (1991): Peroxidases in plant growth, differentiation and developmental processes. U: Lobarzewski, J., Greppin, H., Penel, C. i Gaspar Th.

- (ur.) Biochemical, molecular and physiological aspects of plant peroxidases. Lublin, University M. Curie-Sklodowska, str. 249-280.
- Geisler-Lee J., Brooks M., Gerfen J.R., Wang Q., Fotis C., Sparer A., Ma X., Berg R.H., Geisler M. (2014): Reproductive toxicity and life history study of silver nanoparticle effect, uptake and transport in *Arabidopsis thaliana*. *Nanomaterials* 4: 301-318.
- Gondikas A.P., Morris A., Reinsch B.C., Marinakos S.M., Lowry G.V., Hsu-Kim H. (2012): Cysteine-induced modifications of zero-valent silver nanomaterials: Implications for particle surface chemistry, aggregation, dissolution, and silver speciation. *Environmental Science and Technology* 46: 7037-7045.
- Gubbins E.J., Batty L.C., Lead J.R. (2011): Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. *Environmental Pollution* 159: 1551-1559.
- Gunsolus I.L., Mousavi M.P., Hussein K., Bühlmann P.1, Haynes C.L. (2015): Effects of humic and fulvic acids on silver nanoparticle stability, dissolution, and toxicity. *Environmental Science and Technology* 49: 8078-8086.
- Gupta A.S., Heinen J.L., Holaday A.S., Burke J.J., Allen R.D. (1993): Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 1629-1633.
- Handing K.B., Niedzialkowska E., Shabalin I.G., Kuhn M.L., Zheng H., Minor W. (2019): Characterizing metal binding sites in proteins with X-ray crystallography. *Nature Protocols* 13: 1062-1090.
- Haramina P.T. (2008): Rizici uporabe nanočestica. *Polimeri* 29: 115.
- Hoagland D.R., Snyder W.C. (1933): Nutrition of strawberry plants under controlled conditions. *Proceeding America Society of Horticultural Science* 30: 288-294.
- Ivanković M. (2011): Nanomaterijali i nanoproizvodi – mogućnosti i rizici. *Polimeri: Časopis za plastiku i gumu* 32: 23-28.
- Jadcak P., Kulpa D., Drozd R., Przewodowski W., Przewodowska A. (2020): Effect of AuNPs and AgNPs on the antioxidant system and antioxidant activity of lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) from in vitro cultures. *Molecules* 25: 5511-5529.
- Jarnević M. (2017): Utjecaj nanočestica i iona srebra na proteom duhana (*Nicotiana tabacum* L.). Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb.
- Jiang H.S., Qiu X.N., Li G.B., Li W., Yin L.Y. (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: 1398-1405.
- Jiménez A., Hernández J.A., Del Río L.A., Sevilla F. (1997): Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiology* 114: 275-284.
- Kabir E., Kim K., Yip A.C.K., Sohn J.R. (2018): Environmental impacts of nanomaterials. *Journal of Environmental Management* 225: 261-271.
- Khan I., Raza M.A., Khalid M.H.B., Awan S.A., Raja N.I., Zhang X., Min S., Wu B.C., Hassan M.J., Huang L. (2019): Physiological and biochemical responses of pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.) seedlings exposed to silver nitrate (AgNO₃) and silver nanoparticles (AgNPs). *International Journal of Environmental Research and Public Health* 16: 1-17.
- Komazec B. (2020): Utjecaj nanočestica i iona srebra na nakupljanje i transport auksina u korijenu uročnjaka *Arabidopsis thaliana*. Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb.
- Kumar K., Venkatesh N., Bhowmik H., Kuila A. (2018): Metallic nanoparticle: A review. *Biomedical Journal of Scientific and Technical Research* 4: 3765-3775.
- Kvitek L., Panacek A., Pucek R., Soukupova J., Vanickova M., Kolar M., Zboril R. (2011): Antibacterial activity and toxicity of silver – nanosilver versus ionic silver. *Journal of Physics Conference Series* 304: 012029.
- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Levard C., Hotze E.M., Colman B.P., Dale A.L., Truong L., Yang X.Y., Bone A.J., Brown G.E.Jr, Tanguay R.L., Di Giulio R.T., Bernhardt E.S., Meyer J.N., Wiesner M.R., Lowry G.V (2014): Sulfidation of silver nanoparticles: Natural antidote to their toxicity. *Environmental Science and Technology* 47: 13440-13448.
- Mandal S., Gole A., Lala N., Gonnade R., Ganvir V., Sastry M. (2001): Studies on the reversible aggregation of cysteine-capped colloidal silver particles interconnected via hydrogen bonds. *Langmuir* 17: 6262-6268.
- Matić D. (2018): Fitotoksični učinci nanočestica srebra stabiliziranih s različitim omotačima na duhan (*Nicotiana tabacum* L.). Diplomski rad. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Zagreb.
- Mittler R., Zilinskas B.A. (1993): Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Analytical*

Biochemistry 212: 540-546.

- Mittler R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in Plant Science 7: 405-410.
- Mody V.V., Siwale R., Singh A., Mody H.R. (2010): Introduction to metallic nanoparticles. Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences 2: 282-289.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum 15: 473-479.
- Mylona Z., Panteris E., Kevrekidis T., Malea P. (2020): Silver nanoparticle toxicity effect on the seagrass *Halophila stipulacea*. Ecotoxicology and Environmental Safety 189: 109925.
- Nair P.M.G., Chung I.M. (2014): Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. Chemosphere 112: 105-113.
- Nakano Y., Asada K. (1981): Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and Cell Physiology 22: 867-880.
- Navarro E., Baun A., Behra R., Hartmann N.B., Filser J., Miao A.J., Quigg A., Santschi P.H., Sigg L. (2008): Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. Ecotoxicology 17: 372-386.
- Nilapwar S.M., Nardelli M., Westerhoff H.V., Verma M. (2011): Absorption spectroscopy. Methods in Enzymology 500: 59-75.
- Pandey S., Fartyal D., Agarwal A. i Shukla T. (2017): Abiotic stress tolerance in plants: Myriad roles of ascorbate peroxidase. Frontiers in Plant Science 8: 1-13.
- Pang C., Zhang P., Mu Y., Ren Y., Zhao B. (2020): Transformation and cytotoxicity of surface-modified silver nanoparticles undergoing long-term aging. Nanomaterials 10: 1-11.
- Park Y. (2014): A new paradigm shift for the green synthesis of antibacterial silver nanoparticles utilizing plant extracts. Toxicological Research 30: 169-178.
- Peharec Štefanić P., Cvjetko P., Biba R., Domijan A.M., 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.
- Pereira S.P.P., Jesus F., Aguiar S., Oliveira R., Fernandes M., Ranville J., Nogueira A.J.A. (2018): Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor*: Surface coating and exposure period-related effects. Science of the Total Environment 618: 1389-1399.
- Pevalek-Kozlina B. (2003): Fiziologija bilja. Profil International. Zagreb.

- Qian H., Peng X., Han X., Ren J., Sun L., Fu Z. (2013): Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Environmental Sciences* 25: 1947-1955.
- Rani P.U., Yasur J., Loke K.S., Dutta D. (2016): Effect of synthetic and biosynthesized silver nanoparticles on growth, physiology and oxidative stress of water hyacinth: *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms. *Acta Physiologiae Plantarum* 38: 1-9.
- Reidy B., Haase A., Luch A., Dawson K.A., Lynch I. (2013): Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: a critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications. *Materials (Basel)* 6: 2295-2350.
- Rico C.M., Majumdar S., Duarte-Gardea M., Peralta-Videa J.R., Gardea-Torresdey J.L. (2011): Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 3485-3498.
- Rostami F., Ehsanpour A.A. (2009): Application of silver thiosulfate (STS) on silver accumulation and protein pattern of potato (*Solanum tuberosum* L.) under in vitro culture. *Malaysian Applied Biology* 38: 46-54.
- Sekhon B.S. (2014): Nanotechnology in agri-food production: an overview. *Nanotechnology, Science and Applications* 20: 31-53.
- Shaikhaldein H.O., Al-Qurainy F., Nadeem M., Khan S., Tarroum M., Salih A.M. (2020): Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Ochradenus arabicus* and their physiological effect on *Maerua oblongifolia* raised in vitro. *Scientific Reports* 10: 1-8.
- Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli M. (2012): Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany* 2012: 1-26.
- Sharma V.K., Siskova K.M., Zboril R., Gardea-Torresdey J.L. (2014): Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: fate, stability and toxicity. *Advances in Colloid and Interface Science* 204: 15-34.
- Silva T., Pokhrel L.R., Dubey B., Tolaymat T.M., Maier K.J., Liu X. (2014): Particle size, surface charge and concentration dependent ecotoxicity of three organo-coated silver nanoparticles: comparison between general linear model-predicted and observed toxicity. *Science of the Total Environment* 15: 968-976.
- Souza I.R., Silva L.R., Fernandes L.S.P., Salgado L.D., Silva de Assis H.C., Firak D.S., Bach L., Filho R.S., Voigt C.L., Barros A.C., Peralta-Zamora P., Mattoso N., Franco C.R.C.,

- Medeiros L.C., Marcon B.H., Cestari M.M., Sant'Anna-Santos B.F., Leme D.M. (2020): Visible-light reduced silver nanoparticles' toxicity in *Allium cepa* test system. *Environmental Pollution* 257: 113551.
- Tejamaya M., Rimer I., Merrifield R.C., Lead J.R. (2012): Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Environmental Science and Technology* 46: 7011-7017.
- Tilaki R.M., Iraj Zad A., Mahdavi S.M. (2006): Stability, size and optical properties of silver nanoparticles prepared by laser ablation in different carrier media. *Applied Physics A* 219: 215-219.
- Tkalec M., Peharec Štefanić P., Balen B. (2019): Phytotoxicity of silver nanoparticles and defence mechanisms. U: Kumar Verma S., Kumar Das A. (ur.) *Analysis, fate, and toxicity of engineered nanomaterials in plants*. Amsterdam, Elsevier, str. 145-198.
- Tripathi D.K., Singh S., Singh S., Srivastava P.K., Singh V.P., Singh S., Prasad S.M., Singh P.K., Dubey N.K., Pandey A.C., Chauhan D.K. (2017): Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 110: 167-177.
- Ventola C.L. (2015): The antibiotic resistance crisis Part 1: Causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics* 40: 277-283.
- Vishwakarma K., Shweta G., Upadhyay N., Singh J., Liu S., Singh V.P., Prasad S.M., Chauhan D.K., Tripathi D.K., Sharma S. (2017): Differential phytotoxic impact of plant mediated silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate (AgNO₃) on *Brassica sp.* *Frontiers in Plant Science* 8: 1-12.
- Wei L., Lu J., Xu H., Patel A., Chen Z.S., Chen G. (2015): Silver nanoparticles: Synthesis, properties, and therapeutic applications. *Drug Discovery Today* 20: 595-601.
- Weiss W., Weiland F., Görg A. (2009): Protein detection and quantitation technologies for gel-based proteome analysis. *Methods in Molecular Biology* 564: 59-82.
- Willekens H., Inze D., Van Montagu M., Van Camp W. (1995): Catalases in plants. *Molecular Breeding* 1: 207-228.
- Woodbury W.A., Spencer K., Stahlmann M.A. (1971): An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Analytical Biochemistry* 44: 301-305.
- Xie X., He Z., Chen N., Tang Z., Wang Q. i Cai Y. (2019): The roles of environmental factors in regulation of oxidative stress in plant. *BioMed Research International* 4: 1-11.

- Yasur J., Rani P.U. (2013): Environmental effects of nanosilver: Impact on castor seed germination, seedling growth, and plant physiology. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 8636-8648.
- Yin L., Cheng Y., Espinasse B., Colman B.P., Auffan M., Wiesner M., Rose J., Liu J., Bernhardt E.S. (2011): More than the ions: The effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental Science and Technology* 45: 2360-2367.
- Yu A., Dovnar R.I., Id A.V.N. (2018): Plasmon resonance of silver nanoparticles as a method of increasing their antibacterial action. *Antibiotics* 7: 80.
- Zaeem A, Drouet S., Anjum S., Khurshid R., Younas M., Blondeau J.P., Tungmunnithum D., Giglioli-Guivarch N., Hano C., Abbasi B.H. (2020): Effects of biogenic zinc oxide nanoparticles on growth and oxidative stress response in flax seedlings vs. in vitro cultures: A comparative analysis. *Biomolecules* 10: 1-16.
- Zekić E., Vuković Ž., Halkijević I., (2018): Primjena nanotehnologije u pročišćavanju otpadnih voda. *Građevinar* 70: 315-323.
- Zhang T., Wang L., Chen Q., Chen C. (2014): Cytotoxic potential of silver nanoparticles. *Yonsei Medical Journal* 55: 283-291.
- Zhang L., Wang W.X. (2019): Dominant role of silver ions in silver nanoparticle toxicity to a unicellular alga: Evidence from luminogen imaging. *Environmental Science and Technology* 53: 494-502.
- Zhao C.M., Wang W.X. (2012): Size-dependent uptake of silver nanoparticles in *Daphnia magna*. *Environmental Science and Technology* 46: 11345-11351.
- Zhu M., Nie G., Meng H., Xia T., Nel A., Zhao Y. (2012): Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport and fate. *Accounts of Chemical Research* 46: 622-631.

<https://www.nano.gov/> (pristupljeno: 13.09.2020.)

<https://nanocomposix.com/pages/polyvinylpyrrolidone-pvp-surface> (pristupljeno: 30.10.2020.)

<https://nanocomposix.com/pages/silver-nanoparticles-optical-properties#target-> (pristupljeno: 11.12.2020)

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 25.04.1996. godine u Zagrebu, gdje sam završila Osnovnu školu Šestine i Drugu gimnaziju. Preddiplomski studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisala sam 2015. godine te završila obranom završnoga rada pod naslovom: „Arktička podzemna vjeverica (*Spermophilus parryi*) i crni medvjed (*Ursus americanus*) kao modeli za istraživanje humane kriogeneze”. Diplomski studij molekularne biologije upisala sam 2018. godine. Tijekom studija sam položila tečaj za osposobljavanje osoba koje rade s pokusnim životinjama (LabAnim A kategorija) te odradila niz laboratorijskih stručnih praksi u Institutu Ruđer Bošković te na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu. Sudjelovala sam u izvedbi edukativno-zabavne manifestacije „Noć biologije”, pomogla u organizaciji kongresa *Central European Genome Stability and Dynamics Meeting* te sam održala dva samostalna usmena izlaganja u sklopu manifestacije BioStudoLogija. Volontirala sam na Europskim sveučilišnim igrama u Zagrebu i Rijeci te na UNICEF-ovim humanitarnim skupovima. Imam dugogodišnje radno iskustvo kao animator na dječjim rođendanima te kao student u ispomoći u trgovini za kućne ljubimce. Aktivno održavam instrukcije iz matematike i biologije.