

# Utjecaj nanočestica srebra na biljni proteom

---

**Kobelščak, Luka**

**Undergraduate thesis / Završni 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:155512>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-08-18**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

**UTJECAJ NANOČESTICA SREBRA NA BILJNI PROTEOM**

**INFLUENCE OF SILVER NANOPARTICLES ON PLANT PROTEOME**

**SEMINARSKI RAD**

Luka Kobelščak

Preddiplomski studij Znanosti o okolišu

(Undergraduate Study of Environmental Sciences)

Mentor: prof. dr. sc. Biljana Balen

Zagreb, 2021.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OSNOVNI POJMOVI .....	2
2.1. Nanočestice srebra .....	2
2.1.1. Sinteza i stabilizacija .....	2
2.1.2. Svojstva .....	3
2.2. Abiotički stres .....	4
3. BILJNA PROTEOMIKA .....	5
3.1. Primjena biljne proteomike u određivanju toksičnosti AgNP .....	6
4. ISTRAŽIVANJA NA BILJKAMA .....	7
4.1. Riža ( <i>Oryza sativa</i> L.) .....	7
4.2. Pšenica ( <i>Triticum aestivum</i> L.) .....	7
4.3. Soja ( <i>Glycine max</i> L.) .....	9
4.4. Klijanci duhana ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.) .....	10
4.5. Odrasle biljke duhana ( <i>Nicotiana tabacum</i> L.) .....	11
4.5.1. Proteom korijena .....	11
4.5.2. Proteom lista .....	13
5. ZAKLJUČAK .....	14
6. POPIS LITERATURE .....	15
7. SAŽETAK .....	20
8. SUMMARY .....	20

## 1. UVOD

Nanomaterijali su kemijske tvari čije se dimenzije mjere na nanometarskoj skali, s barem jednom dimenzijom između 1 i 100 nm. Postoji mnogo vrsta nanomaterijala, no najčešće korištene su nanočestice srebra (eng. *Silver nanoparticles*, AgNPs). Nanočestice srebra su poznate po svojim antibakterijskim i antifungalnim svojstvima, zbog kojih se često dodaju u razne potrošačke proizvode poput boja, tekstila, sportske opreme te u poljoprivredne proizvode (Peharec Štefanić i sur., 2019). Postoji rizik od povećane bioraspodjelivosti AgNP u različitim medijima koji bi mogli imati negativne posljedice na biljke, životinje i ljude. Onečišćenje uzrokovano česticama AgNP, osobito zagađenje tla i vodenih resursa, ubrzano je kao rezultat globalne industrijalizacije i smatra se velikom opasnošću za zajednice u cijelom svijetu (Mirzajani i sur., 2014).

Biljke imaju važnu ulogu u akumulaciji i biodistribuciji mnogih tvari koje su ispuštene u okoliš, stoga predstavljaju potencijalni put za prijenos AgNP, u prehrambenom lancu (Peharec Štefanić i sur., 2019). Biljke mogu doći pod utjecaj AgNP indirektno, putem proizvoda koji sadrže AgNP, ili mogu biti direktno izložene AgNP kroz poljoprivredne proizvode, budući da se nanotehnologija primjenjuje u proizvodnji biljaka kako bi se potaknuo njihov rast te kako bi se kontrolirala pojava nametnika i bolesti. Toksikološka istraživanja provedena na biljkama pokazuju pozitivne, negativne i neutralne učinke AgNP. Učinci ovise o raznim faktorima koji reguliraju unos i akumulaciju u biljkama te ovise o starosti i vrsti biljke, veličini i koncentraciji AgNP te o uvjetima izlaganja (Tkalec i sur., 2019).

Tehnike u proteomici koje detektiraju kvantitativne i kvalitativne promjene u ekspresiji proteina su olakšale identifikaciju proteina koji su povezani sa specifičnim okolišnim podražajem. Nadalje, istraživanja proteoma pokazuju da AgNP mogu interagirati s različitim staničnim metaboličkim procesima poput sinteze proteina i apoptoze (Peharec Štefanić i sur., 2019).

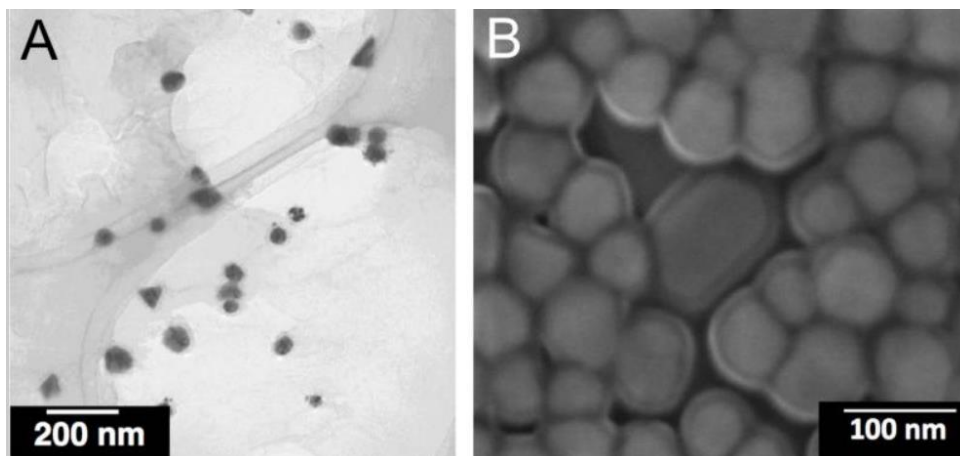
## 2. OSNOVNI POJMOVI

### 2.1. Nanočestice srebra

#### 2.1.1. Sinteza i stabilizacija

AgNP su interesantne zbog svojih jedinstvenih svojstava poput veličine i oblika (sve tri dimenzije na nanometarskoj skali) te optičkih, električkih i magnetnih karakteristika koje iz tih svojstava proizlaze, zbog čega se mogu inkorporirati u antimikrobne preparate, razne kozmetičke proizvode, biosenzorne materijale, elektronske komponente itd (Korbekandi i Iravani, 2012). Za njihovu sintezu i stabilizaciju postoji nekoliko fizikalnih i kemijskih metoda (Senapati, 2005; Klaus-Joerger i sur., 2001), a najpoznatija metoda za sintezu AgNP je kemijska redukcija korištenjem raznih organskih i anorganskih reducensa (Korbekandi i Iravani, 2012). Također, za sintezu nanočestica srebra se koriste i elektrokemijske metode, fizikalno-kemijska redukcija i radioliza. U posljednje vrijeme, teži se sintezi AgNP metodama koje su ekološki prihvatljive (eng. *green chemistry*). Pristupi u ekološko prihvatljivim metodama uključuju korištenje poliokso-metalata mješovitih valencija, polisaharida te biološku metodu i metodu zračenja koje imaju prednost pred konvencionalnim metodama koje uključuju kemikalije sa toksičnim utjecajem na okoliš (Korbekandi i Iravani, 2012). Općenito, konvencionalne fizikalne i kemijske metode su skupe i opasne, dok su biološke metode jednostavne, brze, netoksične i pouzdane (Zhang i sur., 2016). AgNP pripremljene nekom od bioloških metoda pokazuju visok prinos, topljivost i stabilnost (Zhang i sur., 2016).

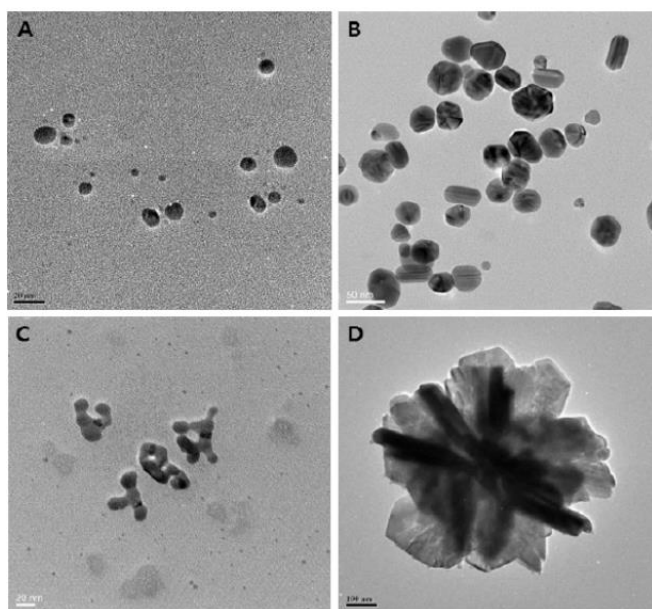
Nanočestice srebra se često sintetiziraju i proizvode obložene različitim stabilizirajućim agensima koji sprječavaju njihovu agregaciju (Nguyen i sur., 2013). Mnoge vrste omotača su se pokazale uspješnima u stabilizaciji nanočestica poput polivinilpirolidona (PVP) (Slika 1.), polietilen glikola ( $C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1}$ ), polimetakrilne kiseline ( $(C_4H_6O_2)_n$ ) i polimetilmetakrilata ( $(C_5O_2H_8)_n$ ) (Iravani i sur., 2014). Također, postoje i omotači koji nose naboj poput citrata ili cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB), koji ih stabiliziraju elektrostatički te daju pozitivan ili negativan naboj (Jarnević, 2017).



**Slika 1.** (A) Fotografija nastala transmisijskom elektronskom mikroskopijom (TEM) i (B) fotografija nastala skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) nanočestica srebra stabiliziranih PVP omotačem (Haberl i sur., 2013)

### 2.1.2. Svojstva

Nakon sinteze AgNP, potrebno je provesti njihovu preciznu karakterizaciju jer njihova fizikalno-kemijska svojstva mogu značajno utjecati na njihov biološki učinak. Kako bi se riješilo pitanje sigurnosti te kako bi se iskoristio puni potencijal bilo kojeg nanomaterijala u svrhu dobrobiti ljudi, u nanomedicini, industriji itd. potrebno je karakterizirati nanočestice (odrediti veličinu, oblik i stabilnost; Slika 2), za što se koriste mnoge analitičke tehnike poput UV/Vis spektroskopije, metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS, eng. *Dynamic light scattering*), rendgenske difraktografije (XRD, eng. *X-ray diffractometry*), skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM), transmisijske elektronske mikroskopije (TEM), Fourierova transformacijske infracrvene spektroskopije (FTIR, eng. *Fourier transform infrared spectroscopy*), rendgenske fotoelektronske spektroskopije (XPS, eng. *X-ray photoelectron spectroscopy*), itd. Biološka aktivnost AgNP ovisi o čimbenicima kao što su kemija površine, veličina, raspodjela, oblik, morfologija čestice, omotači, aglomeracija i stupanj topljivosti, reaktivnost čestica u otopini, otpuštanje iona i tip reducensa korištenog za sintezu AgNP (Zhang i sur., 2016). Navedeni čimbenici su stoga važni u određivanju citotoksičnosti AgNP (Zhang i sur., 2016).



**Slika 2.** Biološka sinteza raznih oblika nanočestica srebra upotrebom supernatanta kulture s raznim vrstama roda *Bacillus* (A) sferične, (B) miješane populacije (osmerokutne, štapićaste, šesterokutne i ikozaedarske), (C) visoko razgranate, (D) oblik cvijeta (Zhang i sur., 2016).

## 2.2. Abiotički stres

Abiotički stres se definira kao negativan učinak neživih čimbenika na žive organizme u nekom okolišu koji proizlazi iz njihovog suviška ili nedostatka u fizičkom ili kemijskom okolišu (Balen, 2016). Suša, salinitet, temperatura, svjetlost, nedovoljna količina minerala te nanomaterijali su okolišni uvjeti koji mogu izazvati abiotički stres (Balen, 2016). Kao posljedica abiotičkog stresa može se javiti i oksidacijski stres koji ima važan utjecaj na rast i razvitak biljke (Balen, 2016). Oksidacijski stres izaziva promjene u ekspresiji gena biljne stanice, što utječe na stanični metabolizam i izaziva promjene u rastu i prinosima (Balen, 2016).

Kao i svi organizmi, biljke nastoje održati homeostazu, što je za njih osobito važno s obzirom da se radi o sesilnim organizmima koji ne mogu napustiti okoliš ako nastupe nepovoljni životni uvjeti. Biljke aktivno izmjenjuju energiju, vodu i tisuće kemijskih spojeva s okolišem u kojem se nalaze. Zbog ovih izmjena, biljke osjećaju promjene u svom okolišu i odgovaraju na njih kako bi spriječile oštećenja tkiva (Kosová i sur., 2015). Biljka prepoznaje stres na staničnom nivou, a njegovo prepoznavanje aktivira put prijenosa signala koji informaciju provodi unutar stanice i kroz cijelu biljku. Promjene u ekspresiji gena mogu modificirati rast i razvoj te utjecati na reproduktivnu sposobnost biljke (Balen, 2016).

### 3. BILJNA PROTEOMIKA

Otkako su završili projekti sekvenciranja genoma mnogih modelnih biljaka poput uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), mahovine (*Physicomitrella patens*) (Rensing i sur., 2008), riže (*Oryza sativa*) (Sasaki, 2005) te drugih važnih usjeva, biolozi su se susreli s izazovom točnog određivanja funkcije svakog gena kao i njegovog proizvoda. Nastoji se unaprijediti spoznaje i razumijevanje o biološkim makromolekulama te kako one grade organizam kao funkcionalnu cjelinu. Zbog mnogo novih istraživanja i podataka, uvedena je nova terminologija: na engleskom jeziku nastavak *-ome* označava određenu zajednicu molekula u stanici (npr. *proteome*, *genome*, *translatome*, *metabolome*) te nastavak *-omics* koji naglašava područje interesa (npr. *proteomics*, *genomics*, *translatomics*, *metabolomics*) (Cvjetko i sur., 2014). Analize strukture i funkcije proteina se mogu izvoditi na razini proteoma, sekretoma i interaktoma. Izraz proteom izveden je iz engleskog izraza *PROTEins expressed by a genOME*, a odnosi se na sve proteine jednog organizma, organa ili stanice (Balen, 2016).

Odgovor biljaka na promjene uvjeta iz okoliša, javlja se ne samo zbog promjene u ekspresiji gena, već i zbog kvantitativnih i kvalitativnih promjena u ekspresiji proteina. Proteini imaju važnu strukturnu i funkcionalnu ulogu te se njihova funkcija može percipirati ovisno o razini (biokemijska, stanična, razvojna ili fiziološka) na kojem se proučava određeni protein (Cvjetko i sur., 2014).

Primjena novih tehnika nužna je u proširenju spoznaja o molekularnim putevima koji su važni u toleranciji biljaka na različite okolišne uvjete. Za stjecanje dubljeg uvida u proces biljnog odgovora na abiotički ili biotički stres, tradicionalne fizikalne i kemijske metode više nisu dovoljne (Cvjetko i sur., 2014), a danas je najčešće u primjeni proteomski pristup.



### 3.1. Primjena biljne proteomike u određivanju toksičnosti AgNP

Tehnike u proteomici koje detektiraju kvantitativne i kvalitativne promjene u ekspresiji proteina moćni su alati za identifikaciju proteina povezanih uz specifičan razvojni ili okolišni podražaj. Posljednjih godina, fitotoksičnost nanomaterijala je privukla mnogo pažnje, no mehanizmi uključeni u promjene ekspresije biljnih proteina kao rezultat izlaganja nanočesticama su nepoznati. Stoga je potrebno razviti standardizirani pristup u svrhu razumijevanja interakcije biljka - nanočestice. Analiza proteoma se provodi kako bi se istražilo molekularne aspekte toksičnosti nanočestca srebra. Informacije dobivene iz istraživanja proteoma mogu učvrstiti spoznaje o interakcijama između biljke i nanočestica, budući da analiziraju utjecaj AgNP na ekspresiju proteina. Pregled istraživanja u određivanju toksičnosti AgNP primjenom biljne proteomike dan je u Tablici 1. (Tkalec i sur., 2019), iz koje je vidljivo da je najviše informacija dobiveno razdvajanjem proteina kombinacijom dvaju različitih jednodimenzijskih elektroforetskih tehnika u dvodimenzionalni postupak (2-DE), nakon čega se uslijedila spektrometrija masa (Balen, 2016).

**Tablica 1.** Istraživanja proteoma biljaka izloženih stresu uzrokovanom nanočesticama srebra (preuzeto i prilagođeno iz Tkalec i sur., 2019).

Vrsta	Veličina AgNP (nm)	Omotač	Koncentracija AgNP	Vrijeme izlaganja (dani)	Medij	Analizirano tkivo	Metodologija	Referenca
Riža ( <i>Oryza sativa</i> )	18,34	Bez omotača	30, 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$	20	Hidroponski medij	Klijanci	2-DE, nanoLC/FTICR, MS	Mirzajani i sur., 2014
Pšenica ( <i>Triticum aestivum</i> )	10	PVP	10 $\text{mg L}^{-1}$	5	Filtar papir natopljen deioniziranom vodom	Korijen i izdanci	2-DE, nanoLC-ESI-MS/MS	Vannini i sur., 2014
Soja ( <i>Glycine max</i> )	15	Bez omotača	2 ppm	2	Silicijev pijesak	Korijen i kotiledoni	Gel-free, nanoLC-ESI-MS/MS	Mustafa i sur., 2015
Duhan ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	50	Citrat	100 $\mu\text{M}$	30	Kruti MS medij	Klijanci	2-DE, MALDI, TOF/TOF-MS	Peharec Štefanić i sur., 2018
Duhan ( <i>Nicotiana tabacum</i> )	50	Citrat	100 $\mu\text{M}$	7	Mili-Q® voda	Korijen i listovi	2-DE, MALDI, TOF/TOF-MS	Peharec Štefanić i sur., 2019

## 4. ISTRAŽIVANJA NA BILJKAMA

### 4.1. Riža (*Oryza sativa* L.)

U radu Mirzajani i sur. (2014) su klijanci riže izlagani tretmanima s AgNP veličine 18,34 nm bez omotača. Koncentracije korištenih otopina AgNP bile su 30 i 60  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , a tretman biljaka je trajao 20 dana.

Dvadeset i osam proteinskih točaka je pokazalo značajnu pojačanu ekspresiju kao odgovor na tretman s AgNP. Zabilježena je pojačana ekspresija antioksidacijskih enzima poput superoksid dismutaze (eng. *Superoxide* dismutase, SOD), askorbatne peroksidaze (eng. *Ascorbate peroxidase*, APX) i glutation S-transferaze (eng. *Glutathione S-transferase*, GST), što nije bilo neočekivano s obzirom da stres uzrokovan AgNP može ubrzati proizvodnju ROS (eng. *Reactive oxygen species*) molekula. Stanični detoksifikacijski enzimi se stvaraju kao odgovor na toksičnost ROS molekula. Povećanjem koncentracije staničnih  $\text{Ca}^{2+}$  iona, kao posljedice stvaranja ROS molekula, dolazi do pojačane ekspresije transkripcijskog faktora NAC i signalnih molekula za MRR (eng. *Mitochondrial retrograde regulation*). Mitohondrij signalizira jezgri da pokrene ekspresiju gena, a signalne molekule za pokretanje MRR su molekule ROS i kalcij. Neki proteini koji vežu kalcij (CaM, eng. *Calcium binding messenger proteins*) uključuju i kalmoduline 1 i 3, te 26 i 27, koji su pokazali pojačanu ekspresiju, a mogu transducirati signale kalcija na način da vežu kalcijeve ione te zatim modificiraju njegove interakcije s drugim proteinima. Oni također posreduju mnogim ključnim staničnim procesima poput metabolizma i apoptoze, a pojavljuju se u mnogim tipovima stanica i na različitim lokacijama u stanici. Nadalje, identificirani su proteini uključeni u sintezu proteina i procese razgradnje, uključujući proteasomsku podjedinicu  $\alpha$ -10 i  $\beta$ -11. Oni razgrađuju nepotrebne ili oštećene proteine koji su nastali u procesu proteolize. Protein TCP (eng. *Translationally controlled protein*) je regulator staničnih procesa (staničnog ciklusa, apoptoze, rasta i dr.) te nakon tretmana pokazuje pojačanu ekspresiju (Mirzajani i sur., 2014).

### 4.2. Pšenica (*Triticum aestivum* L.)

U radu Vannini i sur. (2014) su korištene metode analize proteoma navedene u Tablici 1. kako bi se karakteriziralo molekularne i morfološke učinke koje su AgNP izazvale u ranim fazama rasta pšenice. Korištene su AgNP veličine 10 nm te su stabilizirane PVP omotačem. Biljke su tretirane 5 dana, otopinama koncentracije AgNP je bila 10  $\text{mg L}^{-1}$ , a korijen i izdanci su zasebno analizirani.

Analize proteoma su potvrdile da je korijen prvi pod toksičnim utjecajem AgNP. Uočene su razlike u broju i vrsti proteina koji su pokazali različitu ekspresiju u korijenu i izdancima, što može biti povezano s razlikama u količini srebra koje se nakupilo u tim organima i s različitim mehanizmima koje ovi ograni koriste kao odgovor na tretman AgNP. Identificirano je nekoliko proteina koji su uključeni u primarni metabolizam, što upućuje na bitnu ulogu primarnog metabolizma u obrani od promjene okolišnih uvjeta. U analiziranom korijenu je primijećena akumulacija  $\alpha$ -amilaze i fruktoza bifosfat aldolaze. Akumulacija ovih enzima je očekivana zbog manjeg broja amiloplasta u korijenu klijanca pšenice izložene tretmanu s AgNP nego u kontrolnom uzorku. U izdanicima tretiranih klijanaca pšenice zabilježena je pojačana ekspresija dviju akonitat hidrataza. Promjene u ekspresiji proteina uključenih u primarni metabolizam mogu pomoći pri stvaranju energije za redukciju kao odgovor na stres uzrokovan AgNP. Negativan učinak AgNP na izdanke je vidljiv i iz smanjene ekspresije proteina HCF136 (eng. *Photosystem II stability/assembly factor*), koji je važan za biogenezu fotosustava, kao i citokroma b5, koji je uključen u sustav prijenosa elektrona u membranama endoplazmatskog retikuluma (Vannini i sur., 2014).

Tretman s AgNP je uzrokovao pojačanu ekspresiju malat dehidrogenaze (eng. *Malate dehydrogenase*, MDH) u korijenu, što može dovesti do pojačanog izlučivanja citrata, oksalata, acetata i malata iz korijena u usporedbi s kontrolnom biljkom. Također, dolazi do pojačane ekspresije reverzno glikoliziranih polipeptida (eng. *Reversibly glycosylated polypeptide*, RGP) koji su uključeni u biosintezu polisaharida stanične stijenke (Vannini i sur., 2014).

Ekspresija dva enzima uključenih u biosintetski put sumpornih aminokiselina, metionin sintaze (eng. *Methionine synthase*, MS) i S-adenozilmetionin sintaze (eng. *S-adenosylmethionine synthase*, SAMS), se povećala u korijenu i izdanku tretiranih biljaka. Ovi enzimi pretvaraju L-homocistein u L-metionin te L-metionin u S-adenozilmetionin. Nadalje, S-adenozilmetionin sudjeluje u sintezi glutationa (eng. *Glutathione*, GSH) i poliamina. GSH je jedna od glavnih molekula za sekvestraciju metala u stanici (Vannini i sur., 2014).

Tretmani su utjecali na ekspresiju nekoliko peroksidaza, hitinaza i PR (eng. *Pathogenesis-related*) proteina uključenih u obranu od stresa i u korijenu i u izdancima (Vannini i sur., 2014). PR proteini i hitinaze se uobičajeno detektiraju u biljkama pod utjecajem biotičkog stresa, no dokazana je promijenjena ekspresija navedenih proteina u biljkama tretiranim raznim koncentracijama metala (Beata i Ildiko, 2011).

### 4.3. Soja (*Glycine max* L.)

U radu Mustafa i sur. (2015) biljke su izlagane tretmanima s AgNP veličine 60 nm bez omotača te su učinci AgNP na soju analizirani metodama navedenim u Tablici 1. Koncentracija tretmana je iznosila 2 ppm, a izlaganje tretmanima je trajalo 2 dana.

AgNP primarno utječu na ekspresiju proteina vezanih uz stres, signalizaciju i stanični metabolizam. Ekspresija 36 proteina vezanih uz signalizaciju, zajedničkog imena G-proteini, se smanjila u korijenu biljke nakon izlaganja tretmanu (Mustafa i sur., 2015). G-proteini su regulatorni proteini koji funkcioniraju kao esencijalni transduktori u signalnim putevima hipoksije (Steffens i Sauter, 2010). U uvjetima smanjene koncentracije kisika, biljke mijenjaju metaboličke puteve ugljikohidrata kako bi se pojačala proizvodnja adenosin trifosfata (eng. *Adenosine triphosphate*, ATP) glikolizom (Banti i sur., 2013). Također, zabilježena je i smanjena ekspresija i nekoliko GTPaza u korijenu tretiranih biljaka, što pokazuje da aktivacija G-proteina potiče stvaranje aerenhima u stresnim uvjetima (Mustafa i sur., 2015).

Tretman je izazvao povećanu ekspresiju 32 proteina stresa.. Ekspresija ovih proteina u korijenima biljaka izloženih samo poplavnom stresu se povećala 2 puta, dok se ekspresija u biljkama izloženim poplavnom stresu i tretmanima s AgNP povećala 4 puta (Mustafa i sur., 2015). Stres utječe na agregaciju nepravilno namotanih proteina (Liu i Howell, 2010), kako bi se njihova količina smanjila, biljke pojačavaju aktivnost inhibitora proteaze koje degradiraju nepovratno oštećene proteine. U korijenu biljaka izloženih tretmanu je zabilježena povećana ekspresija tripsina i inhibitora proteaze. Ovi proteini se u normalnim uvjetima ne pojavljuju u visokim koncentracijama, što upućuje na to da bi mogli biti uključeni u supresiju rasta kao odgovor na poplavni stres (Mustafa i sur., 2015).

Ekspresije 30 proteina vezanih uz stanični metabolizam su se promijenile nakon izlaganja tretmanima AgNP. Uz navedeno, zabilježena je i smanjena ekspresija aneksina 8 i vilina 2. Tretmani s AgNP su utjecali na smanjenu ekspresiju proteina vezanih uz staničnu organizaciju što se veže uz status mirovanja diobe stanica u ovim uvjetima (Mustafa i sur., 2015).

#### 4.4. Duhan (*Nicotiana tabacum* L.)

##### 4.4.1. Klijanci duhana

U radu Peharec Štefanić i sur. (2018) klijanci duhana su izlagani tretmanima s AgNP veličine 50 nm s omotačem od citrata. Korišteni su tretmani koncentracije 100  $\mu$ M, a izlaganje tretmanima je trajalo 30 dana. Utjecaj AgNP je uspoređivan s utjecajem AgNO<sub>3</sub> kako bi se odredilo je li utjecaj samih AgNP štetniji od ionskog srebra.

Analize proteoma su pokazale da je većina identificiranih proteina, koji su pokazali promijenjenu ekspresiju, vezana uz primarni metabolizam, a fotosinteza je jedan od procesa na kojeg utječu tretmani s AgNP. Četiri velika proteinska kompleksa fotosustav I (eng. *Photosystem I*), fotosustav II (eng. *Photosystem II*), kompleks ATP sintaze i citokrom b6/f su kompleksi uključeni u proces fotosinteze (Peharec Štefanić i sur., 2018). Protein PsaE koji je važan za spajanje ferodoksina na PS I (Sétif i sur., 2010) je pokazao smanjenu ekspresiju tijekom tretmana s AgNO<sub>3</sub>, a protein PsaD koji tvori komplekse s ferodoksinom i ferodoksin NADP<sup>+</sup> oksidoreduktazom u PS I, pokazao je povećanu ekspresiju nakon oba tipa tretmana. Protein Rubisco je ključan za reakciju fotosinteze jer katalizira ugradnju atmosferskog CO<sub>2</sub> u organske spojeve. Podjedinice proteina Rubisco su pokazale povećanu ekspresiju nakon izlaganja kod oba tretmana. Također, povećanu ekspresiju je pokazala i Rubisco aktivaza 2, enzim potreban za aktivaciju Rubisca, no može imati i ulogu u prilagodbi na stres. Ekspresija beta-karbonatne anhidraze, koja katalizira reverzibilnu konverziju HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> u CO<sub>2</sub> kako bi se osigurala dovoljna količina CO<sub>2</sub> za fiksaciju pomoću Rubisca, se povećala. Općenito, povećana ekspresija proteina vezanih uz proces fotosinteze pomaže klijancima koji su izloženi AgNP i AgNO<sub>3</sub> kako bi se ubrzala proizvodnja energije te proizvela dodatna snaga za proces redukcije koja je potrebna za preživljavanje stresa uzrokovanog AgNP (Peharec Štefanić i sur., 2018).

Zabilježena je i povećana ekspresija proteina uključenih u proces glikolize nakon oba tretmana: plastidna aldolaza, TPI (eng. *Triose phosphate isomerase*) i GAPDH (eng. *B-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B form*). Navedeni proteini pomažu biljci u održavanju procesa glikolize za osiguravanje dovoljne količine energije (Peharec Štefanić i sur., 2018).

Identificirani su i različiti proteini koji sudjeluju u slaganju proteina, translokaciji te degradaciji proteina u mnogo staničnih procesa. Pojačana ekspresija proteina toplinskog stresa (eng. *Heat shock proteins*, Hsps) ima važnu ulogu u biljnom odgovoru na okolišne podražaje.

Nakon izlaganja klijanaca tretmanima, zabilježena je povećana ekspresija Hsp70 (eng. *Heat shock protein 70*) proteina kao i PR proteina. Njihova pojačana ekspresija te pojačana ekspresija proteina uključenih u obranu od oksidativnog stresa, ukazuje na jednu od obrambenih strategija protiv stresa uzrokovanog nanočesticama srebra (Peharec Štefanić i sur., 2018).

#### **4.4.2. Odrasle biljke duhana (*Nicotiana tabacum* L.)**

U istraživanju Peharec Štefanić i sur. (2019) se istraživao utjecaj AgNP na biljku duhana te se njihov utjecaj uspoređivao s utjecajem AgNO<sub>3</sub>. Biljke su izlaganje tretmanima s AgNP veličine 50 nm s citratnim omotačem. Korišteni su tretmani koncentracije 100 μM, a izlaganje tretmanima je trajalo 7 dana.

##### **4.4.2.1. Proteom korijena**

U proteomu korijena su identificirani proteini koji su vezani uz obranu od stresa. Pojava ovih proteina je očekivana, budući da je korijen bio prvi u kontaktu tretmanima te se srebro akumuliralo u korijenu nakon tretmana s AgNP (Peharec Štefanić i sur., 2019). Identificirano je nekoliko PR proteina koji se akumuliraju kao odgovor na infekcije virusima, bakterijama ili gljivicama, ali i nakon tretiranja biljke različitim abiotičkim stresorima (Sudisha i sur., 2012). Postoji najmanje 17 različitih skupina PR proteina, od kojih se svaka skupina sastoji od nekoliko članova koji imaju slična svojstva (Sudisha i sur., 2012). U istraživanju Peharec Štefanić i sur. (2019) je došlo do povećane ekspresije tri PR proteina iz različitih skupina: CBP20 (eng. *Cap binding protein*), CAP (eng. *Catabolite activator protein*) i β-1,3- glukanaze, a smatra se da su protein CBP20 i β-1,3- glukanaza proteini inducirani teškim metalima (Hensel i sur., 1999; Su i sur., 2016). Smatra se da stresne situacije mogu dovesti do akumulacije CBP20 proteina u staničnoj stijenki kako bi se stanice zaštitile od štetnih utjecaja metala (Hensel i sur., 1999). β-1,3- glukanaza sudjeluje u regulaciji kaloze u plazmodezmi te može biti odgovorna za rezistenciju prema metalima jer smanjena količina kaloze i povećana permeabilnost plazmodezme može dovesti do smanjenja negativnog utjecaja metala na rast korijena (O'Lexy i sur., 2018). Pojačana ekspresija navedenih PR proteina koji su uključeni u modifikacije stanične stijenke mogu pomoći pri obrani od stresa uzrokovanog AgNP (Kosová i sur., 2018), no u biljci duhana je zabilježena smanjena ekspresija nakon izlaganja tretmanu s AgNP (Peharec Štefanić i sur., 2019).

Aneksini su topivi proteini koji sudjeluju u organizaciji mreže membranskih proteina koji sudjeluju u mnogo staničnih i razvojnih procesa, uključujući i toleranciju na abiotički stres (Laohavisit i Davies, 2011). Većina biljnih aneksina se nalazi u citosolu, no mogu se naći i u

drugim staničnim organelima poput vakuole (Laohavisit i Davies, 2011). Identificirana su dva aneksina; aneksin VCaB42 (eng. *Vacuole-associated annexin protein*) se nalazi u vakuoli te drugi aneksin koji se nalazi u citosolu. Njihova ekspresija se smanjila kao odgovor na tretmane s AgNP (Peharec Štefanić i sur., 2019). Rezultati su pokazali da su stanice korijena stagnirale, odnosno nisu se dijelile ni rasle nakon izlaganja tretmanima (Mustafa i sur., 2015) te se smatra da aneksin VCaB42 ima važnu ulogu u rastu stanica duhana (Seals i Randall, 1997).

U proteomu korijena su zabilježeni proteini koji sudjeluju u obrani i odgovoru na stres kao i nekoliko antioksidacijskih enzima koji detoksiciraju ROS molekule (eng. *Reactive oxygen species*). Enzim Fe-SOD nalazi se u plastidima te je pokazala smanjenu ekspresiju nakon tretmana s AgNP, dok je Mn-SOD, mitohondrijska izoforma, pokazala pojačanu ekspresiju nakon tretmana (Peharec Štefanić i sur., 2019). Različiti izoforme SOD enzima mogu imati različite uloge u eliminaciji ROS molekula (Alvarez i sur., 2009). Također, ekspresija ostalih antioksidacijskih enzima poput peroksidaze, monodehidroaskorbat reduktaze (eng. *Monodehydroascorbate reductase*, MDHAR) i kvinon reduktaze (eng. *Quinone reductase*, QR) se smanjila nakon tretmana s AgNP (Peharec Štefanić i sur., 2019). Ioni Ag<sup>+</sup> mogu inhibirati aktivnost enzima vezujući se za tiolne skupine ili neke druge aktivne skupine (Ghandour i sur., 1988). U istraživanju su korištene relativno stabilne nanočestice s malo ispuštenih Ag<sup>+</sup> iona (Peharec Štefanić i sur., 2019) te je brojnost ROS molekula u tretiranim biljkama slična kao u kontrolnim biljkama (Cvjetko i sur., 2018).

Identificirani su proteini koji sudjeluju u glikolizi i fermentaciji alkohola (Peharec Štefanić i sur., 2019), što je očekivano jer je korijen tkivo koje ne provodi proces fotosinteze te ovisi o procesu glikolize i oksidativnoj fosforilaciji (Goodwin i Mercer, 1983). Ekspresija proteina poput enolaze, aldolaze i alkohol dehidrogenaze (eng. *Alcohol dehydrogenase*, ADH) je povećana u organizmima koji su bili izloženi metalima zbog veće potražnje za energijom za detoksikaciju (Kosová i sur., 2018). U korijenu tretiranih biljaka duhana je zabilježena smanjena ekspresija dva proteina uključenih u proces glikolize, gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaze (eng. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH) i triozaofosfat izomeraze (eng. *Triosephosphate isomerase*, TPI). Također, smanjena ekspresija je zabilježena i za MDH i izocitrat dehidrogenazu (eng. *Isocitrate dehydrogenase*, IDH), proteine uključene u ciklus trikarboksilne kiseline koji povezuje proces glikolize sa prijenosom elektrona u mitohondriju (Peharec Štefanić i sur., 2019).

#### 4.4.2.2. Proteom lista

Većina identificiranih proteina lista koji su imali promijenjenu ekspresiju povezana je s metabolizmom ugljikohidrata i energije. Najveći utjecaj AgNP zabilježen je na proteine koji sudjeluju u procesu fotosinteze. Naime, nakon izlaganja duhana tretmanima s AgNP uočena je smanjena ekspresija proteina PsaD, koji vodi ferodoksin (eng. *Ferodoxin*, Fd) do mjesta vezanja na fotosustavu I (eng. *Photosystem I*, PSI), i proteina PsaE koji je ključan za vezanje ferodoksina i ferodoksin-NADP reduktaze (eng. *Ferredoxin-NADP reductase*, FNR) za PSI (Peharec Štefanić i sur., 2019; Hanke i Mulo, 2013). Također, zabilježena je i smanjena ekspresija ferodoksin-NADP reduktaze (eng. *Ferredoxin-NADP reductase*, FNR), proteina koji upravlja prijenosom elektrona od ferodoksina do NADP<sup>+</sup>. S druge strane, oba tretmana su povećala ekspresiju klorofil a-b proteina (Peharec Štefanić i sur., 2019), a moguće je da biljke duhana reguliraju ekspresiju tog proteina kako bi se sačuvala funkcija PSI i/ili PSII tijekom izlaganja AgNP (Andersson i sur., 2003). Protein CF1 koji je dio plastidne ATP sintaze, sudjeluje u biosintezi ATP-a te je pokazao smanjenu ekspresiju nakon izlaganja tretmanu AgNP (Peharec Štefanić i sur., 2019).

Smanjenjem aktivnosti primarnog elektronskog transporta, dolazi do degradacije proteina Rubisco. Velika podjedinica proteina Rubisco, RbcL (eng. *Ribulose biphosphate carboxylase large chain*) od 47 kDa, pokazala je pojačanu ekspresiju nakon oba tretmana, dok je isti protein od 53 kDa pokazao smanjenu ekspresiju, što ukazuje na degradaciju enzima Rubisco. Nadalje, ribuloza-fosfat-3-epimeraza (eng. *Ribulose-phosphate-3-epimerase*, RPE), enzim važan za Calvinov ciklus, imao je smanjenu ekspresiju nakon oba tretmana što je utjecalo na smanjenu fotosintetsku aktivnost. Također, proteini važni za glikolizu poput GADPH, TPI te plastidna aldolaza su pokazale smanjenu ekspresiju nakon izlaganja tretmanu s AgNP (Peharec Štefanić i sur., 2019)

Kao posljedica smanjenog primarnog metabolizma i nedostatka hranjivih tvari, dolazi do smanjenja količine proteina koji su uključeni u metabolizam aminokiselina i nukleotida poput NDPK1 (eng. *Nucleoside diphosphate kinase*), GST i aminometiltransferaze. Obrambeni proteini poput PR proteina CBP20, osmotina i  $\beta$ -1,3- glukanaza, koji su također zabilježeni u tkivu korijena, su zabilježeni i u tkivu lista no s manjom ekspresijom nego u korijenu što se veže uz manji sadržaj akumuliranog srebra u listu, nego u korijenu (Peharec Štefanić i sur., 2019).



## 5. ZAKLJUČAK

Razvojem novih disciplina i metoda dolazi do novih spoznaja o funkcioniranju organizama i njihovoj obrani od stresa. Prikazana istraživanja pokazuju da nanočestice srebra imaju slične učinke na proteome biljaka. U riži, AgNP utječu na razne stanične procese poput sinteze i degradacije proteina i apoptoze te također imaju direktan regulatorni utjecaj na biljne stanice jer dolazi do pojačane ekspresije detoksikacijskih enzima, što upućuje na pojačanu proizvodnju ROS molekula zbog stresa uzrokovanog AgNP. Pšenica potiče pojačanu ekspresiju proteina uključenih u obranu od stresa i procese primarnog metabolizma. Kod soje su AgNP prvenstveno utjecale na ekspresiju proteina uključenih u obranu od stresa, signalizaciju i stanični metabolizam. U klijancima duhana je zabilježeno da su tretmani s AgNP pokazali manja oštećenja nego srebro u ionskom obliku, a oba tretmana su utjecala na pojačanu ekspresiju proteina uključenih u primarni metabolizam, jer pojačanom proizvodnjom energije biljke olakšavaju i podupiru obrambene procese. U odraslim biljkama duhana je došlo do ozbiljnijih promjena u sastavu proteoma nakon tretmana s AgNP.

## 6. POPIS LITERATURE

- Alvarez, S., Berla, B. M., Sheffield, J., Cahoon, R. E., Jez, J. M., Hicks, L. M. (2009) Comprehensive analysis of the *Brassica juncea* root proteome in response to cadmium exposure by complementary proteomic approaches. *Proteomics*, 9:2419 – 2431.
- Andersson, U., Heddad, M., Adamska, I. (2003) Light stress-induced one-helix protein of the chlorophyll a/b binding family associated with photosystem I. *Plant Physiology*, 132:811.
- Balen, B. (2016) Promjene u ekspresiji biljnih proteina izazvane nanočesticama srebra. *Educatio biologiae*, 2, 115-130.
- Banti, V., Giuntoli, B., Gonzali, S., Loreti, E., Magneschi, L., Novi, G., Paparelli, E., Parlanti, S., Pucciarello, C., Santaniello, A., Perata, P. (2013) Low oxygen response mechanisms in green organisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3): 4734 – 4761.
- Beáta, P., Ildikó, M. (2011) Plant defense against heavy metals: the involvement of pathogenesis-related (PR) proteins. U: Awaad, A. S., Kaushik, G., Govil, J. N. (ur.). Recent progress in medicinal plants. Vol. 31: Mechanism and action of phytoconstituents. New Delhi: Studium Press (India); 179–205.
- Cvjetko, P., Zovko, M., Balen, B. (2014) Proteomics of heavy metal toxicity in plants. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, 65:1-18. DOI: 10.2478/10004-1254-65-2014-2443.
- Cvjetko, P., Zovko, M., Peharec Štefanić, P., Biba, R., Tkalec, M., Domijan, A. M., 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.
- Goodwin, T. W. i Mercer, E. I. (1983) Introduction to plant biochemistry. Pergamon Press, Oxford.
- Haberl, N., Hirn, S., Wenk, A., Diendorf, J., Epple, M., Johnston, D. B., Krombach, F., Kreyling, G. W., Schleh, C. (2013) Cytotoxic and proinflammatory effects of PVP-coated silver nanoparticles after intratracheal instillation in rats. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 4: 933-940, doi:10.3762/bjnano.4.105.

- Hanke, G. i Mulo, P. (2013) Plant type ferredoxins and ferredoxin dependent metabolism. *Plant, Cell & Environment*, 36:1071 – 1084.
- Hensel, G., Kunze, G., Kunze, I. (1999) Expression of the tobacco gene CBP20 in response to developmental stage, wounding, salicylic acid and heavy metals. *Plant Science*, 148:165 – 174.
- Iravani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, V. S., Zolfaghari, B. (2014) Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 9(6), 385-406.
- Jarnević, M. (2017) Utjecaj nanočestica i iona srebra na proteom duhana (*Nicotiana tabacum* L.). Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.
- Klaus-Joerger, T., Joerger, R., Olsson, E., Granqvist, C. G. (2001). Bacteria as workers in the living factory: metal-accumulating bacteria and their potential for materials science. *Trends in Biotechnology*, 19:15 – 20.
- Korbekandi, H. i Iravani, S. (2012) Silver nanoparticles. U: Hashim, A. A. (ur.) The Delivery of Nanoparticles, InTech DOI: 10.5772/34157.
- Kosová, K., Vitámvás, P., Urban, O. M., Klima, M., Roy, A., Prášil, I. T. (2015) Biological networks underlying abiotic stress tolerance in temperate crops – A proteomic perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 20913-20942 doi:10.3390/ijms160920913.
- Kosová, K., Vitámvás, P., Urban, O. M., Prášil, I. T., Renaut, J. (2018) Plant abiotic stress proteomics: the major factors determining alterations in cellular proteome. *Frontiers in Plant Science*, 9:122.
- Laohavisit, A. i Davies, J. M. (2011) Annexins. *New Phytologist*, 189:40 – 53.
- Liu, J. X. i Howell, H. S. (2010) Endoplasmic reticulum protein quality control and its relationship to environmental stress responses in plants. *The Plant Cell*, 22(9): 2930 – 2942.
- Mirzajani, F., Askari, H., Hamzelou, S., Schober, Y., Römpf, A., Ghassempour, A., Spengler, B. (2014) Proteomics study of silver nanoparticles toxicity on *Oryza sativa* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 108, 335-339.

- Mustafa, G., Sakata, K., Hossain, Z., Komatsu, S. (2015) Proteomic study on the effects of silver nanoparticles on soybean under flooding stress. *Journal of proteomics*, 122, 100-118.
- Nguyen, K.C., Seligy, V. L., Massarsky, A., Moon, T. W., Rippstein, P., Tan J., Tayabali, A. F. (2013) Comparison of toxicity of uncoated and coated silver nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series*, 429.
- O`Lexy, R., Kasai, K., Clark, N., Fujiwara, T., Sozzani, R., Gallagher, K. L. (2018) Exposure to heavy metal stress triggers changes in plasmodesmatal permeability via deposition and breakdown of callose. *Journal of Experimental Botany*, 69:3715 – 3728.
- Peharec Štefanić, P., Cvjetko, P., Biba, R., Domijan, A., 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.
- Peharec Štefanić, P., Jarnević, M., Cvjetko, P., Biba, R., Šikić, S., Tkalec, M., Cindrić, M., Letofsky-Papst, I., Balen, B. (2019) Comparative proteomic study of phytotoxic effects of silver nanoparticles and silver ions on tobacco plants. *Environmental Science and Pollution Research* <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05552-w>.
- Rensing, S. A., Lang, D., Zimmer, A. D., Terry, A., Salamov, A., Shapiro, H., Nishiyama, T., Perroud, P., Lindquist, E. A., Kamisugi, Y., Tanahashi, T., Sakakibara, K., Fujita, T., Oishi, K., Shin-I, T., Kuroki, Y., Toyoda, A., Suzuki, Y., Hashimoto, S., Yamaguchi, K., Sugano, S., Kohara, Y., Fujiyama, A., Anterola, A., Aoki, S., Ashton, N., Barbazuk, W. B., Barker, E., Bennetzen, J. L., Blankenship, R., Cho, S. H., Dutcher, S. K., Estelle, M., Fawcett, J. A., Gundlach, H., Hanada, K., Heyl, A., Hicks, K. A., Hughes, J., Lohr, M., Mayer, K., Melkozernov, A., Murata, T., Nelson, D. R., Pils, B., Prigge, M., Reiss, B., Renner, T., Rombauts, S., Rushton, P. J., Sanderfoot, A., Schween, G., Shiu, S. H., Stueber, K., Wood, A., Yang, L., Cove, D., Cuming, A. C., Hasebe, M., Lucas, S., Mishler, B. D., Reski, R., Grigoriev, I. V., Quatrano, R. S., Boore, J. L. (2008) The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science*, 319, 64-69, DOI: 10.1126/science.1150646.

- Sasaki, T. (2005) The map-based sequence of the rice genome. *Nature* 436, 793–800.  
<https://doi.org/10.1038/nature03895>
- Seals, D. F. i Randall, S. K. (1997) A vacuole-associated annexin, protein VCaB42, correlates with the expansion of tobacco cells. *Plant Physiology*, 115:753 – 761.
- Senapati, S. (2005). Biosynthesis and immobilization of nanoparticles and their applications. Sveučilište u Puni, Indija
- Sétif, P., Harris, N., Lagoutte, B., Dotson, S., Weinberger, S.R. (2010) Detection of the photosystem I: ferredoxin complex by backscattering interferometry. *Journal of the American Chemical Society*, 132.
- Steffens, B. i Sauter, M. (2010) G proteins as regulators in ethylene-mediated hypoxia signaling. *Plant Signaling & Behaviour*, 5(4): 375 – 378.
- Sudisha, J., Sharathchandra, R.G., Amruthesh, K.N., Kumar, A., Shetty, H. S. (2012) Pathogenesis related proteins in plant defense response. U: Mérillon, J., Ramawat, K. (ur.) *Plant defence: biological control. Progress in biological control*, vol. 12, Springer, Dordrecht. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-1933-0\\_17](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1933-0_17).
- Su, Y., Wang, Z., Liu, F., Li, Z., Peng, Q., Guo, J., Xu, L., Que, Y. (2016) Isolation and characterization of ScGluD2, a new sugarcane beta-1,3-glucanase D family gene induced by *Sporisorium scitamineum*, ABA, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaCl and CdCl<sub>2</sub> stresses. *Frontiers in Plant Science*, 7:1348.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408, 796-815.
- Tkalec, M., Peharec Štefanić, P., Balen, B. (2019) Phytotoxicity of silver nanoparticles and defence mechanisms. *Comprehensive Analytical Chemistry*, Vol. 84, 145-198, <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2019.04.010>.
- Vannini, C., Domingo, G., Onelli, E., De Mattia, F., Bruni, I., Marsoni, M., Bracale, M. (2014) Phytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles exposure on germinating wheat seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 171, 142-1148.

Zhang, X., Liu, Z., Shen, W., Gurunathan, S. (2016) Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International Journal of Molecular sciences*, 17, 1534 doi:10.3390/ijms17091534.

## **7. SAŽETAK**

Nanočestice srebra postaju sve zastupljenije u proizvodima široke potrošnje zbog svojih izraženih antibakterijskih i antifungalnih svojstava. Njihovom velikom rasprostranjenosti dolazi do zagađenja tla i vodenih resursa čime biljke indirektno dolaze u kontakt s nanočesticama srebra. Razvojem proteomike unaprjeđuju se spoznaje o biološkim makromolekulama te ona postaje obećavajuća disciplina u istraživanju promjena na proteinima. Do sada su tehnike provedene samo u nekoliko istraživanja na biljkama duhana, pšenice, riže, soje i dr. Navedene biljke su pokazale sličnosti u odgovoru na stres uzrokovan nanočesticama srebra gdje one utječu na ekspresiju proteina vezanih uz primarni metabolizam, signalizaciju i odgovor na stres, no odgovor uvelike ovisi o vrsti biljke i karakteristikama nanočestica.

## **8. SUMMARY**

Silver nanoparticles (AgNPs) are becoming more and more represented in consumer products because of their expressed antifungal and antibacterial properties. Their high prevalence leads to soil and water pollution, which allows plants to come into indirect contact with silver nanoparticles. With the development of proteomics, knowledge about biological macromolecules is improving and is it becoming a promising discipline in the study of protein changes. So far, the techniques have been conducted in only a few studies, on tobacco, wheat, rice, soybean plants etc. These plants have show similarities in response to stress caused by silver nanoparticles where they affect the expression of proteins related to primary metabolism, signaling and stress response. However, the response largely depends on the plant species and the characteristics of the nanoparticles.