

FIZIOLOŠKI I PROTEOMSKI ODGOVORI KLIJANACA DUHANA (*Nicotiana tabacum*) NA IZLAGANJE NANOČESTICAMA SREBRA STABILIZIRANIM RAZLIČITIM OMOTAČIMA

Biba, Renata

Doctoral thesis / Disertacija

2022

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:217:727026>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-03**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Renata Biba

**FIZIOLOŠKI I PROTEOMSKI ODGOVORI
KLIJANACA DUHANA (*Nicotiana tabacum*)
NA IZLAGANJE NANOČESTICAMA
SREBRA STABILIZIRANIM RAZLIČITIM
OMOTAČIMA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Renata Biba

**PHYSIOLOGICAL AND PROTEOMIC
RESPONSES OF TOBACCO
(*Nicotiana tabacum*) SEEDLINGS
EXPOSED TO DIFFERENTLY COATED
SILVER NANOPARTICLES**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2022

Ovaj je doktorski rad izrađen u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u okviru projekta Fitotoksičnost nanosrebra: mehanizmi akcije i interakcije u stanicama duhana (NanoPhytoTox), financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost, pod vodstvom prof. dr. sc. Biljane Balen, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

INFORMACIJE O MENTORICI

Prof. dr. sc. Biljana Balen studij biologije, smjer molekularna biologija, na PMF-u Sveučilišta u Zagrebu završila je 1996. godine pod mentorstvom akademkinje Sibile Jelaska. Iste godine zaposlila se na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka PMF-a. Magistarski rad obranila je 2002. godine pod mentorstvom prof. dr. sc. M. Krsnik-Rasol, a doktorsku disertaciju izradila je pod dvojnim voditeljstvom prof. dr. sc. Jasne Peter-Katalinić sa Sveučilišta u Münsteru, Njemačka i prof. dr. sc. M. Krsnik-Rasol i obranila 2005. godine. U znanstveno-nastavno zvanje docent izabrana je 2007. godine, a 2013. godine u zvanje izvanredne profesorice. Od 2018. godine radi kao redovita profesorica na istoj instituciji. Usavršavala se u više navrata na znanstvenim institucijama u inozemstvu (Njemačka, Italija, Indija, Izrael).

Voditeljica je i su-voditeljica kolegija Stanična i molekularna biologija, Biologija stanice i Metode istraživanja proteina na preddiplomskim studijima BO te kolegija Uvod u proteomiku na diplomskom studiju molekularne biologije, koji se svi izvode i na engleskom jeziku. Na zajedničkom diplomskom studijskom programu Bioindustrijske tehnike Sveučilišta u Orleansu i Sveučilištu u Zagrebu bila je su-voditeljica kolegija Biljno inženjerstvo, dok na doktorskom studiju izvodi nastavu iz kolegija Organizacija i funkcija stanice.

Bila je voditeljica dvije doktorske disertacije, 20-tak diplomskih radova, 30-tak završnih radova preddiplomskih studija te dva studentska rada nagrađena Rektorovom nagradom. Ko-autorica je jednog sveučilišnog priručnika, jednog poglavlja u knjizi Metode u molekularnoj biologiji te triju sveučilišnih skripata za praktikumsku nastavu na hrvatskom i engleskom jeziku.

Bavi se istraživanjem odgovora biljaka na različite oblike abiotičkog stresa (salinitet, povišena temperatura, teški metali, nanočestice metala). Bila je voditeljica tri znanstvena projekta (HRZZ, MZOS i Sveučilište u Zagrebu), a aktivno je sudjelovala u izvedbi nekoliko domaćih i međunarodnih znanstvenih projekata. Do danas je objavila 39 radova u znanstvenim časopisima i četiri poglavlja u znanstvenim knjigama. Na domaćim i inozemnim stručnim i znanstvenim skupovima sudjelovala je s više od 70 usmenih i posterskih priopćenja. Članica je više strukovnih udruga i predsjednica Hrvatskog društva za biljnu biologiju.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Biljani Balen, za svu pomoć i motivaciju tijekom izrade i pisanja ovog rada. Veliko hvala za sve prijedloge, komentare i strpljive ispravke.

Također se zahvaljujem dr. sc. Petri Cvjetko, prof. dr. sc. Mirti Tkalec, izv. prof. dr. sc. Petri Peharec Štefanić, prof. dr. sc. Danelu Lyonsu i prof. dr. sc. Ana-Mariji Domijan, za nesebično dijeljenje znanja i metoda bez kojih izrada ovog rada ne bi bila moguća.

Hvala ekipi sa Zavodu za molekularnu biologiju, prošloj i sadašnjoj, za sve kave i druženja, bez kojih bi sve ovo bilo puno teže.

Na kraju, najveće zahvale idu mojoj obitelji, Matiji i Frodi, na bezuvjetnoj podršci...

**FIZIOLOŠKI I PROTEOMSKI ODGOVORI KLIJANACA DUHANA
(*Nicotiana tabacum*) NA IZLAGANJE NANOČESTICAMA SREBRA
STABILIZIRANIM RAZLIČITIM OMOTAČIMA**

Renata Biba

Zavod za molekularnu biologiju, Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet
Horvatovac 102a, 10000 Zagreb

Negativan utjecaj nanočestica srebra (AgNP) potvrđen je na mnogim organizmima, no mehanizam njihove toksičnosti još uvijek nije poznat. U biološkim sustavima AgNP su sklone agregaciji i disocijaciji, pa se za stabilizaciju koriste omotači koji utječu na njihove fizikalno-kemijske karakteristike. U ovome radu ispitala sam utjecaj AgNP stabiliziranih s dva različita omotača (PVP i CTAB) na isključavanje i rani rast, pojavu oksidacijskog stresa i promjene u proteomu klijanaca duhana (*Nicotiana tabacum*). Kako bih utvrdila je li njihova toksičnost posljedica samih nanočestica ili iona Ag^+ , provela sam usporednu analizu s $AgNO_3$ i kombiniranim tretmanima s cisteinom, snažnim ligandom iona Ag^+ . AgNP-CTAB pokazale su jači utjecaj pri svim ispitivanim parametrima u odnosu na AgNP-PVP i $AgNO_3$. Dodatak cisteina umanjio je utjecaj AgNP-PVP i $AgNO_3$, ali ne i AgNP-CTAB, što dovodi do zaključka da je toksični učinak AgNP-PVP većim dijelom posljedica otpuštanja iona Ag^+ , dok toksičnost AgNP-CTAB proizlazi iz intrinzičnih svojstava samih nanočestica.

(170 stranica / 48 slika / 11 tablica / 347 literaturnih navoda / jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: nanočestice srebra, omotači, *Nicotiana tabacum*, isključavanje, oksidacijski stres, ekspresija proteina

Mentor: prof. dr. sc. Biljana Balen
Ocjenjivači: prof. dr. sc. Mirta Tkalec
izv. prof. dr. sc. Petra Peharec Štefanić
prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Science

Department of Biology

**PHYSIOLOGICAL AND PROTEOMIC RESPONSES OF TOBACCO
(*Nicotiana tabacum*) SEEDLINGS EXPOSED TO DIFFERENTLY COATED SILVER
NANOPARTICLES**

Renata Biba

Division of Molecular Biology, Department of Biology, Faculty of Science
Horvatovac 102a, 10000 Zagreb

Detrimental effects of silver nanoparticles (AgNPs) have been confirmed in many organisms, but the mechanism of their toxicity is still unknown. In biological systems, AgNPs are prone to aggregation and dissolution, so they are often stabilized by coatings that affect their physico-chemical properties. In this study I have examined effects of AgNPs with different coatings (PVP and CTAB) on germination and early growth, oxidative stress appearance and proteome changes in tobacco (*Nicotiana tabacum*) seedlings. To determine if AgNP toxicity is nanoparticle-specific or it derives from dissolved Ag⁺, I have employed a comparative analysis with AgNO₃ and combined treatments with cysteine, a strong silver ligand. AgNP-CTAB had a stronger influence in all examined parameters compared to AgNP-PVP and AgNO₃. Cysteine addition alleviated negative effects of AgNP-PVP and AgNO₃, but not AgNP-CTAB, suggesting that AgNP-PVP toxic effects are mostly due to the release of Ag⁺ ions, while the toxicity of AgNP-CTAB derives from the intrinsic properties of nanoparticles.

(170 pages / 48 figures / 11 tables / 347 references / original in Croatian)

Keywords: silver nanoparticles, coatings, *Nicotiana tabacum*, germination, oxidative stress, protein expression

Supervisor: Prof. Biljana Balen, PhD

Reviewers: Prof. Mirta Tkalec, PhD

Assoc. Prof. Petra Peharec Štefanić, PhD

Prof. Daniel Mark Lyons, PhD

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Nanomaterijali	4
2.1.1. Postanak nanomaterijala	4
2.1.2. Građa nanomaterijala	4
2.1.3. Dimenzionalnost nanomaterijala	5
2.2. Nanočestice srebra	6
2.2.1. Sinteza i stabilizacija AgNP	7
2.2.2. Karakterizacija AgNP	9
2.3. AgNP u okolišu	11
2.3.1. Stabilnost i transformacije AgNP u okolišu.....	11
2.3.2. Utjecaj AgNP na biljke	13
2.4. Mehanizam toksičnosti AgNP i obrambeni mehanizmi biljaka	16
2.4.1. Ulazak AgNP u biljke	16
2.4.2. Utjecaj AgNP na isključavanje, rani rast i morfologiju biljaka.....	18
2.4.3. Pojava oksidacijskog stresa.....	19
2.4.4. Oksidacijsko oštećenje biomolekula.....	22
2.5. Antioksidacijski sustav biljaka	26
2.5.1. Sustav enzimskih antioksidansa.....	27
2.5.2. Sustav neenzimskih antioksidansa	31
2.6. Utjecaj AgNP na promjene u proteomu biljaka.....	34
3. MATERIJALI I METODE	37
3.1. Sinteza nanočestica.....	37
3.2. Fizikalno-kemijska karakterizacija nanočestica	37
3.2.1. UV-Vis spektrofotometrija	37
3.2.2. Određivanje veličine i naboja	37
3.2.3. Mjerenje koncentracije srebra.....	38
3.2.4. Transmisijska elektronska mikroskopija.....	38
3.3. Uzgoj biljnog materijala i tretmani.....	38
3.3.1. Uzgoj i tretman klijanaca na krutoj podlozi ½ MS	40
3.3.2. Uzgoj i tretman klijanaca na tekućoj podlozi ½ MS.....	40
3.4. Mjerenje stabilnosti AgNP-PVP i AgNP-CTAB u podlozi ½ MS za tretman duhana .	41
3.4.1. Spektrofotometrijsko mjerenje stabilnosti	41
3.4.2. Promjena veličine i naboja.....	42

3.5. Mjerenje dinamike klijanja sjemenki	42
3.6. Rani rast klijanaca	43
3.7. Ekstrakcija proteina u kalij-fosfatnom puferu	43
3.8. Mjerenje sadržaja ROS	44
3.8.1. DHE test.....	44
3.8.2. Sadržaj H ₂ O ₂	44
3.9. Oksidacijsko oštećenje biomolekula	45
3.9.1. Mjerenje sadržaja MDA.....	45
3.9.2. Mjerenje sadržaja proteinskih karbonila	46
3.9.3. Comet test	46
3.10. Spektrofotometrijsko mjerenje aktivnosti antioksidacijskih enzima.....	47
3.10.1. Aktivnost SOD.....	47
3.10.2. Aktivnost CAT.....	48
3.10.3. Aktivnost APX.....	49
3.10.4. Aktivnost PPX	49
3.11. Spektrofotometrijsko mjerenje neenzimskih antioksidansa	50
3.11.1. Mjerenje sadržaja GSH	50
3.11.2. Mjerenje sadržaja prolina.....	51
3.12. Statistička analiza podataka.....	51
3.13. Razdvajanje proteina nativnom poliakrilamidnom gel elektroforezom	52
3.13.1. Određivanje aktivnosti izoforma SOD.....	53
3.13.2. Određivanje aktivnosti izoforma CAT.....	53
3.13.3. Određivanje aktivnosti izoforma APX.....	53
3.13.4. Određivanje aktivnosti izoforma PPX	53
3.14. Ekstrakcija proteina fenolom.....	54
3.15. Analiza ekspresije ukupnih topivih proteina	55
3.15.1. Bojanje gelova bojom <i>Coomassie Brilliant Blue</i>	56
3.15.2. Bojanje gelova srebrovim nitratom.....	56
3.16. Imunodetekcija antioksidacijskih enzima na membrani.....	57
3.16.1. Razdvajanje proteina.....	57
3.16.2. Obrada protutijelima i detekcija.....	58
3.16.3. Analiza membrana	59
3.17. Analiza proteina dvodimenzionalnom elektroforezom	59
3.17.1. Prva dimenzija - IEF	59
3.17.2. Druga dimenzija – SDS-PAG elektroforeza	60

3.17.3. Analiza gelova dobivenih dvodimenzionalnom elektroforezom	61
3.18. Analiza proteina spektrometrijom masa	61
3.18.1. Priprema uzoraka za digestiju u gelu	61
3.18.2. Digestija u gelu	61
3.18.3. Ekstrakcija peptida iz gela i pročišćavanje	62
3.18.4. Analiza peptida spektrometrijom masa.....	63
4. REZULTATI.....	64
4.1. Sinteza i karakterizacija AgNP-PVP i AgNP-CTAB	64
4.1.1. Izgled i apsorpcijski spektar AgNP-PVP i AgNP-CTAB.....	64
4.1.2. Fizikalno-kemijske karakteristike AgNP-PVP i AgNP-CTAB	65
4.2. Mjerenje stabilnosti AgNP-PVP i AgNP-CTAB u podlozi ½ MS.....	66
4.2.1. Spektrofotometrijsko mjerenje stabilnosti u krutoj podlozi ½ MS.....	66
4.2.2. Spektrofotometrijsko mjerenje stabilnosti u tekućoj podlozi ½ MS.....	75
4.2.3. Mjerenje stabilnosti u tekućoj podlozi ½ MS praćenjem promjena veličine i naboja	83
4.3. Mjerenje parametara isključavanja.....	87
4.4. Rani rast klijanaca	90
4.5. Reaktivni oblici kisika	94
4.6. Oštećenje biomolekula	96
4.7. Aktivnost antioksidacijskih enzima.....	98
4.8. Sadržaj neenzimskih antioksidansa	101
4.9. Izoforme i aktivnost antioksidacijskih enzima u gelu	104
4.10. Analiza ekspresije ukupnih topivih proteina	109
4.11. Imunodetekcija proteina na membrani	111
4.12. Promjene u proteomu.....	114
4.13. Identifikacija i kategorizacija diferencijalno eksprimiranih proteina.....	118
5. RASPRAVA.....	125
5.1. Utjecaj fizikalno-kemijskih karakteristika AgNP-PVP i AgNP-CTAB	125
5.2. Stabilnost AgNP-PVP i AgNP-CTAB	126
5.3. Utjecaj na isključavanje i rani rast	128
5.4. Utjecaj na pojavu oksidacijskog stresa.....	130
5.5. Utjecaj na proteom.....	137
6. ZAKLJUČAK	143
7. POPIS LITERATURE	145
8. ŽIVOTOPIS	170

UVOD

1. UVOD

Ubrzani razvoj i komercijalizacija nanomaterijala proširila je njihovu uporabu u industriji i svakodnevnom životu, postavljajući pitanje njihove sigurnosti za okoliš i ljudsko zdravlje. Među različitim tipovima nanomaterijala posebno se ističu nanočestice srebra (AgNP) koje čine gotovo 25% svih nanomaterijala u potrošačkim proizvodima (Vance i sur. 2015). Istaknuta protubakterijska i protugljivična svojstva AgNP doprinijela su njihovoj rastućoj primjeni u medicini, industriji i poljoprivredi, ali istovremeno i povećala rizik od ispuštanja u okoliš (Tolaymat i sur. 2010). Jedinstvene karakteristike vezane za građu AgNP mogu rezultirati neočekivanim i potencijalno štetnim posljedicama za cijeli ekosustav, zbog čega je razumijevanje mehanizma njihova djelovanja prioritet u današnje vrijeme. Biljke, koje su vitalan dio ekosustava, posebno su ugrožene zbog direktnog kontakta s kontaminiranom vodom i tlom, a njihova uloga u akumulaciji i transformaciji tvari iz okoliša čini ih potencijalnim putem za unos AgNP u hranidbene lance (Rico i sur. 2011), ističući važnost provedbe detaljnih toksikoloških istraživanja utjecaja AgNP na biljke.

Iznimno važan aspekt ovakvih istraživanja čine karakterizacija i praćenje stabilnosti AgNP u eksperimentalnim sustavima i okolišu. Transformacije AgNP u različitim medijima za izlaganje, uvjetovane fizikalno-kemijskim karakteristikama poput veličine, oblika, naboja i površinskih modifikacija, mogu značajno utjecati na njihovu fitotoksičnost (Bae i sur. 2013). Od presudne važnosti pokazao se izbor omotača koji služi za njihovu stabilizaciju i zaštitu od izravnih interakcija s okolišem koje bi mogle dovesti do agregacije, aglomeracije ili oksidacijske disocijacije iona srebra (Ag^+) s površine AgNP (Tejamaya i sur. 2012, Akter i sur. 2018). Suspenzije AgNP mogu biti stabilizirane steričkim interakcijama koje uključuju uporabu polimernih neionskih surfaktanata poput polivinilpirolidona (PVP), polivinil alkohola (PVA) i polietilen glikola (PEG) (Koczur i sur. 2015) ili korištenjem anionskih i kationskih surfaktanata poput citrata ili cetiltrimetilamonijeva bromida (CTAB), koji stabiliziraju AgNP putem elektrostatičkog odbijanja (Yu i Xie 2012). Dosadašnja su istraživanja ukazala na postojanje određenih razlika u djelovanju različito stabiliziranih AgNP (Biba i sur. 2021a), no broj istraživanja koja usporedno ispituju utjecaj različitih AgNP na biljke još je malen, a često nisu uzete u obzir i ostale karakteristike AgNP koje utječu na njihovu toksičnost. Naime, ponašanje AgNP usko je vezano za eksperimentalnu metodologiju koja se koristi za njihovo istraživanje. Sastav hranjive podloge, vodene otopine ili tla korištenog za tretman biljaka izravno utječe na stabilnost i biološku dostupnost AgNP, a dosadašnja istraživanja pokazala su

da učinak AgNP ovisi i o vrsti i starosti biljke na kojoj se istraživanje provodi, kao i o duljini tretmana, primijenjenoj koncentraciji te načinu izlaganja (Tkalec i sur. 2019).

Akutni utjecaj AgNP kod biljaka je najznačajnije izražen na morfološkoj razini. Naime, zbog utjecaja na fluidnost i propusnost membrana, AgNP mogu modificirati unos vode i nutrijenta iz zemlje što je posebno važno za rast i razvoj biljaka (Zuverza-Mena i sur. 2016). Ipak, dosadašnja saznanja nisu dala jednoznačne rezultate u ovom području; iako je dio istraživanja pokazao da AgNP mogu ubrzati isključavanje te pospješiti rast korijena i izdanka, one su većinom ipak negativno utjecale na navedene parametre (Tkalec i sur. 2019). Na fiziološkoj razini, utjecaj AgNP najčešće se ispoljava u smanjenju sadržaja klorofila i inhibiciji fotosinteze, smanjenju transpiracije i promjenama u koncentraciji biljnih hormona, što također negativno utječe na stanje biljke (Sun i sur. 2017, Tripathi i sur. 2017a).

Glavni mehanizam fitotoksičnosti AgNP pripisuje se stvaranju povećane razine reaktivnih oblika kisika (ROS) koji dovode do pojave oksidacijskog stresa u biljnim stanicama te mogu putem prijenosa elektrona nanijeti oksidacijsku štetu važnim biomolekulama (Flores-López i sur. 2019). Oksidacijsko oštećenje lipida može izravno utjecati na propusnost stanične membrane (Suresh i sur. 2010), a karbonilacija proteina može dovesti do gubitka njihove funkcije (Arora i sur. 2010). Osim toga, oksidacijsko oštećenje molekule DNA i promjene u ekspresiji gena mogu uzrokovati promjene u diobi stanica i staničnoj strukturi (Levine i sur. 2017). Kako bi umanjile negativan utjecaj povećane količine ROS, biljke su razvile učinkovite mehanizme za njihovo uklanjanje koji uključuju aktivnost različitih enzimskih i neenzimskih antioksidansa s ciljem održavanja redoks homeostaze u biljkama (Arora i sur. 2002, Mittler 2017). Među antioksidacijskim enzimima najvažnije uloge imaju superoksid dismutaza (SOD), koja pretvara toksični superoksidni radikal u vodikov peroksid te katalaza (CAT) i različite peroksidaze, koje uklanjaju vodikov peroksid nizom enzimskih reakcija (Hasanzuman i sur. 2020). Sadržaj neenzimskih komponenti antioksidacijskog sustava, poput prolina, askorbata i glutationa, važan je radi njihovog snažnog redukcijskog potencijala kojim izravno uklanjaju ROS, ali i zbog njihove uloge u sintezi mnogih molekula važnih za rast i razvoj biljaka (de Pinto i de Gara 2004).

Proteini, koji imaju glavne uloge u staničnoj signalizaciji i odgovoru na stres, direktno su uključeni u odgovor biljaka na tretman AgNP. Uporaba proteomike stoga bi mogla pomoći u razjašnjavanju mehanizma fitotoksičnosti AgNP putem identifikacije ključnih proteina, njihovih interakcija te posttranslacijskih modifikacija (Majumdar i Keller 2020). Dosadašnja istraživanja ukazala su na značajne promjene ekspresije proteina uključenih u procese

primarnog metabolizma, obradu proteina te odgovor na oksidacijski stres (Vannini i sur. 2013, Mirzajani i sur. 2014, Peharec Štefanić i sur. 2018), a detaljnije komparativne analize utjecaja različitih oblika AgNP mogle bi ponuditi potencijalne biomarkere njihove toksičnosti.

Unatoč rastućem broju istraživanja utjecaja AgNP, pitanje mehanizma njihova djelovanja još uvijek nije razriješeno. Naime, oksidacija i otpuštanje iona Ag^+ s njihove površine smatra se važnim uzrokom toksičnosti AgNP. Ipak, mnoga su istraživanja potvrdila razlike u učinku primjene AgNP i iona Ag^+ pri istim koncentracijama tretmana (Navarro i sur. 2008, Cvjetko i sur. 2018, Peharec Štefanić i sur. 2019), ukazujući na važnost intrinzičnih svojstava samih AgNP. Zbog toga je potrebno osim usporednih tretmana AgNP i Ag^+ razviti i drugačije protokole koji bi razlučili utjecaj nanočestica od utjecaja iona Ag^+ . Primjena liganada, poput cisteina, koji snažno kelatiraju ione Ag^+ , mogla bi ponuditi odgovor o mehanizmu toksičnosti AgNP.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati utjecaj AgNP stabiliziranih s dva omotača (PVP i CTAB) na isključavanje i rani rast, pojavu oksidacijskog stresa i promjene u proteomu klijanaca duhana (*Nicotiana tabacum*) te utvrditi je li taj utjecaj posljedica djelovanja samih nanočestica ili iona Ag^+ koji se s njih otpuštaju. U tu svrhu provedena je usporedna analiza klijanaca tretiranih s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO_3 , samih i u kombiniranim tretmanima s cisteinom, čemu je prethodila detaljna karakterizacija sintetiziranih AgNP-PVP i AgNP-CTAB te analiza njihove stabilnosti u hranjivoj podlozi za izlaganje. Hipoteza istraživanja bila je da AgNP stabilizirane različitim omotačima imaju različit fitotoksični učinak koji je barem djelomično posljedica otpuštanja iona Ag^+ , te će zbog toga biti umanjen dodatkom cisteina.

LITERATURNI PREGLED

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Nanomaterijali

Nanotehnologija predstavlja razvoj, sintezu, karakterizaciju i aplikaciju materijala i uređaja čija je veličina na nanometarskoj skali (1-100 nm), a objedinjuje područja fizike, kemije i biologije (Kolahalam i sur. 2019). Pojava i razvoj nanomaterijala (NM) izvanrednih magnetskih, električnih, optičkih, mehaničkih i katalitičkih svojstava omogućila je napredak mnogih grana znanosti i industrije, unoseći poboljšanja i u svakodnevne živote ljudi. Raznovrsnost njihove primjene uvjetovala je mogućnost precizne kontrole nad veličinom, oblikom i funkcionalizacijom površine dodatkom različitih omotača tijekom sinteze, čineći NM pogodnima za uporabu u različite svrhe (Baig i sur. 2021).

Iako ne postoji internacionalno prihvaćena definicija NM (Boverhof i sur. 2015), legislative različitih organizacija kao što su EPA (*U.S. Environmental Protection Agency*) i FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) daju slična objašnjenja te opisuju NM kao materijale koji imaju barem jednu dimenziju između 1 i 100 nm te pokazuju jedinstvena svojstva koja su različita od istih komponenti većih dimenzija. S obzirom na raznolikost NM i njihovih svojstava, bilo je nužno kreirati klasifikaciju koja će ih detaljno opisati, ali i omogućiti lakšu pravnu regulaciju NM i produkata koji ih sadrže. NM se stoga opisuju ovisno o načinu postanka, tipu materijala te dimenzijama (Jeevanandam i sur. 2018).

2.1.1. Postanak nanomaterijala

Prema načinu postanka, NM se mogu klasificirati u tri kategorije: prirodni, antropogeni i sintetski. Prirodni NM rezultat su biogeokemijskih i mehaničkih procesa na Zemlji poput šumskih požara, vulkanskih erupcija, ispuštanja aerosolnih čestica iz oceana, trošenja stijena ili drenaže kiselih rudnika (Shalan i sur. 2018). Antropogeni NM nastaju kao slučajni nusprodukti ljudskog utjecaja na Zemlju, najčešće u procesima izgaranja fosilnih goriva, te dovode do značajnih ekoloških problema (Barhoum i sur. 2022). Sintetski NM su materijali pravilnih oblika, sintetizirani u svrhu specifične primjene te detaljno ispitani kako bi se utvrdila njihova funkcija i smanjio potencijalno negativan učinak (Buzea i sur. 2007, Albalawi i sur. 2021).

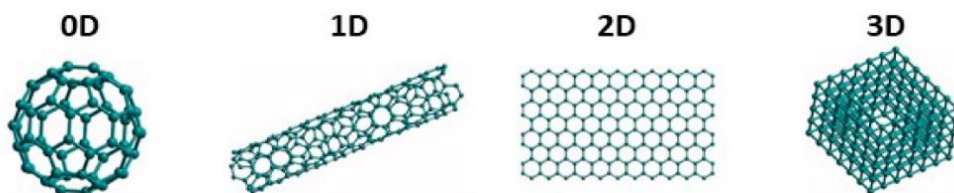
2.1.2. Građa nanomaterijala

Funkciju NM prvenstveno određuje njegov sastav, odnosno sadržaj elemenata koji ga grade. I dok su prirodni NM većinom agregati različitih elemenata, sintetski NM obično sadrže jedan ili dva elementa periodnog sustava (Gugulothu i sur. 2019). Prema elementarnom sastavu, NM se dijele na NM temeljene na ugljiku, organske, anorganske i hibridne. NM temeljeni na

ugljiku predstavljaju specifično područje nanotehnologije zbog različitih alotropskih modifikacija ugljika koje su se koristile još u prošlosti u obliku goriva, kompozitnih materijala i pigmenata, dok danas čine osnovu održive energije tvoreći dijelove nuklearnih reaktora i elektrode u punjivim baterijama i kondenzatorima (Oschatz i sur. 2016, Khan i sur. 2019). Organski NM predstavljaju skupinu biorazgradivih netoksičnih NM koji grade strukture kao što su dendrimeri, miceli i liposomi (Barhoum i sur. 2022) te čine osnovu razvoja i implementacije nanomaterijala u biomedicini kao dijagnostička i terapijska pomagala (Fang i sur. 2020). Anorganska skupina NM od posebnog je interesa zbog zanimljivih optičkih i električnih svojstava metala, metalnih oksida i soli na nanometarskoj skali, koja se javljaju kao posljedica njihove kristalne strukture i velike površinske reaktivnosti (Sudha i sur. 2018). Međusobna kombinacija različitih NM, kao i kombinacija NM s tvarima većih dimenzija, daje hibridne NM različitih morfologija i svojstava koja im omogućuju raznoliku primjenu (Jeevanandam i sur. 2018).

2.1.3. Dimenzionalnost nanomaterijala

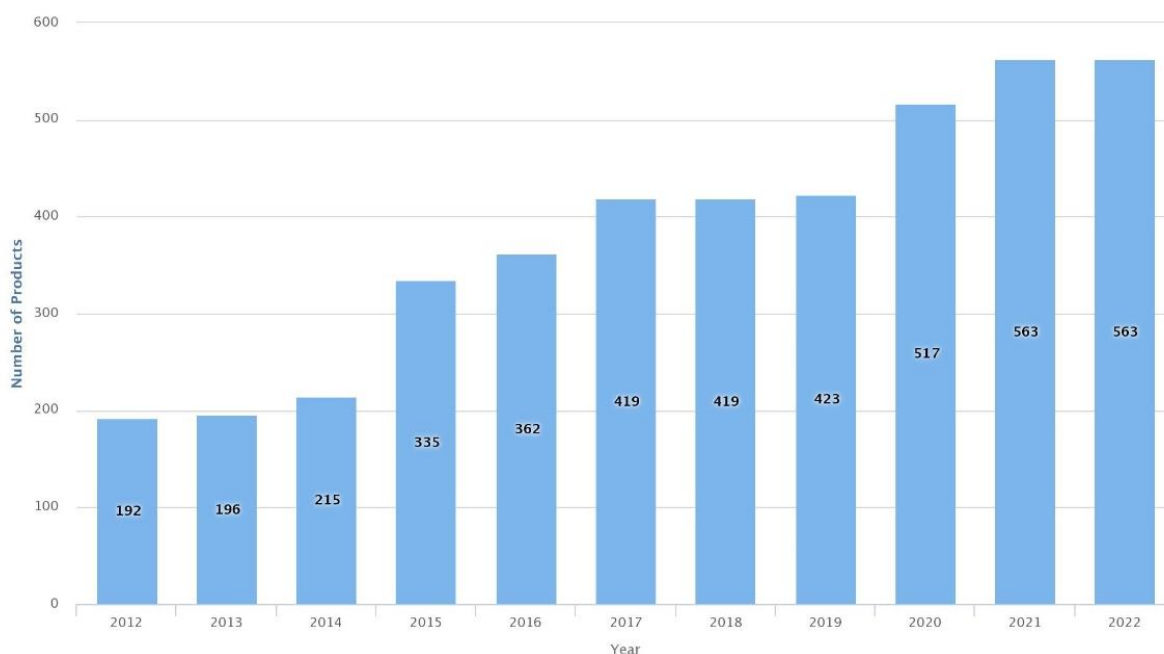
Specifična fizikalno-kemijska svojstva NM posljedica su njihove građe, prvenstveno njihovih dimenzija. Dimenzionalnost NM, koja uvjetuje njihovu funkciju, zbog toga se dijeli ovisno o broju dimenzija koje se nalaze izvan nanometarske skale (Slika 1), a Pokropivny i Skorokhod (2007) su je definirali kretanjem elektrona dostupnim dimenzijama unutar strukture. Nula-dimenzionalni (0D) NM imaju sve tri dimenzije unutar nanometarske skale, a elektroni su im zarobljeni u prostoru bez dimenzija (fulereni, nanočestice, kvantne točke) (Wang i sur. 2020b). Jednodimenzionalni (1D) NM imaju samo jednu dimenziju veću od 100 nm, a elektroni imaju mogućnost kretanja po x-osi (nanotube, nanožice i nanovlakna) (Jeevandam i sur. 2019). Dvodimenzionalni (2D) NM imaju dvije dimenzije veće od 100 nm te mogućnost kretanja elektrona po x- i y-osi (nanolistovi) (Jin i sur. 2018), dok trodimenzionalni (3D) NM čine kompleksne strukture kojima su sve tri dimenzije veće od 100 nm, a elektroni se kreću po x-, y- i z-osi (snopovi nanožica ili nanocijevi) (Zhao i Lei 2020).



Slika 1. Podjela NM prema dimenzionalnosti. Prilagođeno prema Barhoum i sur. 2022.

2.2. Nanočestice srebra

Nanočestice srebra (AgNP) predstavljaju skupinu najviše istraženih NM, a njihova je upotreba u farmaceutskoj, kozmetičkoj, prehrambenoj i tekstilnoj industriji sve učestalija (Gherasim i sur. 2020). Tome u prilog govori i činjenica da se trenutno na svjetskom tržištu nalazi preko 560 proizvoda koji sadrže AgNP kao aktivne komponente (*The Nanodatabase*, pristupljeno 23.01.2022.), uz značajan porast u posljednjih deset godina (Slika 2).



Slika 2. Porast implementacije AgNP u potrošačkim proizvodima od 2012. godine do danas. Preuzeto sa <https://nanodb.dk/en/analysis/consumer-products/#chartHashsection> (23.01.2022.)

Razlog pojačane implementacije AgNP u potrošačkim proizvodima i industriji svakako leži u izvanrednim protubakterijskim i protugljivičnim svojstvima koja posjeduju, te se zbog toga primjenjuju u mnogim medicinskim uređajima i materijalima poput zavoja, katetera, kirurških instrumenata ili proteza. Osim toga, sve su češće prisutni u kozmetičkim preparatima, kremama, pastama za zube, detergentima, dezinfekcijskim sredstvima, ambalaži za očuvanje svježine namirnica, igračkama za djecu, tekstilu i sportskoj opremi, ali i velikim kućanskim aparatima poput perilica rublja ili pročišćivača vode i zraka (Tolaymat i sur. 2010). Karakteristična svojstva AgNP prepoznata su i u poljoprivrednoj industriji, gdje se već koriste kao stimulatori rasta biljaka ili fungicidi za prevenciju biljnih bolesti, a njihov potencijal za poboljšanje kvalitete i količine usjeva se intenzivno istražuje (Yan i Chen 2019).

Dobra električna vodljivost i specifična fotokemijska svojstva AgNP iskorištena su u izradi različitih električnih i optičkih uređaja (Tran i sur. 2013), a velika površinska reaktivnost

omogućila je njihovu primjenu u katalitičke svrhe za mnoge industrijski važne reakcije (Liu i sur. 2005, Ameen i sur. 2007). Jedinstvena svojstva AgNP također se učestalo koriste i u znanosti, npr. za detekciju sekvenci molekule DNA (Jacob i sur. 2008), proučavanje membranskog transporta u živim stanicama u stvarnom vremenu (Xu i sur. 2004), kolorimetrijsko određivanje koncentracije amonijaka (Dubas i Pimpan, 2008) i označavanje i snimanje stanica raka (Wiley i sur. 2007). Nedvojbeno je da će pojačana uporaba AgNP dovesti do njihovog ispuštanja u okoliš, međutim interakcije AgNP i živog svijeta nisu još u potpunosti razjašnjene. Zbog toga je potrebno detaljno ispitati njihove karakteristike te detektirati potencijalne toksične učinke.

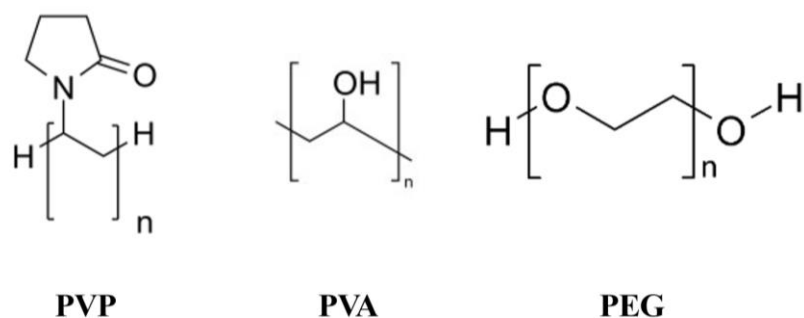
2.2.1. Sinteza i stabilizacija AgNP

Veličina i morfologija AgNP od presudne su važnosti za njihova kemijska i fizikalna svojstva, a direktna su posljedica uvjeta stvorenih tijekom sinteze. Najčešći način pripreve AgNP je putem kemijske redukcije nekog od prekursora iona Ag^+ , kao što je vodena otopina srebrova nitrata (AgNO_3) (Güzel i Erdal, 2018). Odabir reducensa determinirat će karakteristike novonastalih nanočestica; jaka reducirajuća sredstva poput natrijevog borhidrida (NaBH_4) rezultirat će manjim česticama, dok će slabiji reducensi, kao što su trinatrijev citrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) ili askorbinska kiselina ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$), favorizirati sintezu nešto većih čestica (Chen i Schluesener 2008). Novonastale čestice u suspenziji prate Brownovo gibanje s mnogo međusobnih sudara, što zbog postojanja privlačnih van der Waalsovih sila može dovesti do njihove agregacije, kako objašnjava Derjaquin-Landau-Verway-Overbeek (DLVO) teorija (Tadros, 2010). Kako bi se takva suspenzija stabilizirala, potrebno je stvoriti odbojne sile među nanočesticama, a to se može učiniti na dva načina – stvaranjem steričkog ili elektrostatičkog odbijanja (Yu i Xie 2012). Dodatak stabilizirajućih omotača na površinu nanočestica tijekom sinteze smanjuje njihovu površinsku energiju, sprječava daljnji rast i agregaciju te rezultira stvaranjem stabilne suspenzije, a odabir omotača ovisi o funkciji za koju se AgNP sintetiziraju (Li i sur. 2013).

2.2.1.1. Sterička stabilizacija AgNP

Sterička stabilizacija AgNP postiže se adsorpcijom polimernih liganada na površinu nanočestica pri čemu dolazi do stvaranja steričke odbojne sile (Guerrini i sur. 2018). U tu svrhu mogu se koristiti različite nenabijene polimerne molekule, poput polivinil pirolidona (PVP), koji se često koristi u sintezi AgNP. PVP je građen od dugih nepolarnih alkilnih lanaca (koji omogućuju izvrsnu stabilizaciju nanočestica) i polarne amidne skupine (koja tvori pirolidonski prsten), što ga čini dobro topljivim u različitim vodenim i nevodnim otapalima te ga čini

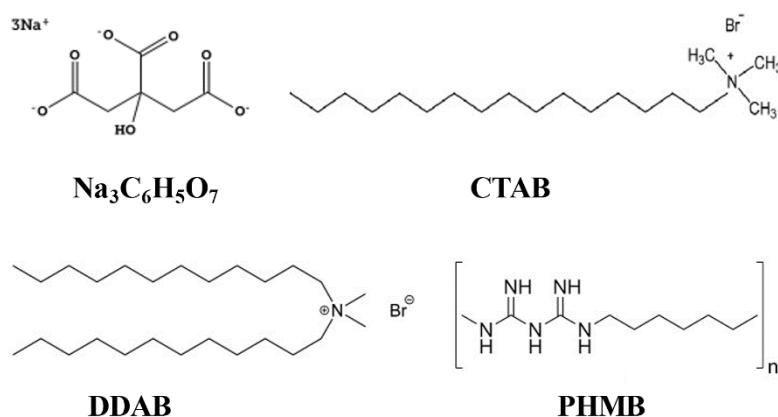
kemijski inertnim pri velikom rasponu pH-vrijednosti (Koczur i sur. 2015). Osim PVP, za steričku stabilizaciju AgNP se često koriste i polivinil alkohol (PVA), polietilen glikol (PEG) (Slika 3) i arapska guma (engl. *gum arabic*, GA), koja predstavlja prirodni polimer građen od polisaharida i glikoproteina (Sharma i sur. 2014).



Slika 3. Kemijska struktura polimera koji se koriste za steričku stabilizaciju AgNP. PVP – polivinil pirolidon, PVA – polivinil alkohol, PEG – polietilen glikol.

2.2.1.2. Elektrostatička stabilizacija AgNP

Za stvaranje elektrostatičke stabilizacije AgNP, potrebna je prisutnost ionskih grupa koje nakon adsorpcije na površinu nanočestice stvaraju pozitivan ili negativan površinski naboj. U mediju potom dolazi do interakcije s ionima suprotnog naboja, pri čemu se stvara neutralan omotač oko nanočestica koji im pruža odličnu stabilnost i sprječava agregaciju (Yu i Xie 2012). Za elektrostatičku stabilizaciju najčešće se koristi $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, negativno nabijena molekula koja tijekom sinteze AgNP može imati dvojaku ulogu – kao reducens i kao omotač. Pozitivno nabijene AgNP mogu se dobiti stabilizacijom pomoću kationskih surfaktanata, kao što su cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB), didecildimetilamonijev bromid (DDAB) ili poliheksametilen bigvanid (PHMB) (Slika 4) (Biba i sur. 2021a).



Slika 4. Kemijska struktura anionskih i kationskih surfaktanata koji se koriste za elektrostatičku stabilizaciju AgNP. Na₃C₆H₅O₇ – trinatrijev citrat, CTAB – cetiltrimetilamonijev bromid, DDAB – didecildimetilamonijev bromid, PHMB – poliheksametilen bigvanid.

2.2.2. Karakterizacija AgNP

Nakon sinteze AgNP, nužna je detaljna karakterizacija fizikalno-kemijskih svojstava koja imaju nedvojen utjecaj na njihovu biološku aktivnost, ponašanje u okolišu, sigurnost i efikasnost. Navedena karakterizacija mora uključivati distribuciju veličina, morfologiju, površinska svojstva, stabilnost i interakcije (Vega-Baudrit i sur. 2019). U te svrhe može se koristiti više analitičkih tehnika, kao što su UV-Vis spektroskopija, dinamičko raspršenje svjetla (eng. *dynamic light scattering*, DLS), mjerenje zeta potencijala, atomska apsorpcijska spektroskopija (AAS) i metoda induktivno spregnute plazme sa spektrometrijom masa (eng. *inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS) (Tkalec i sur. 2019). Osim toga, vizualizacija sintetiziranih AgNP izvodi se uporabom mikroskopijskih metoda poput skenirajuće elektronske mikroskopije (SEM), transmisijske elektronske mikroskopije (TEM) ili mikroskopije atomskih sila (eng. *atomic force microscopy*, AFM) (Zhang i sur. 2016b), a najbolje rezultate i najpodrobniju karakterizaciju AgNP moguće je dobiti kombinacijom više navedenih metoda.

2.2.2.1. UV-Vis spektroskopija

UV-Vis spektroskopija je brza i jednostavna tehnika za potvrdu kvalitete sinteze AgNP s kojom se ujedno može pratiti i njihova stabilnost. Temelji se na jedinstvenim optičkim svojstvima AgNP koja uzrokuju njihovu snažnu interakciju sa svjetlošću specifičnih valnih duljina. Ta interakcija posljedica je pojave lokalizirane rezonancije površinskih plazmona (eng. *localized surface plasmon resonance*, LSPR), kolektivne oscilacije vodljivih elektrona na

metalnoj površini pobuđenih specifičnim valnim duljinama vidljive svjetlosti koji uzrokuju intenzivnu apsorpciju i raspršenje karakteristično za plazmonske nanočestice (Noginov i sur. 2007, Das i sur. 2010). Jačina interakcije ovisi o karakteristikama pojedinih nanočestica, ponajviše o njihovoj veličini, obliku i refrakcijskom indeksu površine, a već i male promjene tih karakteristika dovode do promjena u frekvenciji LSPR, čineći ovu metodu odličnom za praćenje veličine i interakcija AgNP s okolišem u kojemu se nalaze (Sannomiya i sur. 2008, Lis i Cecchet 2014). Poznato je da manje AgNP apsorbiraju svjetlost na oko 400 nm, dok povećanje radijusa dovodi do pomaka maksimuma apsorpcije prema dužim valnim duljinama, odnosno prema crvenom dijelu spektra (*red-shift*) (Paramelle i sur. 2014). Sličan se pomak događa i tijekom agregacije nanočestica koja uzrokuje delokalizaciju vodljivih elektrona na površini i pomiče maksimum apsorpcije prema manjim energijama, odnosno prema duljim valnim duljinama. Uz to, stvaranjem agregata dolazi do smanjenja intenziteta i oštine maksimuma apsorpcije zbog smanjenja broja stabilnih nanočestica, a moguće je i formiranje sekundarnog maksimuma na većim valnim duljinama (Zhang i sur. 2016a).

2.2.2.2. Određivanje veličine i morfologije AgNP

Razvoj visoko-rezolucijskih mikroskopskih tehnika omogućio je detaljan pregled i karakterizaciju različitih NM korištenjem zrake visoko energiziranih elektrona, i između različitih tehnika, SEM i TEM su se pokazali kao vrijedne i često korištene metode za dobivanje kvalitativnih i kvantitativnih informacija o veličini i morfologiji AgNP (Joshi i sur. 2008, Fissan i sur. 2014). Iz dobivenih fotografija moguće je izraditi histograme koji opisuju distribuciju veličina AgNP, a kombinacijom SEM-a ili TEM-a s energodisperzivnim detektorom X-zraka (eng. *energy-dispersive X-ray spectroscopy*, EDX) može se detaljno analizirati njihova kemijska kompozicija (Lin i sur. 2014).

Za razliku od mikroskopskih metoda, korištenje tehnike DLS omogućuje simultano mjerenje veličine AgNP u velikom broju uzoraka (Lange 1995). Metoda se temelji na mjerenju intenziteta raspršenja svjetlosti lasera koji prolazi kroz koloid, nakon čega slijedi analiza intenziteta kao funkcije vremena kako bi se odredila hidrodinamička mobilnost čestica u otopini, odnosno njihov hidrodinamički volumen (Berne i Pecora 2000, Fissan i sur. 2014). DLS analiza rezultira prikazom distribucije veličina čestica u otopini, no prikaz veličine AgNP može biti značajno veći od veličine istih AgNP dobivene mikroskopskim analizama. Naime, mikroskopske analize detektiraju isključivo veličinu metalne jezgre nanočestice, dok DLS mjeri kombinaciju metalne jezgre, molekule omotača i ione otapala prisutne na površini nanočestice (MacCuspie i sur. 2011).

2.2.2.3. Određivanje površinskih svojstava i koncentracije AgNP

Iako tehnike navedene u prethodnom poglavlju daju bitne informacije o veličini i morfologiji AgNP, one nisu dostatne za predviđanje interakcija AgNP i okoliša. Analiza ζ -potencijala, efektivnog naboja čestice u mediju, mjeri naboj AgNP i njihovu stabilnost u koloidnoj suspenziji, što je od presudne važnosti za interakciju AgNP i bioloških membrana (Vega-Baudrit i sur. 2019). Mjerenje se izvodi metodom elektroforetskog raspršenja svjetlosti (eng. *electrophoretic light scattering*, ELS), pri čemu se stabilnima smatraju koloidi čiji ζ -potencijal prelazi ± 30 mV. Stabilnost koloidnih otopina uvelike ovisi o pH-vrijednosti, ionskoj jakosti i koncentraciji površinski aktivnih tvari (Saeb i sur. 2014).

Tehnike AAS i ICP-MS najčešće se primjenjuju za kemijsku kvantifikaciju elementarnih tvari te pružaju brzu i preciznu metodu za mjerenje koncentracije AgNP, bilo u otopinama ili u biološkom materijalu (McGillicuddy i sur. 2017). Nedostatak ovih metoda predstavlja nemogućnost uređaja da razlikuje ione Ag^+ od AgNP, stoga je za precizno mjerenje AgNP ili pak za mjerenje postotka disocijacije iona Ag^+ s površine čestica potrebno izvršiti dodatne separacijske tehnike prije digestije uzoraka (Liu i sur. 2012). Te tehnike najčešće uključuju centrifugiranje uzoraka kroz adekvatne filtere, pri čemu AgNP zaostaju na filteru, dok ioni Ag^+ prolaze kroz pore i sakupljaju se za daljnje analize (Wojcieszek i sur. 2020).

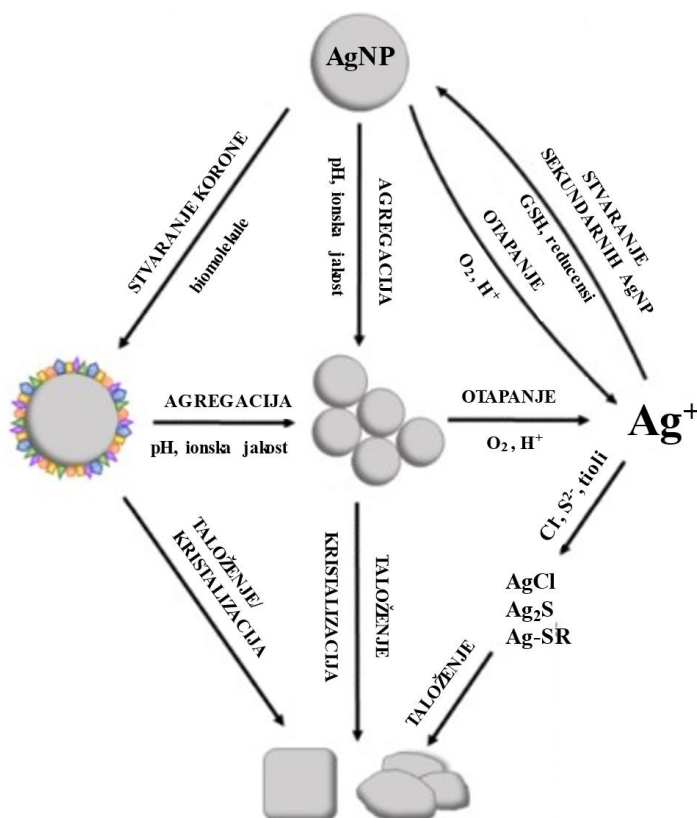
2.3. AgNP u okolišu

Posljednjih godina mnogo se govori o utjecaju AgNP na okoliš zbog njihove sve češće primjene u industriji i svakodnevnom životu. AgNP mogu predstavljati opasnost u svim fazama svog ciklusa, počevši od sinteze, preko uporabe pa sve to zbrinjavanja otpada koji ih sadrži, zbog čega je potrebno ispitati postoji li rizik za okoliš i koji su faktori koji na njega utječu (McGillicuddy i sur. 2017). S obzirom na to da su AgNP već detektirane u tlu, vodi i zraku (Gottschalk i Nowack 2011), njihov doticaj sa svim sastavnicama ekoloških sustava je neizbježan. Ipak, razine AgNP u okolišu teško je izmjeriti zbog različitih kemijskih i fizikalnih transformacija kojima su podložne pod utjecajem okolišnih faktora, a koje dovode do značajnih promjena u njihovoj specijaciji i raspoloživosti (Luoma 2008, McGillicuddy i sur. 2017).

2.3.1. Stabilnost i transformacije AgNP u okolišu

Učinak AgNP definiran je njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima: veličinom, oblikom, površinskom funkcionalizacijom i nabojem. No, uvjeti prisutni u okolišu mogu dovesti do agregacije, aglomeracije i disocijacije AgNP, ili pak mogu potaknuti njihovu

oksidaciju i interakciju s različitim organskim i anorganskim spojevima, što u konačnici dovodi do stanja u kojemu se u ravnoteži nalaze AgNP, ioni Ag^+ i njihove soli (Slika 5) (Sharma i sur. 2014, Pem i sur. 2021). Ovakve promjene u svojstvima AgNP mogu uvelike utjecati na njihov stupanj interakcije s okolišem, unos u organizme i potencijalnu toksičnost (Sharma i sur 2014, Akter i sur. 2018, Muraleetharan i sur. 2019).



Slika 5. Shema transformacija koje AgNP prolaze u okolišu. GSH – reducirani glutation, AgCl – srebrov klorid, Ag_2S – srebrov sulfid, Ag-SR – srebrovi tiolati. Preuzeto i prilagođeno prema Pem i sur. 2021.

Posebno su važne promjene koje se događaju u uvjetima jake ionske jakosti i niskih pH-vrijednosti kada slabe odbojne elektrostatske sile između čestica, što dovodi do njihove pojačane agregacije i efektivno mijenja njihovu toksičnost (Axson i sur. 2015). Mehanizmi stabilizacije snažno utječu na agregacijsku kinetiku AgNP u okolišu, pri čemu su sterički stabilizirane AgNP generalno pokazale manju sklonost agregaciji u biološkim medijima u odnosu na elektrostatički stabilizirane AgNP ili AgNP bez omotača (El Badawy i sur. 2012, Belteky i sur. 2019).

Drugi važan proces transformacije AgNP uključuje njihovu disocijaciju i otpuštanje iona Ag^+ . Riječ je o oksidacijskom procesu potpomognutom protonima, koji je značajno izraženiji pri

nižim koncentracijama AgNP (Zhang i sur. 2016b) te na manjim AgNP zbog njihove veće reaktivne površine (Ma i sur. 2014). U aerobnim uvjetima, oksidacija AgNP može dovesti do stvaranja srebrovog oksida (Ag_2O), koji se veže za površinu nanočestice i tvori svojevrsni omotač koji može umanjiti brzinu otapanja AgNP sprječavanjem njihove daljnje oksidacije (Zhang i sur. 2018). Disocijacija AgNP može biti potaknuta i prisustvom liganada koji kompleksiraju otpuštene ione Ag^+ , primjerice sulfidnih ili kloridnih iona, pri čemu nastaju precipitati srebrova sulfida (Ag_2S) i srebrova klorida (AgCl). Slaba topljivost i velika stabilnost novonastalih precipitata značajno umanjuje toksične učinke AgNP, pa se procesi sulfidacije i klorinacije smatraju prirodnim rješenjem za problem nakupljanja AgNP u okolišu (Levard i sur. 2013, Zhang i sur. 2018).

U biološkim medijima, AgNP su sklone stvarati interakcije s prisutnim biomolekulama kao što su lipidi, šećeri, proteini i metaboliti. One se spontano vežu za površinu AgNP tvoreći bio-koronu koja stabilizira AgNP i štiti ih od agregacije i disocijacije (Liu i sur. 2010, Marchioni i sur. 2018). Istraživanja su pokazala da je odgovor stanica na AgNP stabilizirane proteinskom koronom usmjeren prvenstveno na proteine koji čine koronu, a ne na same nanočestice, tvoreći njihov „biološki identitet“ koji omogućava lakšu interakciju AgNP s biološkim sustavima i od velikog je značaja za daljnju implementaciju AgNP (Walczyk i sur. 2010, Monopoli i sur. 2012, Durán i sur. 2015).

2.3.2. Utjecaj AgNP na biljke

Biljke igraju važnu ulogu u interakciji AgNP i bioloških sustava. Ukoliko se AgNP nađu u okolišu, kroz kontaminiranu vodu i tlo doći će do njihovog ulaska u biljke (Dietz i Herth 2011). S obzirom da biljke predstavljaju vitalan dio ekosustava kao primarni proizvođači svakog hranidbenog lanca, u njima se AgNP mogu akumulirati i transformirati te na taj način predstavljati opasnost za cijeli ekosustav, uključujući i ljudsko zdravlje (Ma i sur. 2010, Ma i sur. 2015, Yan i Chen 2019). Dosadašnja istraživanja pokazala su da AgNP mogu imati i pozitivne i negativne utjecaje na biljne vrste, što će ovisiti o nizu parametara, uključujući fizikalno-kemijske karakteristike AgNP (veličina, oblik, koncentracija, korišteni omotač) i eksperimentalne uvjete tretmana (vrsta i starost biljke, tkivo koje se istražuje, duljina i način izlaganja) (Tkalec i sur. 2019). Stoga je od izuzetne važnosti razviti dobro razumijevanje fitotoksičnih utjecaja AgNP te mehanizama tolerancije koje su biljke razvile.

2.3.2.1. Utjecaj fizikalno-kemijskih svojstava AgNP na fitotoksičnost

Utjecaj AgNP na morfološke, fiziološke i biokemijske parametre biljaka determiniran je njihovim intrinzičnim fizikalno-kemijskim svojstvima, što uključuje veličinu, oblik, koncentraciju i omotač (Rastogi i sur. 2017). Pri tome veličina predstavlja kritično svojstvo koje će odrediti fitotoksičnost AgNP (Wang i sur. 2016). Naime, osim što AgNP manjih dimenzija lakše ulaze u biljke i u njima se akumuliraju (Geisler-Lee i sur. 2013, Wang i sur. 2013b), manje AgNP imaju i veći omjer površine i mase, što rezultira većom površinskom reaktivnosti, omogućava im bolju interakciju sa staničnim membranama te pruža sposobnost lakšeg prolaska kroz fiziološke barijere (Nel i sur. 2006, Wang i sur. 2016). Manje AgNP stoga pokazuju znatno jače toksične učinke na isključavanje, rast i fiziologiju biljaka u odnosu na AgNP većih dimenzija (Yin i sur. 2011b, Yin i sur. 2012, Jiang i sur. 2014, Abdel-Azeem i Elsayed 2013). Osim veličine, važan faktor koji utječe na fitotoksičnost AgNP je koncentracija u kojoj su primijenjene. Istraživanja su zabilježila pozitivnu korelaciju između doze i toksičnosti AgNP na biljke (Thuesombat i sur. 2014, Cvjetko i sur. 2017). Zanimljiv se fenomen istaknuo u nekim istraživanjima gdje su primjerice manje koncentracije primijenjenih AgNP pokazale pozitivan utjecaj na rast korijena, dok je povećanje koncentracije dovelo do suprotnog učinka i značajnih morfoloških promjena (Mirzajani i sur. 2013, Barabanov i sur. 2018).

Novija istraživanja sve više ukazuju na važnost utjecaja omotača za stabilizaciju AgNP na njihov fitotoksični odgovor. Sastav i naboj omotača uvjetovat će njihov ulazak u stanice te interakcije s biomolekulama. Iako mnoštvo radova ispituje utjecaje AgNP stabiliziranih različitim tipovima omotača na biljke, samo manji broj istraživanja uspoređuje više tipova omotača u istom pokusu (Yin i sur. 2012, Jiang i sur. 2014, Cvjetko i sur. 2017). Većina tih radova je ukazala na diferencijalni odgovor biljaka u odnosu na primjenu različito stabiliziranih AgNP, međutim iz sadržaja istraživanja nije uvijek moguće donijeti jednoznačne zaključke o utjecaju omotača jer ostale karakteristike, poput veličine AgNP ili korištenog medija za tretman nisu usklađene (Biba i sur. 2021a). Ipak, sterički stabilizirane AgNP-PVP pokazale su generalno manje toksične učinke u odnosu na elektrostatički stabilizirane AgNP-citrat, AgNP-CTAB i AgNP-DDAB (Liang i sur. 2018, Barabanov i sur. 2018, Biba i sur. 2020, Peharec Štefanić i sur. 2021). Uz to, nužno je istaknuti i utjecaj samog omotača koji tijekom sinteze AgNP može zaostati u otopini ili se tijekom tretmana otpustiti s površine nanočestice. Tretmani polimerima PVP i PEG nisu pokazali toksičan učinak na biljke (Wang i sur. 2013b, Vannini i sur. 2013, Biba i sur. 2020), međutim, kationski surfaktanti CTAB i DDAB imali su značajan

inhibitorni učinak na isključivanje i rast tretiranih biljaka (Barabanov i sur. 2018, Biba i sur. 2020), što ukazuje na važnost uvođenja kontrolnog tretmana samim omotačima.

2.3.2.2. Utjecaj eksperimentalnih uvjeta na fitotoksičnost AgNP

Kompleksnost interakcije AgNP i biljaka potječe iz kombinacije intrinzičnih svojstava AgNP i eksperimentalnih uvjeta u kojima se mjerenja provode – vrsti biljke, njenoj starosti, vrsti tkiva koje se ispituje te duljini i načinu tretiranja (Yan i Chen 2019).

Korištenje različitih biljnih organizama u nanotoksikološkim istraživanjima pokazalo je da je odgovor biljaka na tretman s AgNP specifičan za pojedinu vrstu. Primjerice, unutar istog pokusa AgNP-GA pozitivno su utjecale na isključivanje vrste *Eupatorium fistulosum*, inhibirale isključivanje vrsta *Scirpus cyperinus*, *Juncus effusus* i *Phytolacca americana*, a na preostalim 7 ispitivanih vrsta nisu imale značajan utjecaj (Yin i sur. 2012). Slično opažanje dobiveno je i u istraživanju Pallavi i sur. (2016), gdje su AgNP značajno potaknule rast vrsta *Vigna sinensis* i *Brassica junacea*, dok rast biljke *Triticum aestivum* nije bio promijenjen.

Osim različitih vrsta, bitne su razlike zabilježene i u različitim razvojnim stadijima unutar iste vrste (Tkalec i sur. 2019). Općenito, isključivanje i rani razvoj klijanaca pokazali su najviše drastičnih promjena u tretmanu s AgNP (Barrena i sur. 2009, Yin i sur. 2012, Amooaghaie i sur. 2015, Biba i sur. 2020). Kod odraslih biljaka, snažniji je utjecaj zabilježen na korijenima tretiranih biljaka u odnosu na listove (Cvjetko i sur. 2018, Peharec Štefanić i sur. 2019). Istraživanje provedeno na mahovini *Physcomitrella patens* pokazalo je da su različiti razvojni stadiji podložni utjecajima AgNP različitih karakteristika; na razvoj protoneme najznačajnije su utjecale AgNP bez omotača, dok je gametofit bio podložan promjenama pod utjecajem AgNP-citrata (Liang i sur. 2018).

Na kraju, od presudne je važnosti odabir medija za izlaganje biljaka. Dodatkom AgNP u medij može doći do njihove destabilizacije zbog interakcije s organskim i anorganskim tvarima koje su prisutne u mediju ili ispuštene od strane biljaka (Bundschuh i sur. 2018), što stvara potrebu detaljne karakterizacije AgNP prije i tijekom tretmana. Generalno, AgNP pokazuju najbolju stabilnost u tretmanima provedenima u vodi (Barrena i sur. 2009, Yin i sur. 2011b, Pokhrel i Dubey 2013), dok se značajne promjene u stabilnosti AgNP događaju u krutim (Biba i sur. 2020, Biba i sur. 2021b) i tekućim (Gubbins i sur. 2011, Nair i Chung 2014a, Li i sur. 2018, Ke i sur. 2018) medijima za uzgoj biljaka, kao i u tlu (Lee i sur. 2012, Dimkpa i sur. 2013, Saleeb i sur. 2019).

2.3.2.3. Utjecaj AgNP ili iona Ag⁺?

Oksidacija AgNP i otpuštanje iona Ag⁺ s njihove površine smatra se važnim uzrokom toksičnosti AgNP u mnogim organizmima, s obzirom na postojanje aerobnih uvjeta u okolišu koji im to omogućavaju (Levard i sur. 2012). Tu se posebice ističe tzv. mehanizam „Trojanskog konja“, pri kojemu AgNP manjih veličina, koje lakše ulaze u stanice, stvaraju veće količine unutarstaničnih iona Ag⁺, što dovodi do značajnih citotoksičnih i genotoksičnih učinaka (Stensberg i sur. 2011). Ipak, mnoga su istraživanja potvrdila razlike u učincima primjene AgNP i iona Ag⁺ istih koncentracija (Navarro i sur. 2008b, Musante i White 2012, Peharec Štefanić i sur. 2019), što pokazuje da i same AgNP mogu negativno utjecati na organizme. Situacija se dodatno komplicira činjenicom da otpušteni ioni Ag⁺ u reducirajućem okolišu mogu stvarati sekundarne AgNP, čije se fizikalne i kemijske karakteristike razlikuju od primarnih (Pem i sur. 2021), što također može pridonijeti ukupnoj toksičnosti AgNP. Zbog toga je potrebno osim istovremenih tretmana s AgNP i AgNO₃ u pokuse unijeti i kelatore Ag⁺ iona koji će umanjiti njihov učinak i pomoći razjašnjavanju mehanizma toksičnosti AgNP. U tu svrhu mogu se koristiti tioli koji se prirodno nalaze u vodama bogatim organskim tvarima (Adams i Kramer 1998, Gondikas i sur. 2012). Hidrofilni tioli malih molekulskih masa, kao što su glutation, merkaptoacetat i cistein, mogu umanjiti agregaciju AgNP stabilizirajući ih vezanjem za njihovu površinu, a u nanotoksikološkim istraživanjima srebra se također koriste kao ligandi koji snažno kelatiraju ione Ag⁺ (Navarro i sur. 2008b, Navarro i sur. 2015).

2.4. Mehanizam toksičnosti AgNP i obrambeni mehanizmi biljaka

Interakcija biljaka i AgNP može aktivirati mnoge metaboličke i proteomske odgovore i dovesti do značajnih promjena u morfologiji i fiziologiji biljke (Farooqui i sur. 2016, Rai i sur. 2018). Primjerice, promjene u stomatalnoj vodljivosti i kloroplastima mogu inhibirati fotosintetsku aktivnost, a prisutnost AgNP u vaskularnim dijelovima biljke može utjecati na unos vode i važnih nutrijenata. Osim toga, promjene u strukturi stanice i metabolizmu uzrokovane pojačanom proizvodnjom reaktivnih oblika kisika (eng. *reactive oxygen species*, ROS) mogu poremetiti signalne puteve prijenosa elektrona i negativno utjecati na biljni genom i proteom (Budhani i sur. 2019).

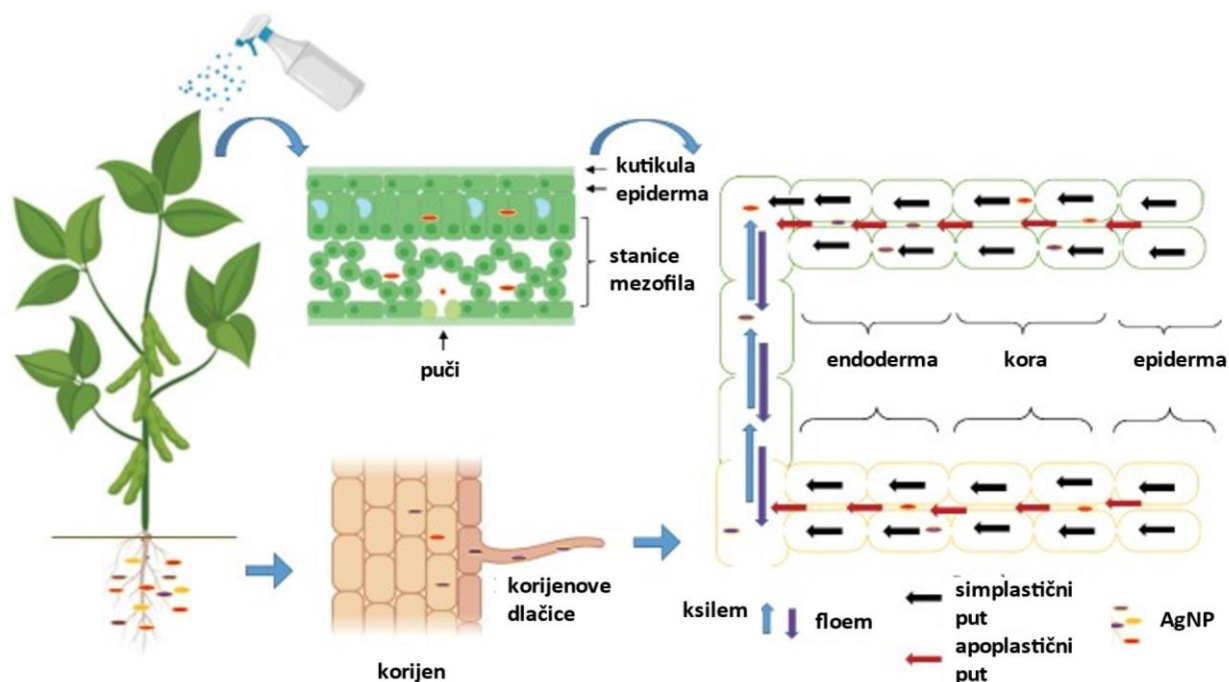
2.4.1. Ulazak AgNP u biljke

Razumijevanje puteva ulaska AgNP u biljke bitno je za praćenje njihove bioakumulacije u okolišu. Osim toga, od velikog je značaja dokazivanje translokacije AgNP unutar biljke, kao i prikaz njihovih transformacija tijekom tog procesa. AgNP mogu ući u biljke direktno iz tla

putem korijena, putem nadzemnog tkiva ili kroz oštećenja na biljci izazvana drugim biotičkim i abiotičkim stresorima (Slika 6) (Ali i sur. 2021).

Prvi korak u bioakumulaciji AgNP predstavlja njihova adsorpcija na tkivo korijena, nakon čega, ovisno o karakteristikama AgNP, slijedi njihov ulazak u korijen (Nair i sur. 2010). AgNP u korijen mogu ući pasivnim putem kroz pore epidermalnih stanica ili potpomognute osmotskim tlakom i kapilarnim silama (Lin i Xing 2008, Du i sur. 2011). Iako semipermeabilnost stanične stijenke ne dopušta ulazak većih nanočestica, oštećenja uzrokovana AgNP manjih dimenzija mogu stvoriti dodatne pore ili povećati postojeće i na taj način omogućiti ulazak AgNP većih dimenzija (Navarro i sur. 2008a, Ali i sur. 2021). Daljnji transport AgNP unutar biljnog tkiva odvija se kroz izvanstanične prostore putem apoplastičnog transporta sve do prelaska u vaskularno tkivo, gdje ulaze putem endocitoze ili transportnih proteina, a kretanje nastavljaju pomoću plazmodezmija (Pérez-de-Luque 2017, Tripathi i sur. 2017b). Ksilem predstavlja najvažnije tkivo za translokacije AgNP u biljkama jer omogućava kretanje AgNP od korijena preko stabljike do listova i plodova (Ma i sur. 2010, Aslani i sur. 2014).

Osim kroz korijen, AgNP mogu biti aplicirane i putem listova biljaka, a njihov ulazak se odvija kroz puči i kutikulu. Ulazak će ovisiti o karakteristikama AgNP, ali i o morfologiji i kemijskom sastavu lista, poput prisutnosti trihoma ili zaštitnih smola (Larue i sur. 2014). Apoplastičnim i simplastičnim putem AgNP dolaze do floema, koji ih može transportirati po cijeloj biljci (Ali i sur. 2021).



Slika 6. Prikaz ulaska i transporta AgNP u biljku. Preuzeto i prilagođeno iz Ali i sur. 2021.

Funkcionalizacija AgNP može imati veliki utjecaj na njihov unos i transport unutar biljke, pri čemu važnu ulogu ima površinski naboj. Dosadašnja su istraživanja pokazala da je translokacija negativno nabijenih nanočestica značajno veća u odnosu na pozitivno nabijene nanočestice, koje se češće akumuliraju na površini korijena onemogućavajući unos nutrijenata u biljku (Ruttkey-Nedecky i sur. 2017, Ali i sur. 2021).

2.4.2. Utjecaj AgNP na isključavanje, rani rast i morfologiju biljaka

S obzirom na sve učestaliju primjenu nanočestica u poljoprivredi, bitno je razumjeti njihov utjecaj u cijelosti, počevši od sjemenke. Isključavanje sjemenke predstavlja prvi korak rasta biljke i najosjetljiviji je dio biljne ontogeneze. Započinje imbibicijom zrele sjemenke a završava probijanjem radikule (Han i sur. 2015). Nepovoljni uvjeti u vrijeme isključavanja mogu utjecati na kataboličke i anaboličke procese u sjemenki i usporiti brzinu isključavanja i kasniji rast biljke (Hatami 2017). Isključavanje je regulirano signalnim procesima koji uključuju ROS i fitohormone koji su uključeni u procese popuštanja stanične stijenke, unosa vode i izduženja stanice koji prekidaju dormanciju sjemenke. Ipak, kada su razine ROS previsoke, dolazi do različitih oksidacijskih oštećenja koji negativno utječu na isključavanje (Oracz i Karpinski 2016, Bailly 2019, Choudhary i sur. 2020). Sjemenka lupina građena je od sklerenhima i služi kao prepreka za ulazak tvari prisutnih u okolišu (Radchuk i Borisjuk 2014). Da bi ušle u sjemenku,

AgNP moraju penetrirati sjemenu lupinu, najvjerojatnije korištenjem parenhimskih međustaničnih prostora i difuzijom kroz kotiledone (Tripathi i sur. 2017b).

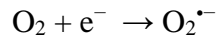
Dosadašnja istraživanja pokazala su kako AgNP mogu imati i pozitivne i negativne učinke na isključavanje i rani rast biljaka, što ovisi ponajviše o veličini i koncentraciji primijenjenih AgNP (Szöllösi i sur. 2020). Naime, niske koncentracije AgNP mogle bi poslužiti za predsjetveni tretman sjemenki (eng. *priming*), jer su pokazale sposobnost da povećaju brzinu i postotak isključavanja te pozitivno utječu na rast klijanaca pojedinih biljnih vrsta (Almutairi i Alharbi 2015, Pražak i sur. 2020). Ipak, više je istraživanja ukazalo na negativan utjecaj AgNP, pogotovo pri većim primijenjenim dozama, koji se ispoljava u obliku snažne inhibicije isključavanja, smanjenog rasta korijena i listova i smanjenja ukupne biomase biljke (Kaveh i sur. 2013, Dimkpa i sur. 2013, Nair i Chung 2014b, Al-Huqail i sur. 2018, Pereira i sur. 2018). Uz navedeno, stabilizacija AgNP različitim tipovima omotača također utječe na odgovor sjemenki. Primjerice, tretmani s AgNP-GA izazvali su značajnu inhibiciju isključavanja i rasta nekih močvarnih vrsta, dok tretmani s AgNP-PVP primijenjeni u istim koncentracijama nisu pokazali značajan utjecaj na ispitivane parametre (Yin i sur. 2012).

2.4.3. Pojava oksidacijskog stresa

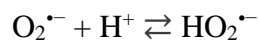
U okolišnim uvjetima bez stresa, ROS predstavljaju nusprodukte uobičajenih metaboličkih puteva koji su lokalizirani u organelima poput kloroplasta, mitohondrija i peroksisoma (Møller i sur. 2007). Takvi ROS se održavaju u ravnoteži specifičnim antioksidacijskim enzimima kao što su superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT) i različite peroksidaze, čija aktivnost pomaže izbjegavanju oksidacijskih oštećenja u stanici (Apel i Hirt, 2004). Ipak, u uvjetima okolišnog stresa stvara se povećana koncentracija ROS koji putem prijenosa elektrona mogu uzrokovati značajna oštećenja biomolekula (Carocho i Ferreira 2013). Najčešći oblici ROS-a prisutni u biljkama su singletni kisik ($^1\text{O}_2$), superoksidni radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$), vodikov peroksid (H_2O_2) i hidroksilni radikal (HO^{\cdot}) (Apel i Hirt 2004, Mittler i Zilinskas 2003). Svaki oblik ROS-a ima različit oksidacijski kapacitet i vrijeme postojanja te utječe na različite fiziološke i biokemijske reakcije.

$^1\text{O}_2$ se obično stvara u fotosistemu II (eng. *photosystem II*, PSII) kloroplasta prilikom otpuštanja energije ekscitirane molekule klorofila kada tripletni molekularni kisik (O_2) prelazi u visoko reaktivni $^1\text{O}_2$ (Dmitrieva i sur. 2020). Ova ROS molekula prvenstveno ima značajan utjecaj na proces fotosinteze, međutim difuzijom izvan kloroplasta može oštetiti membranu, tonoplast i utjecati na signalne kaskade citosola (Fischer i sur. 2013, Huang i sur. 2019). Osim toga,

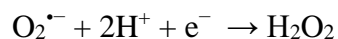
primitkom elektrona iz transportnog lanca elektrona ili zbog aktivnosti nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (NADPH) oksidaze, $^1\text{O}_2$ može stvoriti $\text{O}_2^{\bullet-}$ prema sljedećoj reakciji:



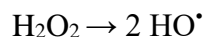
$\text{O}_2^{\bullet-}$ dalje služi kao prekursor drugih oblika ROS-a zbog izrazite nestabilnosti i jakih redukcijskih svojstava kojima tvori snažne oksidanse. Osim toga, može stvarati i reaktivne oblike dušika (eng. *reactive nitrogen species*, RNS), reaktivne oblike karbonila (eng. *reactive carbonyl species*, RCS) i reaktivne oblike sumpora (eng. *reactive sulfur species*, RSS), koji također nanose štetu stanici (Molassiotis i Fotopoulos, 2011, Suzuki i sur. 2012). Smatra se da $\text{O}_2^{\bullet-}$ u manjim koncentracijama održava stabilnost biljnih matičnih stanica, ali u previsokim koncentracijama može uzrokovati staničnu smrt (Gill i Tuteja, 2010, Zeng i sur. 2017). Protonizacijom $\text{O}_2^{\bullet-}$ nastaje hidroperoksilni radikal ($\text{HO}_2^{\bullet-}$), mnogo stabilnija ali i reaktivnija forma:



Osim toga, dismutacijom $\text{O}_2^{\bullet-}$ stvara se H_2O_2 :



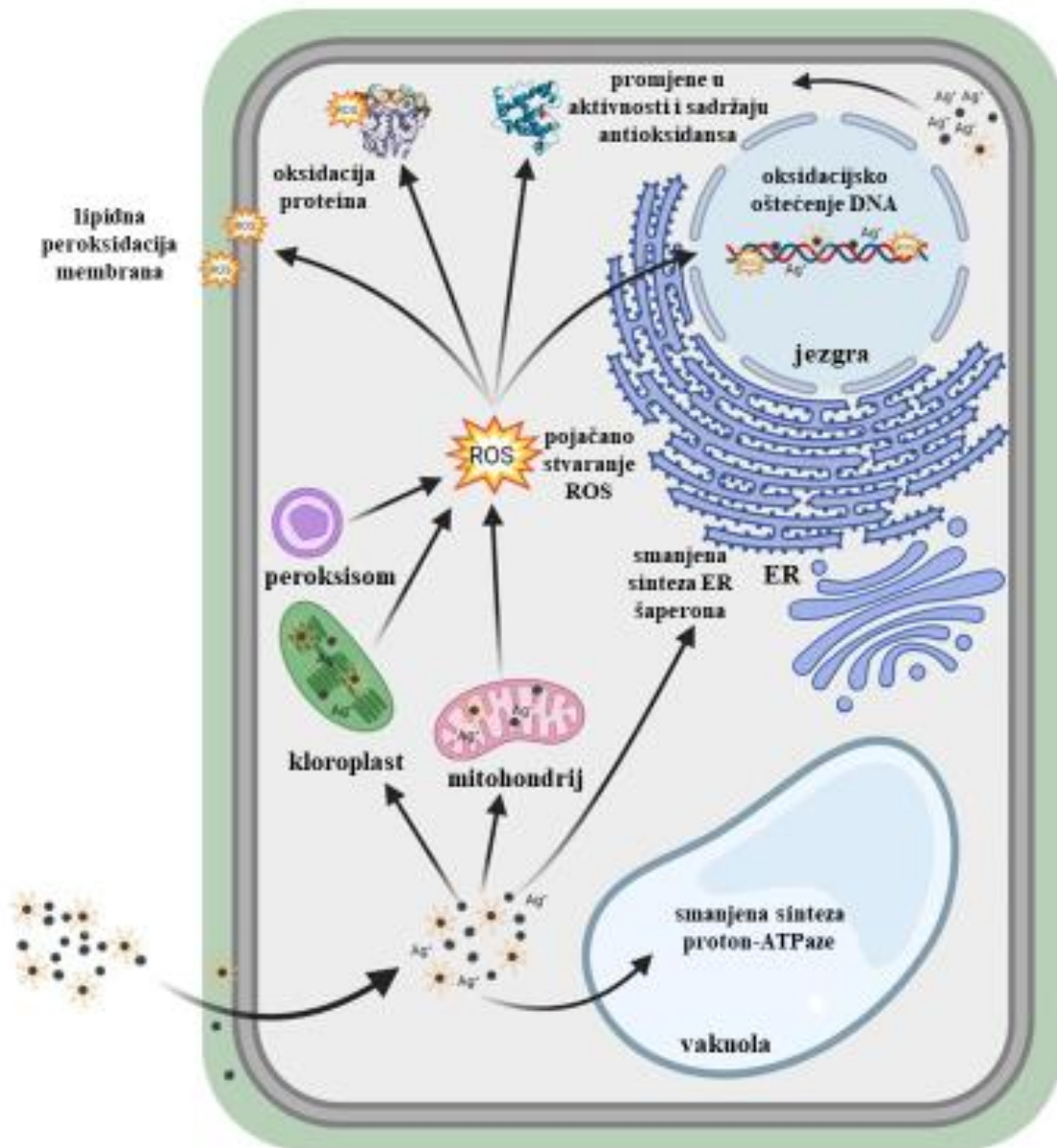
H_2O_2 je izrazito stabilan oksidans koji se može prenositi putem akvaporina te na taj način sudjeluje u regulaciji signalizacije stanice, ali uzrokuje i oksidacijska oštećenja u svim dijelovima biljke (Mittler 2017, Wudick i sur. 2015). Osim toga, zajedno s različitim hormonima, H_2O_2 regulira razvoj biljke i njezin odgovor na stres (Ribeiro i sur. 2017, Zeng i sur. 2017). Raspadom H_2O_2 nastaje HO^{\bullet} :



HO^{\bullet} je veoma reaktivan i djeluje u blizini nastanka. Nije poznat mehanizam njegovog uklanjanja pa predstavlja izvor nepovratnog oštećenja biomolekula poput lipida, proteina i molekule DNA (He i sur. 2012, Li i sur. 2017).

Najčešća metoda detekcije ROS-ova uključuje uporabu proba koje se oksidiraju molekulama ROS prisutnima u stanici, što dovodi do pojave fluorescencije koja se može pratiti nekom od mikroskopijskih metoda, pomoću čitača mikrotitarskih pločica ili protočnom citometrijom (Zhang i sur. 2018). Za detekciju $\text{O}_2^{\bullet-}$ najčešće se koristi dihidroetidij (DHE), dok se H_2O_2 mjeri primjenom diklorodihidrofluorescein diacetata (DCFH-DA) i boje Amplex Red (Ortega-Villasante i sur. 2016). Osim putem fluorescencije, ROS se u stanici mogu detektirati i

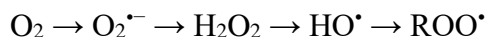
kemiluminiscentnim metodama, uporabom luminola i njegovog analoga L-012, ili spektrofotometrijski, prateći promjene apsorbancije nastale uslijed reakcije radikala i reducirajućih supstrata poput nitroplavog tetrazolija (eng. *nitroblue tetrazolium*, NBT), koji u reakciji s $O_2^{\cdot -}$ stvara obojani produkt diformazan ili 3,3'-diaminobenzidina (DAB), koji reagira s H_2O_2 pri čemu nastaje smeđi talog.



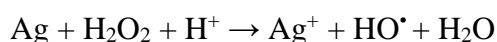
Slika 7. Utjecaj AgNP na pojavu oksidacijskog stresa i oštećenje važnih biomolekula u biljnoj stanici. ER – endoplazmatski retikulum. Preuzeto i prilagođeno prema Biba i sur. 2022.

Interakcija AgNP i biljaka može rezultirati različitim toksičnim učincima koji većinom nastaju zbog pojave oksidacijskog stresa (Slika 7) uzrokovanog pojačanom produkcijom ROS-a (Kim i sur. 2007, Hwang i sur. 2008) ili interakcijom iona Ag^+ otpuštenih s površine AgNP s tiolnim

skupinama važnih enzima i proteina (Bottero i sur. 2011). Sve navedeno dovodi do značajnih promjena u staničnom disanju, transportu membranskih iona i, u konačnici, može uzrokovati staničnu smrt (Levard i sur. 2012). Nanočestice metala, poput AgNP, imaju sposobnost donacije elektrona O₂ pri čemu započinju kaskadnu reakciju radikala u stanici, što počinje od nastanka O₂^{•-} a nastavlja se nakupljanjem ostalih oblika ROS-a (Flores-López i sur. 2019):



Metalne nanočestice, kao reducensi u stanici, također mogu pojačati stvaranje iznimno reaktivnog HO[•] katalitičkim djelovanjem u reakcijama nalik Fentonovoj ili Haber-Weissovoj (He i sur. 2012, Wang i sur. 2013a, Yu i sur. 2020), a reakcija u slučaju AgNP je sljedeća:



Osim toga, AgNP mogu dodatno povećati akumulaciju svih tipova ROS-a ometajući funkciju kloroplasta i mitohondrija, uzrokujući promjene u transportu elektrona i povećavajući omjer NADP⁺/NADPH (Wang i sur. 2017, Yu i sur. 2020). Uz to, ioni Ag⁺ koji se otpuštaju s površine AgNP mogu uzrokovati deaktivaciju staničnih enzima, oštećenje stanične membrane i smanjenje membranskog potencijala mitohondrija i na taj način sudjelovati u pojavi oksidacijskog stresa (Carlson i sur. 2008, Jiang i sur. 2008).

Dosadašnja su istraživanja utvrdila pozitivnu korelaciju između akumulacije ROS i primijenjene koncentracije AgNP u biljkama (Bagherzadeh Homaei i Ehsanpour 2016, Cvjetko i sur. 2018, Peharec Štefanić i sur. 2018). Uz to, visoke koncentracije AgNP koje dovode do značajne akumulacije ROS i posljedičnih oštećenja važnih biomolekula mogu uzrokovati smanjenje vijabilnosti stanica, kao što je pokazano na biljkama *Lemna gibba* (Oukarroum i sur. 2013) i *Oryza sativa* (Nair i Chung 2014b).

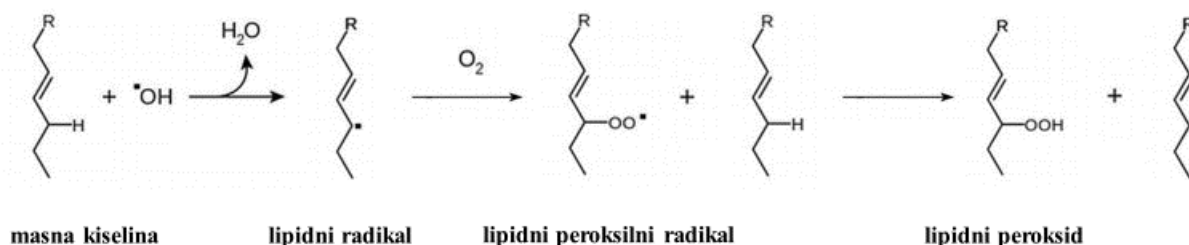
2.4.4. Oksidacijsko oštećenje biomolekula

Pojačano stvaranje ROS-ova uzrokovano AgNP tretmanima u biljkama može dovesti do pojave oksidacijskih oštećenja važnih biomolekula: lipida, proteina i molekule DNA (Raja i sur. 2017).

2.4.4.1. Oštećenje lipida

Lipidi su esencijalni dijelovi staničnih membrana, koji osim strukturalne komponente imaju i različite biološke funkcije poput pohrane energije, prijenosa signala i odgovora na stres. Podložni su oksidacijskim oštećenjima, što je posebno izraženo kod polinezasićenih masnih kiselina (eng. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA), važnih komponenti membrana (Yin i sur. 2011a). Oštećenja nastaju u lančanoj reakciji oksidacije PUFA potaknutom ROS-om, gdje napad na jednu molekulu PUFA dovodi do pretvaranja mnogih bočnih ogranaka masnih kiselina u lipidne peroksidge i u konačnici dovodi do degradacije membrana (Sachdeva i sur. 2014).

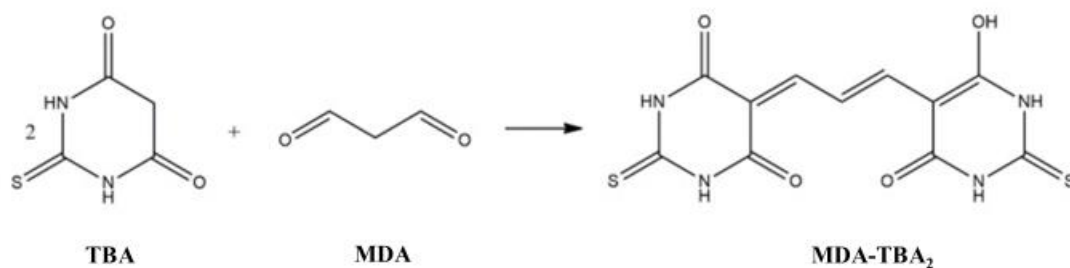
Sama reakcija peroksidacije podijeljena je u tri veća koraka: inicijaciju, propagaciju i terminaciju. Inicijacija započinje oksidacijom masne kiseline hidroksilnim radikalom, pri čemu kao produkt nastaje lipidni radikal (Slika 8.). Lipidni radikal je jako nestabilan, te u fazi propagacije reagira s O₂ te stvara reaktivan lipidni peroksilni radikal. On zatim reagira sa sljedećom masnom kiselinom pri čemu nastaje lipidni peroksid i novi lipidni radikal. Ovaj mehanizam lančane reakcije radikala nastavlja se sve dok ne dođe do međusobne reakcije dva radikala, pri čemu se stvara neradikalni produkt i završava reakcija (Hashemi 2019).



Slika 8. Mehanizam nastanka lipidnih peroksidge. Preuzeto i prilagođeno iz Hashemi 2019.

U zadnjem koraku peroksidacije nezasićenih masnih kiselina nastaju mnogi aldehidi koji mogu uzrokovati različita ireverzibilna oštećenja stanice reagirajući s proteinima, molekulom DNA i fosfolipidima (Marí i sur. 2010). Među njima su najzastupljeniji malondialdehid (MDA), 4-hidroksinonenal (HNE), akrolein i krotonaldehid (Repetto i sur. 2012), koji pripadaju skupini radikala RCS. Često se koriste kao biomarkeri lipidne peroksidacije jer u reakciji s tiobarbituratnom kiselinom (eng. *thiobarbituric acid*, TBA) daju obojani produkt koji se može mjeriti spektrofotometrijskim metodama, pa se navedene molekule u literaturi nazivaju i

tiobarbituratni reaktivni oblici (eng. *thiobarbituric reactive species*, TBARS) (Jambunathan 2010, Sharma i sur. 2012, El-Beltagi i Mohamed 2013).



Slika 9. Prikaz jednadžbe kemijske reakcije tiobarbituratne kiseline (TBA) i malondialdehida (MDA) u kojoj nastaje crveno obojani adukt MDA-TBA₂. Preuzeto iz Bedlovicova i sur. 2020.

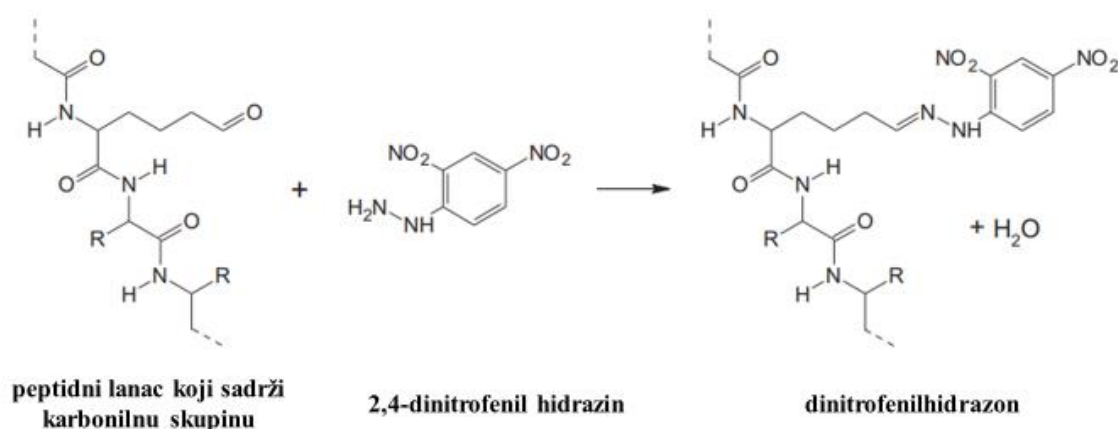
Dosadašnja su istraživanja ukazala na snažno oštećenje lipida kod biljaka tretiranih AgNP. Povećane koncentracije MDA u tretmanima s AgNP zabilježene su kod vrsta *Wolffia globosa* (Zou i sur. 2016), *Glycine max* (De La Torre-Roche i sur. 2013, Galazzi i sur. 2019), *Solanum lycopersicum* (Çekiç i sur. 2017) i klijancima duhana (*Nicotiana tabacum*) (Peharec Štefanić i sur. 2018). Uz to, zabilježene su razlike u razini oštećenja lipida u različitim dijelovima biljke. Primjerice, u listu vrste *N. tabacum* izmjereno je povećanje MDA pri najvišoj koncentraciji tretmana AgNP, dok kod korijena promjena u razini MDA nije bila značajna (Cvjetko i sur. 2018). Poznato je da omotač za stabilizaciju može utjecati na toksičnost AgNP, pa tako i na oštećenje lipida. Na vrsti *Spirodela polyrhiza* pojačanje lipidne peroksidacije detektirano je nakon tretmana s AgNP-GA, ali ne i nakon izlaganja česticama AgNP-PVP (Jiang i sur. 2014). Slično tome, Cvjetko i sur. (2017) su izmjerili povećanje koncentracije TBARS u korijenu vrste *Allium cepa*, koje je bilo značajno više pri tretmanu s AgNP-CTAB u usporedbi s AgNP-citrat i AgNP-PVP tretmanima istih koncentracija.

2.4.4.2. Oštećenje proteina

Oksidacijske promjene proteina uzrokovane ROS molekulama vidljive su kroz različite posttranslacijske modifikacije (PTM), koje mogu aktivirati ili deaktivirati proteine te modificirati njihove međusobne interakcije (Tola i sur. 2021). Promjene se mogu dogoditi direktnom oksidacijom nekih aminokiselina ili dodatkom karbonilne skupine. Karbonilacija proteina najčešća je kemijska modifikacija proteina i predstavlja ireverzibilnu PTM koja uključuje dodatak aldehidne ili ketonske skupine na bočne ogranke određenih aminokiselina (Stadtman 1990, Colombo i sur. 2016). Poznata su dva načina postanka ove modifikacije; prvi

način uključuje metalom kataliziranu oksidaciju bočnih ogranaka lizina, prolina i treonina koja je potaknuta radikalom HO[•] nastalim u Fentonovoj reakciji (Fedorova 2017, Biswas i sur. 2020). Drugi način uključuje dodatak radikala RCS, kao što su prethodno navedeni akrolein, 4-HNE i MDA, na bočne ogranke cisteina, histidina i lizina (Farmer i Mueller 2013, Moller i sur. 2007). Karbonilacija proteina dovodi do njihove inaktivacije i degradacije i dobar je indikator postojanja oksidacijskog stresa u stanici (Tola i sur. 2021).

Kvantifikacija nastalih karbonila u tkivu najčešće se radi derivatizacijom karbonilne skupine 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) (Slika 10.), nakon čega slijedi spektrofotometrijsko mjerenje nastalog produkta dinitrofenilhidrazona (Weber i sur. 2015).



Slika 10. Detekcija proteinskih karbonila reakcijom s 2,4-dinitrofenilhidrazinom. Preuzeto i prilagođeno iz Weber i sur. 2015.

Karbonilacija proteina uzrokovana ROS pri tretmanima s AgNP za sada je slabo istražena na biljkama. Tretman korjenčića vrste *Allium cepa* s tri tipa različito stabiliziranih AgNP (AgNP-citrat, AgNP-PVP i AgNP-CTAB) izazvao je povećanje koncentracije proteinskih karbonila ovisno o primijenjenoj koncentraciji, ali ne i korištenom omotaču (Cvjetko i sur. 2017). Pokusi provedeni na vrsti *N. tabacum* pokazali su da AgNP uzrokuju značajno povećanje koncentracije proteinskih karbonila u klijancima (Peharec Štefanić i sur. 2018), dok isto nije zabilježeno na korijenu i listovima odraslih biljaka (Cvjetko i sur. 2018), pokazujući kako je stadij klijanaca puno osjetljiviji na stres uzrokovan AgNP. U oba je istraživanja usporedni tretman s AgNO₃ istih koncentracija uzrokovao pojačanu karbonilaciju na svim vrstama tkiva, što pokazuje na različit mehanizam djelovanja AgNP i iona Ag⁺.

2.4.4.3. Oštećenje molekule DNA

Nukleinske kiseline posebno su podložne oksidacijskim oštećenjima. Zbog slabog redoks potencijala, ROS mogu reagirati direktno s nukleotidima koji ih grade te ih nepovratno modificirati. Takav primjer vidi se kod oksidacije gvanina u 8-dihidro-7,8-oksogvanin (Neeley i Essigmann, 2006), što uzrokuje pogrešno sparivanje baza i povećava količinu transverzijskih mutacija (Avkin i Zvi 2002). Navedene promjene glavni su uzrok pogrešnog kodiranja gena, aneuploidija, poliploidija, jedno- i dvolančanih lomova DNA te aktivacije mutageneze u stanicama koje su izložene tretmanu različitim nanočesticama (Jena 2012, Levine i sur. 2017).

Genotoksični utjecaj abiotičkog stresa u biljkama može se pratiti na više načina. *Allium* test često je korištena tehnika za praćenje pojave kromosomskih aberacija koje mogu biti posljedica oštećenja molekule DNA ili diobenog vretena tijekom mitoze (Fiskesjo 1979), dok Comet test, odnosno gel elektroforeza jedne stanice (eng. *single cell gel electrophoresis assay*, SCGE) mjeri jedno- i dvolančane lomove na lancu DNA (Gichner i sur. 2003). Za provjeru genotoksičnog učinka nekog tretmana može se koristiti i tehnika lančane reakcije polimerazom (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) (Çekiç i sur. 2017), koja prati promjene u ekspresiji određenih gena od interesa.

Dosadašnja su istraživanja, provedena navedenim tehnikama, pokazala da tretman AgNP u biljkama ima pretežno genotoksičan učinak, pri čemu razina oštećenja molekule DNA ovisi o karakteristikama primijenjenih AgNP. Zabilježeni su lomovi molekule DNA (Kumari i sur. 2009, Patlolla i sur. 2012, Fouad i Hafez 2018, Biba i sur. 2021a), pojačana pojava mikronukleusa i kromosomskih aberacija (Patlolla i sur. 2012), kao i značajno smanjenje mitotskog indeksa (MI) (Patlolla i sur. 2012, Cvjetko i sur. 2017, Fouad i Hafez 2018).

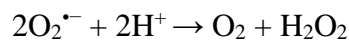
2.5. Antioksidacijski sustav biljaka

Biljke su razvile učinkovit sustav za održavanje sadržaja ROS-a koji omogućava optimalnu regulaciju procesa esencijalnih za rast i razvoj biljke ali i štiti od destruktivnih oksidacijskih reakcija (Mittler 2017). Antioksidansi koji sudjeluju u održavanju redoks ravnoteže biljke nalaze se podjednako unutar stanice i u apoplastu, što regulaciju čini efikasnijom. Taj se antioksidacijski sustav biljke sastoji od enzimskih i neenzimskih komponenti (Arora i sur. 2002), čija međusobna interakcija održava zdravi status biljke.

2.5.1. Sustav enzimskih antioksidansa

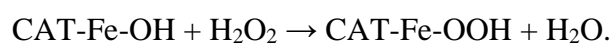
Enzimski sustav antioksidansa sastoji se od različitih enzima čija je uloga razgradnja ROS i održavanje redoks homeostaze biljke. Čine ga superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), različite peroksidaze [askorbat peroksidaza (APX), glutation peroksidaza (GP), gvajakol peroksidaza (GPX)], glutation reduktaza (GR), glutation-S-transferaza (GST), monodehidroaskorbat reduktaza (MDHAR) i dehidroaskorbat reduktaza (DHAR) (Hasanuzzman i sur. 2020).

Kod biljaka, enzim SOD direktno je povezan sa stanjem oksidacijskog stresa te započinje prvu liniju obrane, pretvorbu $O_2^{\cdot-}$ u manje reaktivan H_2O_2 (Del Río i sur. 2018), prema reakciji:

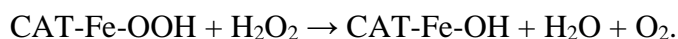


Time se umanjuje rizik od kasnijeg nastanka HO^{\cdot} koji se iz $O_2^{\cdot-}$ stvara u Haber-Weiss reakciji kataliziranoj metalima. Ova pretvorba spada u reakcije dismutacije, što znači da reaktant, $O_2^{\cdot-}$ djeluje istovremeno kao reducens i oksidans, a nastali produkti imaju više (O_2), odnosno niže oksidacijsko stanje (H_2O_2) (Pan i Yau 1992). Reakcija je omogućena naizmjeničnom oksidacijom i redukcijom metalnog iona koji se nalazi u aktivnom mjestu enzima SOD (Culotta i sur. 2006), a prema metalnom kofaktoru razlikuju se tri izoenzima SOD otkrivena u biljkama: mangan (Mn-SOD), bakar/cink (Cu/Zn-SOD) i željezo (Fe-SOD). Navedeni izoenzimi razlikuju se prema staničnoj lokalizaciji; Mn-SOD pretežno se nalazi u mitohondrijima i peroksisomima, Cu/Zn-SOD lokaliziran je u citoplazmi, kloroplastima, peroksisomima i apoplastu, dok se Fe-SOD nalazi isključivo u kloroplastima (Stephenie i sur. 2020). SOD je veliki protein kojega čine dvije podjedinice, a u nativnoj formi može biti u obliku homo-dimera i homo-tetramera (Alscher i sur. 2002). Metalni kofaktori SOD imaju važnu ulogu u stabilizaciji međuprodukta dismutacije $O_2^{\cdot-}$, ali su i podložni reakciji s anionima poput fluoridnih (F^-), cijanidnih (CN^-) ili nitridnih (N_3^-) iona, što može dovesti do inhibicije njihove aktivnosti (Gill i sur. 2015).

Katalitička aktivnost enzima CAT služi za neutralizaciju H_2O_2 u reakciji koja se odvija u dva koraka. U prvom koraku, H_2O_2 oksidira Fe prisutno u CAT, pri čemu se stvara željezov peroksid (Fe-OOH), međuprodukt koji se može zadržati na enzimu u slučaju niske koncentracije H_2O_2 :

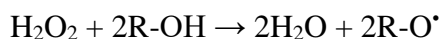


Pri višim koncentracijama, druga molekula H_2O_2 služi kao reducens Fe-OOH, pri čemu se enzim regenerira otpuštajući H_2O i O_2 :



Zabilježene su mnoge forme CAT koje se eksprimiraju u različitim razvojnim fazama i tkivima biljaka, a broj gena koji ih kodira razlikuje se među različitim biljnim vrstama (Anjum i sur. 2016). U biljci duhana postoje tri gena koja kodiraju za CAT i čine osnovu njihove raspodjele u tri skupine. Prva skupina ima ulogu u fotosintetskom tkivu gdje neutralizira H_2O_2 koji se stvara tijekom fotorespiracije. Druga skupina se nalazi u provodnim tkivima, sudjeluje u procesima lignifikacije, starenja i odgovora na apscizinsku kiselinu. Treća skupina se eksprimira u sjemenkama i reproduktivnim dijelovima biljke, a aktivnost je pojačana tijekom katabolizma masnih kiselina u glioksisomima (Rajput i sur. 2021). U nativnoj formi, CAT je tetramerni protein te se sastoji od četiri podjedinice veličine od oko 55 kDa. Zbog prisutnosti Fe, CAT može biti inaktivirana u prisutnosti cijanida, azida i hidroksilamina, a inhibicija nakon interakcije s aminotriazolom i merkaptetanolom ukazuje na prisustvo tiolne skupine u katalitičkom mjestu enzima (Anjum i sur. 2016).

Biljne peroksidaze (POX) sekundarna su linija obrane od H_2O_2 koja se aktivira u kombinaciji s CAT. POX kataliziraju oksidaciju fenolnih supstrata koristeći H_2O_2 kao akceptor elektrona (Agati i sur. 2012):



Radi se o velikoj skupini glikoproteaza koje su lokalizirane u izvanstaničnim prostorima i vakuoli kao monomeri molekulske mase između 33 i 55 kDa, a osim u održavanju redoks ravnoteže u stanici, imaju različite uloge u rastu i razvoju biljaka (Rajput i sur. 2021).

Jedna od najčešćih metoda praćenja aktivnosti peroksidaza je putem oksidacije pirogalola ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$), koji služi kao donor vodika, prema reakciji:



U reakciji nastaje purpurogalin ($\text{C}_{11}\text{H}_8\text{O}_5$), produkt narančaste boje, kojega je moguće pratiti spektrofotometrijski (Maehly i Chance 1954).

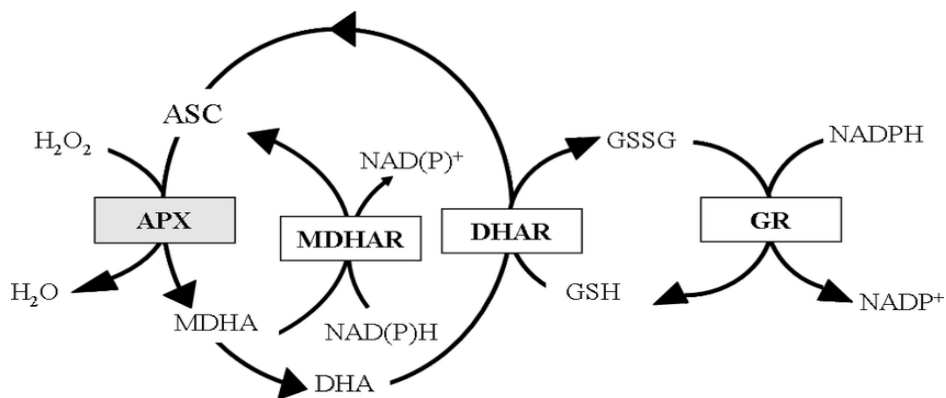
APX pripada razredu peroksidaza koje sadrže hem u aktivnom mjestu enzima, te koristi askorbat (ASC) kao specifični donor elektrona za pretvorbu H_2O_2 u H_2O prema reakciji:



pri čemu MDHA nastaje kao termodinamički nestabilan međuprodukt koji ubrzo spontano prelazi u dehidroaskorbat (DHA) (Caverzan i sur. 2012). U odsutnosti askorbata, APX postaju

jako nestabilne i brzo gube aktivnost. Osim toga, njihova je aktivnost inhibirana dodatkom cijanida i azida, čime se ističe uloga Fe u molekuli hema. U biljnoj stanici nalaze se u citosolu, mitohondrijima, kloroplastima, peroksisomima i glioksisomima (Rajput i sur. 2021).

APX se smatra ključnim enzimom glutation-askorbat ciklusa, važnog metaboličkog puta za uklanjanje H_2O_2 koji uključuje askorbat, reducirani glutation (GSH) i NADPH te pripadajuće enzime (Noctor i Foyer 1998) (Slika 11.). Ciklus započinje redukcijom H_2O_2 u vodu, što katalizira APX uz ASC kao donor elektrona. Oksidirani askorbat (monodehiroaskorbat, MDHA) je radikal koji se regenerira uz pomoć enzima monodehidroaskorbat reduktaze (MDHAR), ali ako se redukcija ne odvije, brzo dolazi do njegovog raspada na dehidroaskorbat (DHA) i ASC. DHA se reducira u ASC pomoću enzima dehidroaskorbat reduktaze (DHAR), uz utrošak GSH koji prelazi u svoj oksidirani dimer glutation disulfid (GSSG). GSH se regenerira koristeći enzim glutation reduktazu (GR) i NADPH, koji pri tome služi kao donor elektrona (Rajput i sur. 2021).



Slika 11. Prikaz ciklusa glutation-askorbat. ASC – askorbat, MDHA - monodehiroaskorbat, DHA – dehidroaskorbat, APX – askorbat peroksidaza, MDHAR - monodehidroaskorbat reduktaza, DHAR - dehidroaskorbat reduktaza, GSH – reducirani glutation, GSSG – glutation disulfid, GR – glutation reduktaza, NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat. Preuzeto iz Locato i sur. 2013.

Aktivnost antioksidacijskih enzima najčešće se kvantitativno određuje putem UV-Vis spektrofotometrije, praćenjem promjena u apsorbanciji uslijed reakcija koje kataliziraju enzimi od interesa. Aktivnost CAT prati se putem brzine razgradnje supstrata, H_2O_2 (Aebi 1984), dok se aktivnost peroksidaza mjeri brzinom nastajanja produkta reakcije, poput MDHA (APX) (Nakano i Asada 1981) ili purpurogalina (pirogalol peroksidaza, PPX) (Maehly i Chance 1954). Zbog nestabilnosti supstrata, aktivnost SOD prati se indirektno putem inhibicije reakcija koje pokreće $O_2^{\cdot-}$. U tu svrhu najčešće se koriste metoda koje uključuje riboflavin kao generator $O_2^{\cdot-}$ i NBT, čijom oksidacijom nastaje plavo obojani produkt formazan koji se može kvantificirati

(Beauchamp i Fridovich 1971). Aktivnost pojedinih izoenzima može se semikvantitativno odrediti kombinacijom native poliakrilamidne gel elektroforeze (eng. *polyacrylamide gel electrophoresis in native conditions*, Native PAGE) i tretmana dobivenih gelova u otopinama supstrata koji su specifični za pojedine enzime. Za detekciju izoformi SOD koristi se riboflavin/NBT metoda opisana ranije, pri čemu oksidacija žutog NBT-a dovodi do pojave plavog obojenja gela, osim na mjestima gdje se nalaze izoenzimi SOD koji inhibiraju reakciju i dovode do nastanka akromatskih proteinskih vrpca (Beauchamp i Fridovich 1971). Detekcija CAT temelji se na redukciji kalijevog ferocijanida ($K_3[Fe(CN)_6]$) u prisustvu H_2O_2 , pri čemu nastaje kalijev ferocijanid ($K_4[Fe(CN)_6]$), koji u reakciji s željezovim(III)kloridom ($FeCl_3$) tvori plavi precipitat berlinskog modrila ($Fe_4[Fe(CN)_6]_3$) koji boja gel. Na mjestima gdje se nalaze CAT izoenzimi nastat će žute vrpce zbog izostanka reakcije uzrokovanog enzimatskom razgradnjom H_2O_2 (Weydert i Cullen 2010). Izoforme APX moguće je detektirati na gelu u reakciji koja uključuje redukciju NBT pomoću askorbinske kiseline, što gelu daje plavo obojenje. Dodatkom H_2O_2 , navedena se reakcija onemogućava na mjestima gdje se nalazi APX koji katalizira oksidaciju askorbata, što se na gelu vidi u obliku akromatskih vrpca (Mittler i Zilinskas 1993). Izoforme PPX mogu se detektirati reakcijom H_2O_2 i pirogalola, pri čemu na mjestu gdje se nalazi PPX nastaju smeđe vrpce produkta purpurogalina (Mittler i Zilinskas 1993). Na kraju, ekspresija pojedinih izoformi SOD, CAT, APX i PPX može se detektirati upotrebom specifičnih antitijela nakon razdvajanja na gelu i prijenosa na nitroceluloznu membranu.

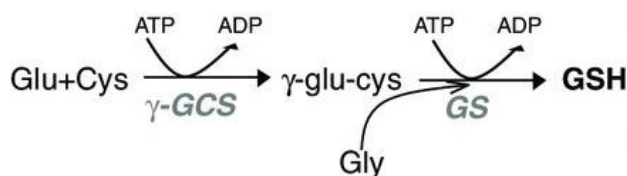
Većina je istraživanja utjecaja AgNP na biljnim vrstama ukazala na pojačanu aktivaciju antioksidacijskih enzima uslijed povećanja proizvodnje ROS. Aktivnost SOD, koja predstavlja prvu liniju obrane od ROS, bila je značajno povećana u vrstama *Wolffia globosa* (Zou i sur. 2016) i *Lycopersicon esculentum* (Song i sur. 2013) nakon tretmana s AgNP. Značajna aktivacija CAT i POD koji razgrađuju H_2O_2 je zabilježena u vrsti *Bacopa monnieri* (Krishnaraj i sur. 2012). Yasur i Rani (2013) izmjerili su značajno veću aktivnost SOD, CAT i POD nakon tretmana sjemenki vrste *Ricinus communis* sa AgNP-PVP. U klijancima vrste *N. tabacum* izmjereno je povećanje aktivnosti SOD i APX, aktivnost CAT nije pokazala značajne promjene, dok je aktivnost PPX bila niža u tretmanima s AgNP, ukazujući na ključnu ulogu APX u uklanjanju H_2O_2 (Peharec Štefanić i sur. 2018). Istraživanje na vrsti *Solanum tuberosum* pokazalo je pojačanu aktivnost SOD, CAT, APX i GR nakon tretmana sa AgNP koncentracija između 2 i 10 mg L⁻¹. Međutim, pri 20 mg L⁻¹ zabilježen je značajan pad enzimske aktivnosti koji ukazuje na zasićenje sustava visokim koncentracijama ROS (Bagherzadeh Homaei i

Ehsanpour 2016). Smanjenje aktivnosti APX i CAT popraćeno visokim koncentracijama ROS i snažnim oštećenjima biomolekula zabilježeno je i u tretmanu korijena vrste *Allium cepa* s česticama AgNP-citrat, AgNP-PVP i AgNP-CTAB (Cvjetko i sur. 2017), a slični su rezultati dobiveni u vrsti *N. tabacum* nakon izlaganja AgNP-citratu (Cvjetko i sur. 2018) te na dva varijeteta pšenice nakon tretmana s AgNP bez omotača (Barbasz i sur. 2016). Dosadašnja istraživanja utjecaja AgNP na aktivaciju enzimskog antioksidacijskog sustava temeljila su se pretežno na spektrofotometrijskim mjerenjima aktivnosti enzima, međutim, nedostaju informacije o aktivnosti pojedinih izoenzima koje bi mogle dati bolji uvid u mehanizam uklanjanja ROS u biljnoj stanici.

2.5.2. Sustav neenzimskih antioksidansa

Neenzimski antioksidansi imaju dvojaku ulogu; štite stanične komponente od oksidacijskog oštećenja te igraju važnu ulogu u rastu i razvoju stanice (de Pinto i de Gara 2004). Najčešći oblici neenzimskih antioksidansa su askorbinska kiselina, GSH, tokoferol, karotenoidi, fenoli te prolin.

GSH je tripeptid sastavljen od glutamata, cisteina i glicina, lokaliziran u svim dijelovima stanice (Foyer i Noctor 2003). Biosinteza GSH događa se povezivanjem aminokiselina u dva koraka, koja su ovisna o adenzin trifosfatu (eng. *adenosine triphosphate*, ATP) i katalizirana enzimima γ -glutamilcistein sintazom (γ -GCS) i glutation sintazom (GS) (Slika 12) (Hasanuzzaman i sur. 2017).

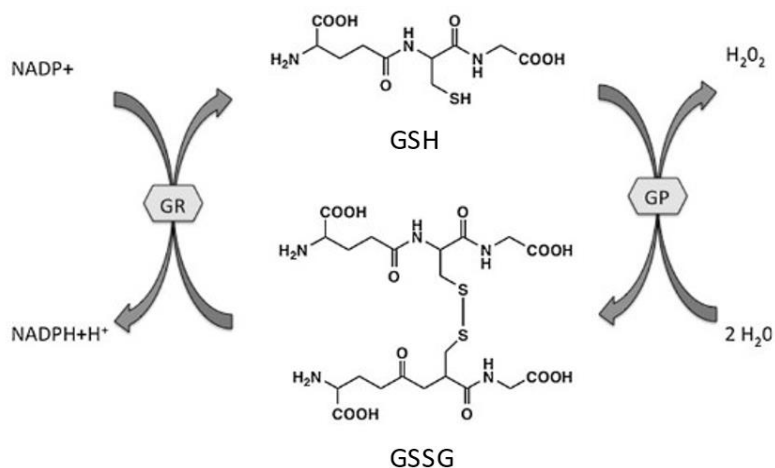


Slika 12. Biosinteza GSH. Glu – glutamat, Cys – cistein, Gly – glicin, γ -GCS – γ -glutamilcistein sintaza, GS – glutation sintaza, GSH – reducirani glutation, ATP – adenzin trifosfat, ADP – adenzin difosfat. Preuzeto i prilagođeno iz Marí i sur. 2010.

Zbog iznimne reaktivnosti tiolne skupine koju sadrži, GSH ima ulogu u mnogim biokemijskim reakcijama biljke te sudjeluje u obrani od oksidacijskog stresa, zagađenja teškim metalima i određenim kemijskim onečišćenjima (Mahmood i sur. 2010). U stanici se pretežito nalazi u svojoj monomernoj reduciranoj formi (GSH). Konverzija u oksidirani dimer GSSG događa se kroz niz biokemijskih reakcija unutar različitih staničnih organela, što je posebice pojačano u

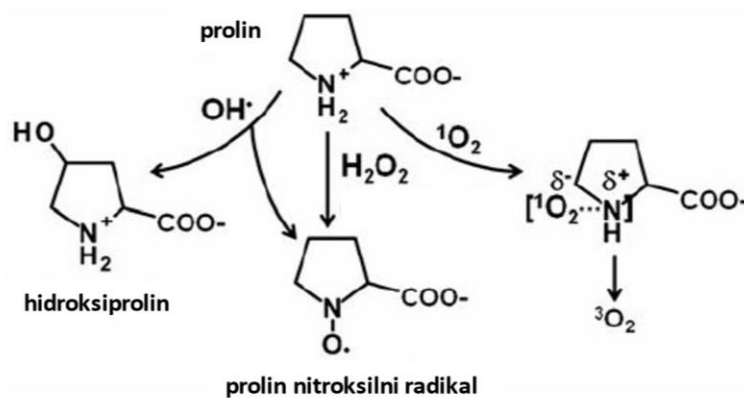
uvjetima stresa. Ravnoteža GSH/GSSG održava se prvenstveno enzimima GR i GP (Slika 13), a važnu ulogu ima i ciklus glutathion-askorbat (Slika 11) (Hasanuzzaman i sur. 2017). Uloga GSH kao antioksidansa vidljiva je na više razina. Može reagirati s ROS molekulama $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ i OH^{\cdot} . Uz to, sudjeluje u stabilizaciji membranske strukture uklanjanjem acilperoksida koji nastaju u tijeku lipidne peroksidacije. Kao reducens sudjeluje u sintezi askorbinske kiseline uz enzim DHAR. GSH je također i prekursor u sintezi fitokelatina, malih peptidnih molekula koje služe za detoksifikaciju biljaka od teških metala (El-Beltagi i Mohamed 2013).

Sadržaj glutathiona u tkivu mjeri se uporabom Ellmanovog reagensa (5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzojeva kiselina, DTNB), koji u reakciji s tiolnom skupinom GSH stvara GSSG i 5-tionitrobenzojevu kiselinu (TNB) koja se može spektrofotometrijski kvantificirati. Kako bi se izmjerio ukupni sadržaj glutathiona (GSH i GSSG), GSSG nastao u prethodnoj reakciji, kao i GSSG prisutan u tkivu, se reducira dodatkom enzima GR uz prisutnost NADPH, pri čemu nastaju dvije molekule GSH u postupku enzimske reciklaže (Rahman i sur. 2007, Salbitani i sur. 2017). Osim kolorimetrije, za mjerenje GSH može se koristiti i fluorimetrija uporabom boje monoklorobiman (eng. *monochlorobimane*, MCB) koja vezanjem za tiolnu skupinu GSH uz pomoć enzima GST fluorescira u plavom spektru, a jačina signala je povezana sa količinom GSH u stanici (Kamenčić i sur. 2000).



Slika 13. Prikaz održavanja ravnoteže GSH/GSSG u stanici. NADPH - nikotinamid adenin dinukleotid fosfat, GR – glutathion reduktaza, GP – glutathion peroksidaza, GSH – reducirani glutathion, GSSG – glutathion disulfid. Preuzeto i prilagođeno iz Xiong i sur. 2011.

Prolin je kompatibilni osmolit koji se u biljkama sintetizira kao odgovor na stres izazvan sušom, pojačanim salinitetom i temperaturnim ekstremima, pri čemu dovodi do povećanja unosa vode potrebnog za održavanje turgora (Ashraf i Foolad 2007). Osim osmotske aktivnosti, prolin može djelovati kao kemijski šaperon, kelator metala i snažno antioksidacijsko sredstvo u borbi protiv oštećenja uzrokovanih molekulama ROS (Liang i sur. 2013). Efikasan je u direktnom uklanjanju $^1\text{O}_2$, OH^\bullet i H_2O_2 te može umanjiti oštećenja uzrokovana lipidnom peroksidacijom, pri čemu stvara hidroksprolin i stabilne radikale derivata prolina (Slika 14).



Slika 14. Mehaniizmi uklanjanja ROS pomoću prolina. Preuzeto i prilagođeno iz Liang i sur. 2013.

Glavni put sinteze prolina odvija se kroz redukciju glutamata u dva koraka, uz aktivnost enzima 1-pirolin-5-karboksilat sintaze (P5CS) i 1-pirolin-5-karboksilat reduktaze (P5CR). Stresni uvjeti uzrokuju pojačanu aktivaciju enzima P5CS, što dovodi do akumulacije prolina u stanici, dok se smanjenje koncentracije prolina regulira enzimom prolin dehidrogenaza (Špoljarević i sur. 2011).

Sadržaj prolina u tkivu određuje se reakcijom s ninhidrinom pri visokoj temperaturi i niskoj pH-vrijednosti, pri čemu nastaje crveno obojani produkt koji se može spektrofotometrijski izmjeriti. Mjerenju prethodi ekstrakcija produkta u toluenu, koja se provodi radi uklanjanja crvenih pigmenata, poput antiocijanina, koji bi mogli interferirati pri mjerenju (Winter i sur. 2015, Forlani i Funck 2020).

Stanje stresa uzrokovano AgNP u biljkama je dovelo do pojačane sinteze različitih oblika antioksidansa poput antocijanina (Syu i sur. 2014, Thiruvengadam i sur. 2015), karotenoida (Mirzajani i sur. 2013, Biba i sur. 2021b, Peharec Štefanić i sur. 2021) i askorbinske kiseline (An i sur. 2008). Osim toga, važnu ulogu u otklanjanju oksidacijskog stresa uzrokovanog AgNP

ima i povećanje sadržaja GSH (Jiang i sur. 2014, Barbasz i sur. 2016), iako je zabilježeno i značajno smanjenje GSH i omjera GSH/GSSG koje je pripisano smanjenoj aktivnosti GR i pojačanom trošenju GSH uslijed njihove interakcije s ROS (Bagherzadeh Homae i Ehsanpour 2016). Iako AgNP mogu uzrokovati povećanje sadržaja prolina u tkivu ukazujući na postojanje oksidacijskog stresa (Nair i Chung 2014b, Karimi i Mohsenzadeh 2017, Girilal i sur. 2018, Shaikhaldein i sur. 2020), neka su istraživanja ukazala na to da dodatak AgNP može pomoći pri stresu uzrokovanom sušom i visokim koncentracijama soli putem regulacije sinteze prolina i drugih molekula važnih za održavanje osmotske ravnoteže (Wahid i sur. 2020, Alabdallah i sur. 2021).

2.6. Utjecaj AgNP na promjene u proteomu biljaka

Kako bi se razjasnio cjelokupan utjecaj AgNP na biljke nužna je implementacija visokoprotočnih metoda koje ispituju biološke učinke AgNP na višestrukim razinama organizacije, što objedinjuju tzv. „omics“ metode. Njihov je cilj kolektivna karakterizacija i kvantifikacija mnoštva bioloških molekula koje čine strukturu, funkciju i dinamiku organizma, a ubrzan razvoj ovih metoda posljedica je kombinacije napretka u osjetljivosti i preciznosti analitičkih tehnika i bioinformatičkih alata (Quanbeck i sur. 2012). „Omics“ metode podijeljene su prema skupini biomolekula koje proučavaju; gene proučava genomika, mRNA proučava transkriptomika, za proteine je zadužena proteomika, dok ukupne metabolite organizma istražuje metabolomika. Ovakav pristup systemske biologije koristan je za razumijevanje kompleksnih odgovora biljaka na utjecaj AgNP jer osjetljivost korištenih tehnika omogućava da se kvalitativno i kvantitativno opišu promjene na staničnim i molekularnim razinama organizama izloženih AgNP mnogo manjih koncentracija nego što to zahtijevaju druge metode, poput praćenja fenotipa ili biokemijskih testova (Majumdar i sur. 2019). Osim toga, ove metode omogućavaju lakšu usporedbu odgovora različitih biljnih vrsta, razvojnih stadija, uvjeta uzgoja i tretmana.

Proteini imaju glavne uloge u staničnoj signalizaciji i odgovoru na stres te su direktno uključeni u održavanje stanične homeostaze. Uporaba proteomike stoga može identificirati ključne proteine, posttranslacijske modifikacije i interakcije proteina koji su uključeni u odgovor biljaka na tretman različitim tipovima AgNP (Majumdar i Keller 2021).

Dva su glavna pristupa proteomskim analizama: pristup odozdo prema gore (eng. *bottom-up*) i pristup odozgo prema dolje (eng. *top-down*). Pristup *bottom-up* započinje ekstrakcijom proteina

iz stanica ili tkiva, koji se potom razdvajaju tehnikama dvodimenzionalne tekućinske kromatografije (eng. *two dimensional-liquid chromatography*, 2D-LC) ili dvodimenzionalne gel elektroforeze (eng. *two dimensional-polyacrylamide gel electrophoresis*, 2D-E) na temelju fizikalno-kemijskih svojstava. Nakon analize kromatograma i gelova, slijedi odabir proteina od interesa i njihova elucija, odnosno izrezivanje iz gelova i proteolitička digestija uporabom enzima poput tripsina (Aebersold i Mann 2003). Dobiveni peptidi se zatim razdvajaju tehnikom LC, ioniziraju te ulaze u spektrometar masa (eng. *mass spectrometer*, MS), gdje se pomoću detektora mjeri vrijednost omjera mase po naboju, m/z (Steen i Mann 2004). Odabrani se peptidi zatim izoliraju i fragmentiraju koristeći tandemске tehnike MS/MS, koje daju informaciju o sekvenci proteina i lokaciji PTM (Aebersold i Mann 2003, Yates i sur. 2009). Pristup *top-down* analizira intaktne proteine umjesto peptida, što smanjuje kompleksnost uzorka i čuva informacije vezane za status proteina, uključujući PTM i varijacije u sekvenci koje nastaju kao posljedica mutacija ili obrade proteina (Siuti i Kelleher 2007, Zhang i Ge 2011). Ipak, s obzirom na zahtjevnost separacije velikog broja proteina, pristup *top-down* obično se koristi za analize odabranog proteina ili manje količine proteina dobivene nekom od tehnika pročišćavanja (Xu i sur. 2011, Gregorich i sur. 2014).

Istraživanja proteina na biljkama posebno su zahtjevna zbog velike količine staničnih stijenki i vakuola na koje otpada najveći postotak stanične mase, što rezultira nižim sadržajem proteina. Osim toga, biljke sadrže mnoštvo fenola i sekundarnih metabolita, kao i različite proteaze i oksidacijske enzime koji mogu oštetiti proteine tijekom ekstrakcije te smanjiti rezoluciju proteinskih mrlja na gelu (Isaacson i sur. 2006, Jellouli i sur. 2010, Pavoković i sur. 2012). Zbog toga je bitno staviti poseban naglasak na sastav ekstrakcijskog pufera te pravilne kombinacije detergenta, reducensa i kaotropnih reagensa. Najčešće korištene metode ekstrakcija proteina iz biljnih tkiva uključuju korak precipitacije proteina pomoću acetona, kombinacije trikloroacetne kiseline (eng. *trichloroacetic acid*, TCA) i acetona ili kombinacije fenola i amonijevog acetata (Faurobert i sur. 2007, Pavoković i sur. 2007, Pavoković i sur. 2012), koje osim za ekstrakciju, služe i za uklanjanje tvari koje bi mogle oštetiti proteine, poboljšavajući na taj način efikasnost proteinske ekstrakcije i ukupnu reproducibilnost metode (Niu i sur. 2018). Drugi problem vezan za biljnu proteomiku je činjenica da mnoge biljne vrste, uključujući i neke modelne biljke, još uvijek nemaju u potpunosti sekvencirane genome kao ni poznate proteomske profile (Vanderschuren i sur. 2013, Cvjetko i sur. 2014). To onemogućava kvalitetne usporedbe dobivenih rezultata koje bi potencijalno vodile ka prepoznavanju istraživanih proteina i razjašnjavanju njihovih funkcija i procesa u koje su uključeni.

Proteomska istraživanja utjecaja AgNP na biljke još su uvijek malobrojna i obično su ograničena na jedan sustav, jednu vrstu i jedan tip AgNP (Tkalec i sur. 2019). Ipak, na temelju dobivenih rezultata moguće je identificirati glavne procese i proteine koji su uključeni u odgovor na tretman s AgNP. Prije svega, to su proteini uključeni u procese primarnog metabolizma. Nekolicina istraživanja je pokazala pojačanu sintezu proteina uključenih u procese fotosinteze i glikolize, što ukazuje na pojačano stvaranje energije potrebne za borbu protiv stresa uzrokovanog AgNP tretmanom (Vannini i sur. 2013, Mirzajani i sur. 2014, Vannini i sur. 2014, Peharec Štefanić i sur. 2018). Ipak, zabilježena je i smanjena ekspresija male i velike podjedinice proteina ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza (eng. *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase*, Rubisco), što pokazuje da neke AgNP mogu negativno utjecati na fotosintezu (Galazzi i sur. 2019). Proteini uključeni u biosintezu, smatanje, translokaciju i degradaciju proteina također su imali razlikovnu ekspresiju u biljkama nakon tretmana s AgNP (Vannini i sur. 2013, Mustafa i sur. 2015, Peharec Štefanić i sur. 2018), pokazujući značajnu ulogu u uklanjanju proteina koji su oštećeni uslijed stresnih uvjeta u stanicama. Zabilježena je i značajno pojačana ekspresija proteina uključenih u antioksidacijski odgovor biljaka tretiranih s AgNP, kao što su SOD, APX, CAT i GST (Vannini i sur. 2013, Mirzajani i sur. 2014, Peharec Štefanić i sur. 2018). Iako su dosadašnja istraživanja utjecaja AgNP na proteom biljaka ukazala na glavne skupine proteina podložne promjenama uslijed nametnutog stresa, nedostaju informacije o tome kako se proteini biljaka ponašaju u tretmanima sa različito stabiliziranim AgNP, s obzirom na poznate informacije o razlikama u njihovoj stabilnosti u okolišu. Osim toga, nedovoljan je broj istraživanja koji putem komparativnih proteomskih analiza pokušava razjasniti mehanizam toksičnosti AgNP.

MATERIJALI I METODE

3. MATERIJALI I METODE

U radu su korištene većinom kemikalije proizvođača Sigma-Aldrich (SAD), a uporaba kemikalija drugih proizvođača posebno je istaknuta u tekstu.

3.1. Sinteza nanočestica

AgNP-PVP sam pripremila redukcijom AgNO_3 natrijevim citratom uz prisutnost PVP-a. Otopila sam 0,02 g AgNO_3 i 0,019 g PVP u 120 mL ultra-čiste vode (Milli-Q, 18,2 M Ω -cm) te zagrijala do vrenja uz stalno miješanje. Zatim sam u uzavrelu otopinu brzo dodala alikvot od 5 mL 1% otopine $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$, te nastavila zagrijavanje na miješalici (Kartell Labware, Australija) do vidljive promjene boje iz prozirne u svijetlo žutu. Reakciju sam zaustavila naglim hlađenjem pod mlazom vode, a suspenziju AgNP-PVP sam pohranila na +4 °C do upotrebe.

Sinteza AgNP-CTAB započela je pripremom otopine koja sadrži 0,02 g AgNO_3 i 0,0043 g CTAB u 62,5 mL ultra-čiste vode. Na pripremljenu otopinu sam polako i uz stalno miješanje pomoću birete dokapavala otopinu pripremljenu otapanjem 0,01 g askorbinske kiseline u 62,5 mL ultra-čiste vode. Obje su otopine prije korištenja bile ohlađene na 0 °C. Nakon dokapavanja cijelog volumena, otopina AgNO_3 i CTAB je promijenila boju iz prozirne u narančastu, te je spremljena i čuvana u mraku na +4 °C do korištenja.

3.2. Fizikalno-kemijska karakterizacija nanočestica

3.2.1. UV-Vis spektrofotometrija

UV-Vis spektrofotometriju sam koristila kao prvi korak potvrde kvalitete AgNP. Odmah nakon sinteze, po 1 mL suspenzije AgNP-PVP ili AgNP-CTAB prebacila sam u UV kivetu te izmjerila spektar u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm pomoću uređaja Specord 50 PLUS (Analytik Jena, Njemačka), a maksimum apsorbancije uzoraka sam odredila pomoću programa WinASPECT PLUS (Analytik Jena, Njemačka).

3.2.2. Određivanje veličine i naboja

Distribuciju veličine sintetiziranih AgNP-PVP i AgNP-CTAB izmjerila sam metodom DLS na uređaju Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK), koji je opremljen zelenim laserom (532 nm), pri čemu je intenzitet raspršene svjetlosti mjeren pod kutem od 173°. Za mjerenje, alikvote suspenzija AgNP stavila sam u polistirol/polistiren kivete. Rezultati su obrađeni programom Zetasizer software 6.32 (Malvern Instruments, UK) te prikazuju vrijednost hidrodinamičkog promjera (d_H) dobivenog iz maksimuma distribucije veličine i volumena čestica, a izraženi su kao srednja vrijednost 10 mjerenja \pm standardna devijacija.

Na istom uređaju izmjerila sam i naboj AgNP-PVP i AgNP-CTAB metodom ELS uz korištenje kapilarnih ćelija. Dobivene vrijednosti ζ -potencijala prikazuju srednju vrijednost 5 mjerenja \pm standardna devijacija.

3.2.3. Mjerenje koncentracije srebra

Mjerenje koncentracije srebra u matičnim otopinama AgNP-PVP i AgNP-CTAB napravila sam primjenom tehnike AAS na uređaju SOLAAR S4 (Thermo Elemental, SAD). Alikvote matičnih otopina prije mjerenja razrijedila sam 50 \times u 5% (v/v) dušičnoj kiselini (HNO₃), a sadržaj srebra je očitao iz baždarnog pravca dobivenog mjerenjem otopina poznatih koncentracija Ag. Rezultat prikazuje srednju vrijednost tri mjerenja.

3.2.4. Transmisijaska elektronska mikroskopija

Sintetizirane AgNP-PVP i AgNP-CTAB vizualizirala sam pomoću TEM-a. Alikvote suspenzija u volumenu od 2 μ L nanijela sam na bakrenu mrežicu presvučenu folijom formar i naparenu ugljikom. Kada su se uzorci osušili, mrežicu sam prenijela na nosač te analizirala mikroskopom (TF20, FEI Tecnai G2, SAD) pri naponu od 200 kV.

3.3. Uzgoj biljnog materijala i tretmani

U istraživanju su korištene sjemenke duhana (*Nicotiana tabacum* L.) dobivene od Duhanskog instituta u Zagrebu. Prije tretmana, izvagala sam po 0,05 g sjemenki te ih prebacila u tubice. Uslijedila je sterilizacija u 1 mL 50% (v/v) otopine natrijevog hipoklorita (NaOCl) (Gram-mol, Hrvatska) u trajanju od 15 minuta na tresilici, nakon čega sam sjemenke 3 \times isprala u sterilnoj deH₂O. Nakon sterilizacije, sjemenke sam nasađivala na pripremljene krute i tekuće hranjive podloge MS (Murashige i Skoog, 1962) koje sadrže polovičnu koncentraciju makroelemenata (1/2 MS) (Tablica 1.), ovisno o tipu pokusa koji je uslijedio, kako je opisano u tekstu koji slijedi. Sve navedene korake provodila sam u komori s horizontalnim strujanjem zraka (Heraeus, Njemačka).

Tablica 1. Sastav hranjive podloge ½ MS s polovičnom koncentracijom makroelemenata, korištene za isključavanje sjemenki i uzgoj klijanaca duhana.

sastav	kruti medij / mg L ⁻¹	tekući medij / mg L ⁻¹
MAKROELEMENTI		
CaCl ₂ × 2H ₂ O	220,000	220,000
Na ₂ EDTA	18,600	18,600
MgSO ₄ × 7H ₂ O	185,000	185,000
KH ₂ PO ₄	85,000	85,000
NH ₄ NO ₃	825,000	825,000
KNO ₃	950,000	950,000
FeSO ₄	13,900	13,900
MIKROELEMENTI		
H ₃ BO ₃	6,200	6,200
MnSO ₄ × H ₂ O	22,300	22,300
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	8,600	8,600
KI	0,830	0,830
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,250	0,250
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,025	0,025
CoCl ₂ × 6H ₂ O	0,025	0,025
ORGANSKI DODACI		
Saharoza	1500,000	1500,000
2-N-morfolino-etansulfonska kiselina (MES)	500,000	500,000
Mio-inozitol	100,000	100,000
Tiamin-HCl	0,050	0,050
Phytigel	2200,000	/
pH	5,600	5,600

Otopine za tretman sjemenki i klijanaca duhana također su pripravljene u hranjivoj podlozi ½ MS s dodatkom AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, kao i njihove kombinacije s cisteinom (cys) u omjeru 1:5. Za kontrolne sjemenke i klijance korištena je čista hranjiva podloga ½ MS, a napravljene su i kontrole utjecaja samih omotača, PVP i CTAB. Koncentracije tretmana, kao i njihove kombinacije, prikazane su u Tablici 2.

Matične otopine AgNO₃ i cys koncentracije 100 mM pripravljene su otapanjem u ultra-čistoj vodi, nakon čega su sterilno filtrirane i čuvane u mraku na +4 °C do korištenja.

Tablica 2. Ispitani tretmani sjemenki i klijanaca duhana.

tretman	koncentracija / μM
kontrola	0
Ag ¹	25
	50
	100
Ag + cys	25 + 125
	50 + 250
	100 + 500
omotači ²	25

¹ Ag predstavlja AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃

² Omotači predstavljaju PVP i CTAB

3.3.1. Uzgoj i tretman klijanaca na krutoj podlozi ½ MS

Nakon pripreme i sterilizacije krute podloge ½ MS u autoklavu, podlogu sam držala u vodenoj kupelji na temperaturi od 40 °C kako bih ju održala u tekućem stanju tijekom pripreme tretmana. Neposredno prije izlivanja u plastične Petrijeve zdjelice promjera 90 mm, u podloge sam dodala matične otopine AgNP-PVP, AgNP-CTAB, AgNO₃, cys i omotača PVP i CTAB u kombinacijama i volumenima potrebnim za postizanje konačnih koncentracija prikazanih u Tablici 2. U svaku Petrijevu zdjelicu izlila sam 25 mL podloge za tretman i ostavila da se učvrsti u aseptičnim uvjetima komore. Na pripremljene podloge pomoću mikropipete nanosila sam po 50 steriliziranih sjemenki duhana, Petrijeve zdjelice sam obložila parafilmom i ostavila na hladnoj stratifikaciji (+4 °C) 48 h prije početka pokusa kako bi se pokrenulo i ujednačilo klijanje (Kucera i sur. 2005). Za vrijeme trajanja pokusa, ploče sa sjemenkama držala sam u komori za biljke, na temperaturi od 24 ± 1 °C i $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ svjetlosnog intenziteta, u uvjetima dugog dana (16 h svjetlost, 8 h mrak). Klijanje sam pratila 5 dana, počevši od trećeg dana nakon stratifikacije, a nakon tri tjedna klijanca sam sakupila za analize rasta i promjena mase. Tijekom svakog pokusa postavila sam po dvije ploče od svake koncentracije i tretmana, a svi su pokusi ponovljeni tri puta.

3.3.2. Uzgoj i tretman klijanaca na tekućoj podlozi ½ MS

Za uzgoj klijanaca u tekućoj podlozi ½ MS, 5 mL pripremljene podloge alikvotirala sam u tikvice od 100 mL te ih sterilizirala u autoklavu. Nakon hlađenja, u svaku sam tikvicu pomoću mikropipete nanijela 0,05 g sterilnih sjemenki, tikvice sam prenijela na tresilicu (Koncept

media, Hrvatska) u komoru za biljke gdje su klijale i rasle iduća tri tjedna pri već navedenim uvjetima, uz dodatak svježa 3 mL medija 9. dan nakon postavljanja pokusa. Nakon tri tjedna, pomoću mikropipete sam izvukla višak podloge iz pojedine tikvice, te klijancima dodala po 10 mL otopina za tretman pripremljenih dodatkom matičnih otopina AgNP-PVP, AgNP-CTAB, AgNO₃, njihovih kombinacija s cys te omotačima PVP i CTAB, u podloge ½ MS na način kako je opisano u Tablici 2. Tretman klijanaca trajao je 7 dana, nakon čega sam tkivo detaljno isprala ultra-čistom vodom kako bi se uklonio višak podloge i AgNP, te sam ga odmah koristila za pokuse ili spremila na -80 °C do uporabe. Tkivo dobiveno na ovaj način koristila sam za analize parametara oksidacijskog stresa te proteomske analize. Za svaki pokus postavila sam po 6 tikvica od svake koncentracije i tretmana, a svaki je pokus ponovljen dva puta.

3.4. Mjerenje stabilnosti AgNP-PVP i AgNP-CTAB u podlozi ½ MS za tretman duhana

3.4.1. Spektrofotometrijsko mjerenje stabilnosti

UV-Vis spektrofotometrijom pratila sam stabilnost 25, 50 i 100 µM AgNP-PVP i AgNP-CTAB, samih i u kombinaciji s 125, 250 i 500 µM cys, u krutim i tekućim podlogama ½ MS na način kako je opisano u poglavlju 3.2.1.

Za mjerenje stabilnosti u krutoj podlozi ½ MS, alikvot od 1 mL podloge s Phytigelom uz dodatak AgNP-PVP, AgNP-CTAB i njihove kombinacije s cys, pripremljene za pokus isključivanja sjemenki duhana (poglavljje 3.4.1), ulila sam u UV-kivetu koju sam potom prekrila parafilmom kako bih spriječila isušivanje tijekom mjerenja. Za vrijeme trajanja pokusa, kivete sam držala u komori za biljke u istim uvjetima u kojima se odvijao i tretman klijanaca. Nakon učvršćivanja podloge, mjerila sam spektar u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm, u definiranim vremenskim razmacima u periodu od 5 dana (koliko je trajao tretman klijanaca), pri čemu sam kao slijepu probu koristila krutu podlogu ½ MS bez dodatka AgNP ili cys.

Spektrofotometrijsko praćenje stabilnosti nanočestica u tekućoj podlozi ½ MS napravila sam na sličan način. U tikvicama od 100 mL pripremila sam tekuće podloge ½ MS s dodatkom AgNP-CTAB, AgNP-PVP i njihove kombinacije s cys, kako je opisano u poglavlju 3.4.2., te sam ih za vrijeme trajanja analize stabilnosti držala na tresilici u komori, u istim uvjetima u kojima se odvijao tretman klijanaca. Pokus sam provodila 7 dana u definiranim vremenskim razmacima, a za mjerenje spektra u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm alikvotirala sam po 1 mL podloge i prebacila ga u UV-kivetu u trenutku mjerenja. Kao slijepu probu pri mjerenju sam koristila tekuću podlogu ½ MS bez dodatka AgNP ili cys.

3.4.2. Promjena veličine i naboja

Promjenu veličine i naboja AgNP-PVP i AgNP-CTAB pratila sam samo u tekućoj podlozi ½ MS jer tehnika nije omogućena za krute sustave, te samo na tretmanima s najvećim koncentracijama AgNP-PVP i AgNP-CTAB, kao i njihove kombinacije s cys, koje su na spektrofotometrijskim mjerenjima pokazale najznačajnije promjene. Mjerenje je napravljeno prema metodi opisanoj u poglavlju 3.2.2., a promjene sam pratila u periodu od 4 sata.

3.5. Mjerenje dinamike klijanja sjemenki

Dinamiku klijanja sjemenki pratila sam u periodu od pet dana, svaki dan u isto vrijeme bilježeći broj novo prokljalih sjemenki. Smatrala sam da je sjemenka prokljala u trenutku probijanja radikule.

Na kraju provedenog pokusa izračunala sam postotak klijanja prema sljedećoj formuli:

$$\text{Postotak klijanja (\%)} = \frac{\text{ukupan broj prokljalih sjemenki}}{\text{ukupan broj sjemenki}} \times 100$$

Dnevna mjerenja prokljalih sjemenki upotrijebila sam za računanje indeksa iskljavanja (eng. *germination indeks*, GI) koji opisuje dinamiku iskljavanja (Farooq i sur. 2005):

$$GI = \sum \frac{Nt \text{ (broj sjemenki prokljalih na dan t)}}{Dt \text{ (dan brojanja)}}$$

te brzinu klijanja u obliku vrijednosti T_{50} koja prikazuje dan na koji je iskljalo 50% sjemenki, a to sam računala prema formuli od Farooq i sur. (2005):

$$T_{50} = t_i + \frac{\left(\frac{N}{2} - n_i\right) \times (t_i - t_j)}{n_i - n_j}$$

pri čemu N označava ukupan broj prokljalih sjemenki, n_i i n_j predstavljaju brojeve sjemenki prokljalih u mjerenim vremenskim intervalima t_i i t_j , uzimajući u obzir da je $n_i < N/2 < n_j$. Analizirala sam klijavost 100 sjemenki po tretmanu u tri nezavisna pokusa. Svi su rezultati prikazani kao postotak u odnosu na kontrolu, a iskazuju srednju vrijednost od ukupno 300 sjemenki \pm standardna pogreška.

3.6. Rani rast klijanaca

Razlike u ranom rastu klijanaca pratila sam mjerenjem duljine korjenčića i praćenjem razlika u svježoj i suhoj masi klijanaca starih tri tjedna. Duljinu korjenčića mjerila sam pomoću ravnala na 20 slučajno odabranih klijanaca neposredno nakon uklanjanja s ploče. Dobivene sam rezultate prikazala kao postotak smanjenja korjenčića (eng. *root length reduction percentage*, RLRP) koristeći formulu (Zafar i sur. 2015):

$$\text{RLRP \%} = 1 - \frac{\text{duljina korjenčića (stres)}}{\text{duljina korjenčića (kontrola)}} \times 100$$

a prikazuju srednju vrijednost ukupno 60 klijanaca \pm standardna pogreška, dobivenih u tri nezavisna pokusa.

Zbog male mase klijanaca, za mjerenje svježe i suhe mase spojila sam po 10 slučajno odabranih klijanaca koji su činili jednu repliku. Pomoću analitičke vage izmjerila sam im svježu masu neposredno nakon sakupljanja, te suhu masu nakon 24 h sušenja na 60 °C. Rezultate mjerenja svježe mase izrazila sam kao postotak smanjenja mase (eng. *fresh weight reduction percentage*, FWPR) prema formuli (Zafar i sur. 2015):

$$\text{FWPR \%} = 1 - \frac{\text{svježa masa (stres)}}{\text{svježa masa (kontrola)}} \times 100$$

a odnos izvagane svježe i suhe mase kao sadržaj suhe tvari (eng. *dry matter content*, DMC) iz formule:

$$\text{DMC \%} = \frac{\text{suha masa}}{\text{svježa masa} + \text{suha masa}} \times 100$$

Rezultati prikazuju srednju vrijednost 9 replika \pm standardna pogreška, dobivenih iz tri nezavisna pokusa.

3.7. Ekstrakcija proteina u kalij-fosfatnom puferu

Za ekstrakciju ukupnih topivih proteina koristila sam 60 mg liofiliziranog tkiva klijanaca duhana koje sam prvo usitnila u tarioniku s tučkom uz dodatak 10 mg PVP. Na dobiveni prah potom sam dodala 1,5 mL ohlađenog 0,1 M kalij-fosfatnog pufera, pH 7, tkivo dodatno homogenizirala te dobiveni ekstrakt prebacila u tubicu. Ekstrakte sam zatim centrifugirala (Eppendorf, Njemačka) 15 minuta na 20000 g pri +4 °C. Dobivene supernatante sam prebacila u čiste tubice te ponovo centrifugirala pri istim uvjetima 45 minuta. Nakon

centrifugiranja, supernatante sam prebacila u čiste tubice i kao proteinske ekstrakte čuvala na -20 °C do korištenja.

Ovako dobivenim ekstraktima odredila sam koncentraciju proteina metodom po Bradfordu (1976) koja se temelji na vezanju boje *Coomasie Brilliant Blue* (CBB) na proteine. Metodu sam započela pripremom matične [350 mg CBB G-250, 30 mL 96% etanola (C₂H₅OH), 200 mL 88% fosforne kiseline (H₃PO₄)] i radne Bradford otopine (30 mL matične Bradford otopine, 15 mL 96% C₂H₅OH, 30 mL H₃PO₄, 425 mL reH₂O). Za mjerenje, u tubici sam pomiješala 980 µL radne Bradford otopine i 20 µL proteinskog ekstrakta, smjesu promiješala na vorteksu te ostavila na inkubaciji 5 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi. Intenzitet plavog obojenja koje nastaje pri reakciji spektrofotometrijski sam izmjerila pri valnoj duljini od 595 nm. Vrijednosti koncentracije proteina u uzorcima dobila sam očitanjem iz baždarne krivulje napravljene s poznatim koncentracijama (0,2-2,0 mg mL⁻¹) uzoraka goveđeg serumskog albumina (eng. *bovine serum albumine*, BSA) pripremljenih u 0,1 M kalij-fosfatnom puferu, pH 7.

3.8. Mjerenje sadržaja ROS

3.8.1. DHE test

Ukupni sadržaj ROS u ekstraktima klijanaca duhana (poglavlje 3.7.) odredila sam korištenjem fluorescentne probe DHE koja služi primarno za detekciju superoksidnog radikala pomoću kojeg se oksidira, pri čemu nastaje fluorescentni etidij. Metodu sam započela miješanjem 50 µL ekstrakta i 50 µL 20 µM DHE u mikrotitarskoj pločici, nakon čega sam izmjerila dobivenu fluorescenciju na čitaču mikrotitarskih pločica (Tecan, SAD) s ekscitacijom podešenom na 520 nm i emisijom na 600 nm. Mjerenje je napravljeno neposredno nakon dodatka boje uzorcima, bez dodatne inkubacije. Rezultati su izraženi kao postotak od kontrole, a prikazuju srednju vrijednost 12 replika ± standardna pogreška, dobivenih u dva nezavisna pokusa.

3.8.2. Sadržaj H₂O₂

Sadržaj H₂O₂ odredila sam metodom prema Alexieva i sur. (2001). Za pripremu ekstrakta koristila sam 150 mg svježeg tkiva klijanaca duhana koje sam usitnila u tarioniku s tučkom uz dodatak PVP-a i tekućeg dušika do stvaranja sitnog praha, nakon čega sam dodala 2 mL 0,1% (w/v) TCA. Ekstrakte sam prebacila u tubice i centrifugirala 10 minuta na 20000 g

i 0 °C. Dobivene supernatante sam prebacila u čiste tubice na ledu i sačuvala za daljnja mjerenja.

Za mjerenje uzoraka, u tubici od 2 mL pomiješala sam 0,5 mL dobivenog supernatanta sa 0,5 mL 10 mM kalij-fosfatnog pufera, pH 7,0 i 1 mL 1 M kalijeva jodida (KI). Sadržaj tubice sam promiješala na vorteksu i prebacila u UV-kivetu te mjerila u UV-Vis spektrofotometru pri valnoj duljini od 390 nm, pri čemu je 0,1% TCA pripremljena na isti način kao i uzorci poslužila kao slijepa proba. Sadržaj H₂O₂ sam izračunala pomoću baždarne krivulje pripremljene s H₂O₂ poznatih koncentracija, vrijednosti između 1,378 i 352,8 µM. Rezultate sam izrazila kao µmol g⁻¹ svježe mase, a prikazuju srednju vrijednost 12 replika ± standardna pogreška dobivenih u dva nezavisna pokusa.

3.9. Oksidacijsko oštećenje biomolekula

3.9.1. Mjerenje sadržaja MDA

Razinu lipidne peroksidacije pratila sam mjerenjem koncentracije MDA prema metodi koju su opisali Heath i Packer (1968). Započela sam sa ekstrakcijom 60 mg liofiliziranog tkiva klijanaca u ohlađenom tarioniku s tučkom uz dodatak 1,5 mL ekstrakcijskog pufera sastavljenog od 0,3% (w/v) TBA otopljene u 10% (w/v) TCA. Homogenat sam potom prebacila u tubice i grijala 30 minuta na 95 °C na termobloku (Eppendorf, Njemačka), nakon čega sam reakciju zaustavila naglim hlađenjem smjese u posudi s ledom. Uzorke sam centrifugirala 15 minuta pri 20000 g i +4 °C, supernatante prebacila u čiste tubice, a taloge bacila. Sadržaj MDA mjerila sam spektrofotometrijski praćenjem apsorbancije uzoraka pri valnim duljinama od 532 i 600 nm, pri čemu razlika ove dvije vrijednosti predstavlja korekciju za nespecifično zamućenje. Kao slijepu probu koristila sam čisti ekstrakcijski pufer.

Sadržaj MDA u uzorku izračunala sam koristeći formulu:

$$\text{Sadržaj MDA} = \frac{A_{532} - A_{600}}{m \times \varepsilon \times l} [\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ suhe tvari}]$$

pri čemu je:

A₅₃₂ – apsorbancija izmjerena na 532 nm

A₆₀₀ – apsorbancija izmjerena na 600 nm

m – masa tkiva (mg)

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

l – duljina puta (1 cm)

Rezultate sam izrazila kao $\mu\text{mol mg}^{-1}$ suhe tvari, a prikazuju srednju vrijednost 12 replika \pm standardna pogreška dobivenih u dva nezavisna pokusa.

3.9.2. Mjerenje sadržaja proteinskih karbonila

Oštećenje proteina detektirala sam mjerenjem proteinskih karbonila prema metodi od Levine i sur. (1994). U tubicu sam dodala 200 μL proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.7) i 300 μL 10 mM DNPH pripremljenog u 2 M HCl, uzorke sam promiješala koristeći vorteks te ih ostavila da se inkubiraju 1 h u mraku pri sobnoj temperaturi uz povremeno potresanje. Nakon inkubacije, uzorcima sam dodala 500 μL 10% (w/v) TCA za precipitaciju proteina, inkubirala ih 5 minuta na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ te potom centrifugirala 10 minuta na 20000 g i $+4 \text{ }^\circ\text{C}$. Supernatant sam odlila, a dobiveni talog ispirala 3 \times u 500 μL smjese etanol/etilacetat pripremljene u omjeru 1:1 radi uklanjanja nevezanog reagensa. Na taloge sam zatim dodala 1 mL 6 M uree otopljene u 20 mM kalij-fosfatnom puferu, pH 2,4, te ih otopila uz pomoć vorteksa.

Dobivene uzorke sam mjerila spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 370 nm, pri čemu je kao slijepa proba korišten uzorak pripremljen na isti način kako je opisano, ali bez dodatka DNPH. Sadržaj proteinskih karbonila sam potom izračunala prema sljedećoj formuli:

$$\text{Sadržaj karbonila} = \frac{A_{370}}{c \times \epsilon \times l} [\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteina}]$$

pri čemu je:

A_{370} – apsorbancija uzorka izmjerena na 370 nm

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

c – sadržaj proteina (mg mL^{-1})

l – duljina optičkog puta (1 cm)

Rezultate sam izrazila kao $\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteina, a prikazuju srednju vrijednost 12 replika \pm standardna pogreška dobivenih u dva nezavisna pokusa.

3.9.3. Comet test

Za određivanje razine oštećenja molekule DNA koristila sam Comet test (Gichner i sur. 2004), a postupak je izveden na svježim klijancima neposredno nakon tretmana. Mehaničku

izolaciju jezgara napravila sam radeći rezove žiletom po tkivu uronjenom u 250 μL 0,4 M Tris-HCl, pH 7,5 na ledu. Dobivenu suspenziju jezgara sam pomiješala s jednakim volumenom 1% (w/v) otopine agaroze niskog tališta (eng. *low melting point*, LMP) pripremljene otapanjem u puferiranoj otopini fosfatnih soli (eng. *phosphate buffer saline*, PBS; 10 mM Na_2HPO_4 , 1,7 mM KH_2PO_4 , 2,7 mM KCl, 130 mM NaCl) na 42 °C. Smjesu sam prebacila na stakalca na koja sam prethodno nanijela sloj 1% (w/v) agaroze normalnog tališta (eng. *normal melting point*, NMP) pripremljene zagrijavanjem u deH_2O koristeći mikrovalnu pećnicu. Smjesu sam prekrila pokrovnim stakalcem i ostavila na +4 °C da očvrсне.

Nakon pripreme stakalaca uslijedila je horizontalna elektroforeza. Predmetna stakalca sa smjesom jezgara premjestila sam u kadicu za elektroforezu u kojoj se nalazila ohlađena 300 mM otopina NaOH, pritom im uklanjajući pokrovna stakalca. Uzorke sam ostavila u kadici u mraku 10 minuta kako bi se denaturirali, nakon čega sam pokrenula elektroforezu koja se odvijala 20 minuta na 26 V i 300 mA. Nakon elektroforeze, stakalca sam 3× isprala sa po 1 mL 0,4 M Tris-HCl, nakon čega sam ih ostavila da se u potpunosti osuše na zraku.

Uzorke sam vizualizirala uporabom fluorescentne boje *GelStarTM Nucleic Acid Gel Stain* (Lonza, SAD) koja se veže na molekulu DNA. Stakalca sam 5 minuta inkubirala u 70 μL boje koju sam prethodno razrijedila 10000×, nakon čega sam ih analizirala uporabom fluorescencijskog mikroskopa s ekscitacijskim filterom BP 520/09 nm i graničnim filterom od 610 nm. Oštećenje molekule DNA mjerila sam kao postotak DNA u repu (eng. *tail DNA*, % tDNA) tretmana u odnosu na kontrolu na ukupno 150 slučajno odabranih jezgara po stakalcu, koristeći računalni program Komet ver. 5 (Kinetic Imaging, Velika Britanija). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ukupno 150 jezgara \pm standardna pogreška.

3.10. Spektrofotometrijsko mjerenje aktivnosti antioksidacijskih enzima

3.10.1. Aktivnost SOD

Aktivnost SOD mjerila sam metodom prema Beauchamp i Fridovich (1971). Započela sam pripremom reakcijske smjese [13 mM metionin, 75 μM NBT (Alfa Aesar, SAD), 0,1 M etilendiamintetraoctena kiselina (eng. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA) i 2 mM riboflavin u 50 mM kalij-fosfatnom puferu, pH 7,8], koju sam koristila za mjerenje maksimuma apsorbancije nastale uslijed reakcije stvaranja formazana, pri valnoj duljini od 560 nm nakon 8-minutne inkubacije u kiveti izloženoj svjetlosti transiluminatora (15 W). S obzirom da se jedinica (eng. *unit*, U) SOD definira putem količine enzima potrebnog za 50%-tnu inhibiciju

brzine redukcije NBT, za mjerenje aktivnosti SOD u proteinskim ekstraktima (poglavlje 3.7.) u reakcijsku smjesu sam dodala volumen ekstrakta koji uzrokuje 50%-tno smanjenje apsorbancije u jednakim uvjetima mjerenja. Aktivnost SOD sam potom izračunala korištenjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem SOD standarda ($0,025 - 1 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) na opisani način, te ih izrazila u obliku U mg^{-1} proteina. Rezultati prikazuju srednju vrijednost 12 replika \pm standardna pogreška dobivenih u dva nezavisna pokusa.

3.10.2. Aktivnost CAT

Za spektrofotometrijsko mjerenje aktivnosti CAT koristila sam metodu prema Aebi (1984). Metoda se temeljni na mjerenju brzine katalitičke razgradnje H_2O_2 dodanog u uzorak koje se prati putem smanjenja apsorbancije uzorka u UV spektru. Za mjerenje sam pomiješala $970 \mu\text{L}$ reakcijske smjese ($10 \text{ mM H}_2\text{O}_2$, 50 mM kalij-fosfatni pufer, $\text{pH } 7,0$) i $30 \mu\text{L}$ proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.7.) te sam mjerila promjenu apsorbancije pri valnoj duljini od 240 nm u UV-kiveti, svakih 10 sekundi u tijeku jedne minute.

Aktivnost CAT u uzorcima sam izračunala prema sljedećoj formuli:

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A \times 6 \times V_{rs} \times \text{F.R.}}{V_{uz} \times \varepsilon \times l \times c} \quad [\mu\text{mol}_{\text{H}_2\text{O}_2} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}]$$

pri čemu je:

ΔA – srednja vrijednost promjena apsorbancije pri 240 nm tijekom 10 sekundi

6 – faktor korekcije za ΔA za izražavanje rezultata u minuti

V_{rs} – volumen reakcijske smjese (1 mL)

F.R. – faktor razrjeđenja uzorka (1)

V_{uz} – volumen uzorka ($0,03 \text{ mL}$)

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

l – duljina optičkog puta (1 cm)

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

Rezultati su izraženi kao μmol utrošenog H_2O_2 po mg proteina u minuti i prikazuju srednju vrijednost 12 replika \pm standardna pogreška dobivenih u dva nezavisna pokusa.

3.10.3. Aktivnost APX

Aktivnost APX mjerila sam spektrofotometrijski, prateći pad apsorbancije uzorka koji nastaje uslijed reakcije H₂O₂ i askorbata, pri čemu nastaje produkt MDHAR (Nakano i Asada 1981). Za mjerenje, u UV kiveti pomiješala sam 180 µL proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.7.) sa 800 µL reakcijske smjese (50 mM kalij-fosfatni pufer, pH 7,0 i 10 mM EDTA), 10 µL 0,1 mM askorbinske kiseline i 10 µL 12 mM H₂O₂. Pad apsorbancije sam mjerila pri valnoj duljini od 290 nm, svakih 15 sekundi unutar jedne minute.

Aktivnost APX u uzorcima sam izrazila pomoću formule:

$$APX = \frac{\Delta A \times 4 \times V_{rs} \times F.R.}{V_{uz} \times \epsilon \times l \times c} [\mu\text{mol}_{MDHAR} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}]$$

Pri čemu je:

ΔA – srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 290 nm tijekom 15 sekundi

4 – faktor korekcije za ΔA za izražavanje rezultata u minuti

V_{rs} – 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)

c – koncentracija proteina (mg mL⁻¹)

Rezultati su izraženi kao µmol nastalog produkta, MDHAR, po mg proteina u minuti i prikazuju srednju vrijednost 12 replika ± standardna pogreška dobivenih u dva nezavisna pokusa.

3.10.4. Aktivnost PPX

Aktivnost PPX u uzorcima sam spektrofotometrijski odredila prateći porast apsorbancije koji nastaje uslijed oksidacije pirogalola nakon dodatka H₂O₂ (Nakano i Asada 1981). Za mjerenje, u kiveti sam pomiješala 980 µL reakcijske smjese (50 mM kalij-fosfatni pufer, pH 7,0, 20 mM pirogalol i 1 mM H₂O₂) i 20 µL proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.7.) te pratila promjene u apsorbanciji pri valnoj duljini od 430 nm svakih 15 sekundi u periodu od dvije minute.

Aktivnost PPX u uzorcima sam izrazila pomoću formule:

$$\text{PPX} = \frac{\Delta A \times 4 \times \text{Vrs} \times \text{F.R.}}{\text{Vuz} \times \varepsilon \times l \times c} \quad [\mu\text{mol}_{\text{purpurogalin}} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}]$$

Pri čemu je:

ΔA – srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 430 nm tijekom 15 sekundi

4 – faktor korekcije za ΔA za izražavanje rezultata u minuti

Vrs – volumen reakcijske smjese (1 mL)

F.R. – faktor razrjeđenja uzorka (1)

Vuz – volumen uzorka (0,02 mL)

ε – molarni apsorpcijski koeficijent (2,47 mM⁻¹ cm⁻¹)

l – duljina optičkog puta (1 cm)

c – koncentracija proteina (mg mL⁻¹)

Rezultati su izraženi kao μmol nastalog produkta purpurogalina po mg proteina u minuti i prikazuju srednju vrijednost 12 replika \pm standardna pogreška dobivenih u dva nezavisna pokusa.

3.11. Spektrofotometrijsko mjerenje neenzimskih antioksidansa

3.11.1. Mjerenje sadržaja GSH

Mjerenje sadržaja GSH napravila sam prema modificiranoj metodi od Salbitani i sur. (2017). Započela sam ekstrakcijom 150 mg svježeg tkiva klijanaca duhana u 1,5 mL 3% (w/v) salicilne kiseline (eng. *salicylic acid*, SA) uz dodatak 10 mg PVP-a. Ekstrakte sam centrifugirala 15 minuta pri 10000 g i +4 °C, nakon čega sam dobivene supernatante prebacila u čiste tubice i držala na ledu do mjerenja.

Za mjerenje reduciranog GSH u kiveti sam pomiješala 100 μL supernatanta sa 750 μL reakcijske smjese (1,5 mg mL⁻¹ DTNB, 0,1 M kalij-fosfatni pufer, pH 7,0 i 1 mM EDTA), ostavila da se inkubira na sobnoj temperaturi 20 minuta te potom izmjerila apsorbanciju pri 412 nm. Koncentraciju GSH očitala sam preko baždarne krivulje dobivene mjerenjem otopina GSH standarda poznatih koncentracija (0,785 – 25 μM). Sadržaj ukupnog glutationa (GSH i GSSG) u uzorcima dobila sam postupkom enzimske reciklaže. Izmjerenim uzorcima sam

dodala 15 μL GR (1 U) i 50 μL NADPH (0,32 mg mL^{-1}), smjesu sam pomiješala na vorteksu i inkubirala 5 minuta na sobnoj temperaturi. Porast apsorbancije nastao uslijed redukcije GSSG izmjerila sam pri valnoj duljini od 412 nm, a sadržaj ukupnog GSH sam izračunala uz pomoć baždarne krivulje na način kako je ranije opisano. Iz ukupnog sadržaja GSH u tkivu izračunala sam sadržaj GSSG pomoću formule:

$$[\text{GSH}] \text{ ukupni} = [\text{GSH}] + 2 \times [\text{GSSG}]$$

Rezultate sam izrazila kao omjer GSH/GSSG, izražene u $\mu\text{mol g}^{-1}$ svježe tvari, a prikazuju srednju vrijednost 12 replika \pm standardna pogreška dobivenih u dva nezavisna pokusa.

3.11.2. Mjerenje sadržaja prolina

Sadržaj prolina u ekstraktima pripremljenima kako je opisano u prethodnom poglavlju (3.10.1.), odredila sam metodom prema Bates i sur. (1973). Započela sam pripremom otopine kiselog ninhidrina za koju sam otopila 1,25 g ninhidrina u 30 mL ledene octene kiseline uz dodatak 20 mL 6 M H_3PO_4 . Ninhidrin sam otapala uz zagrijavanje na miješalici do promjene boje iz plave u žutu. 500 μL dobivenog kiselog ninhidrina sam pomiješala s 500 μL ekstrakta i 500 μL ledene octene kiseline, te sam smjesu nakon miješanja inkubirala na termobloku 60 minuta pri 95 °C. Reakciju sam zaustavila naglim hlađenjem u ledenoj kupelji, nakon čega je uslijedila ekstrakcija kromoforne skupine u 1,2 mL toluena te mjerenje apsorbancije dobivenog ekstrakta u kvarcnoj kivetu pri valnoj duljini od 520 nm. Sadržaj prolina sam potom izračunala uz pomoć baždarne krivulje dobivene mjerenjem otopina poznatih koncentracija prolina (0,5 - 200 μM). Rezultate sam izrazila kao $\mu\text{mol g}^{-1}$ svježe tvari, a prikazuju srednju vrijednost 12 replika \pm standardna pogreška dobivenih u dva nezavisna pokusa.

3.12. Statistička analiza podataka

Statističku analizu podataka napravila sam u programu *Statistica 12.0* (Stat Soft Inc., SAD). Podatke sam analizirala uporabom dvosmjerne analize varijance (eng. *analysis of variance*, ANOVA) za određivanje utjecaja koncentracije i tretmana (AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO_3), odnosno jednosmjerne ANOVA za utvrđivanje utjecaja dodatka cisteina i samih omotača. Razliku dobivenih srednjih vrijednosti sam smatrala statistički značajnom pri $p \leq 0.05$ nakon provedenog post-hoc Duncan testa.

3.13. Razdvajanje proteina nativnom poliakrilamidnom gel elektroforezom

Uporaba nativne gel elektroforeze predstavlja odlično sredstvo za detekciju proteina i proteinskih kompleksa u njihovoj nativnoj formi jer izostanak primjene detergetna omogućava održavanje interakcija među proteinskim podjedinicama, što daje informacije o njihovoj kvarternoj strukturi i omogućava analizu biološke aktivnosti (Sirpiö i sur. 2011). Metoda se posebno ističe radi mogućnosti vizualizacije enzimske aktivnosti već pri mikrogramskim količinama proteina (Covian i sur. 2012). Proteini se na gelu razdvajaju na temelju razlika u elektroforetskoj pokretljivosti, koja je definirana njihovom molekulskom masom i gustoćom naboja (Balen i sur. 2011).

Za ovu metodu koristila sam sustav *PROTEAN® II xi cell* (Bio-Rad, SAD), a elektroforezu sam provodila prema protokolu od Balen i sur. (2011). Započela sam pripremom 12% gela sa razdvajanje (Tablica 3.), kojega sam izlila između unaprijed pripremljenih staklenih ploča. Gel sam nadsvodila otopinom 20% (v/v) C₂H₅OH i boje bromfenol plava (eng. *bromphenol blue*, BFB), kako bih spriječila kontakt otopine gela sa zrakom tijekom polimerizacije. Kada je polimerizacija završila, gel sam isprala s reH₂O te na njega izlila pripremljeni 4% gel za sabijanje (Tablica 3.), dodala češljice i ostavila da se polimerizira.

Staklene ploče s gelovima postavila sam na elektrodni nosač te ih prenijela u kadicu za vertikalnu elektroforezu ispunjenu elektrodnim puferom za nativnu elektroforezu (0,25 M Tris, 1,92 M glicin, pH 8,3) kojega sam prethodno razrijedila 10×. Na gelove sam nanosila volumen proteinskih ekstrakata (poglavlje 3.7.) u kojem je bilo sadržano 90 µg proteina. Prije nanošenja uzoraka u jažice, dodala sam im 20 µL 0,5% (w/v) otopine saharoze i boje BFB, pri čemu saharoza povećanjem gustoće omogućava sjedanje uzoraka u jažice, a BFB stvara frontu koja omogućava praćenje tijeka elektroforeze. Elektroforezu sam provodila na +4 °C, prvih 45 minuta pri 100 V, te do kraja na 220 V. Nakon provedene elektroforeze uslijedio je tretman gelova specifičnim supstratima za vizualizaciju izoformi pojedinih enzima.

Tablica 3. Sastav otopina za pripremu gelova za Native-PAGE.

	12% gel za razdvajanje	4% gel za sabijanje
reH ₂ O	21 mL	9,15 mL
Tris/HCl	15 mL (1,5 M; pH 8,8)	3,75 mL (0,5 M; pH 6,8)
30% akrilamid/bisakrilamid (AA/Bis)	24 mL	1,95 mL
vakuum		
10% amonijev peroksodisulfat (APS)	300 µL	100 µL
tetrametiletildiamin (TEMED)	25 µL	15 µL

3.13.1. Određivanje aktivnosti izoforma SOD

Aktivnost izoformi SOD odredila sam koristeći metodu prema Beauchamp i Fridovich (1971). Nakon provedene elektroforeze, gel sam 25 minuta inkubirala u 50 mM kalij-fosfatnom puferu, pH 7,8, koji je sadržavao 2,45 mM NBT. Uslijedila je inkubacija u mraku u istom puferu uz dodatak 28 mM TEMED-a i 0,028 mM riboflavina, a nakon 15 minuta gel sam izložila svjetlosti transilumitora (15 W) radi pokretanja fotokemijske reakcije. Gel se nalazio u transiluminatoru do pojave akromatskih proteinskih vrpca na ljubičastoj podlozi, nakon čega sam ga isprala u deH₂O i skenirala za provedbu daljnje analize.

3.13.2. Određivanje aktivnosti izoforma CAT

Detekciju izoformi CAT provela sam prema protokolu od Woodbory i sur. (1971). Gelove sam nakon elektroforeze isprala 3× po 15 minuta u deH₂O, nakon čega je uslijedila 10-minutna inkubacija u otopini 0,0003% (v/v) H₂O₂. Gel sam potom kratko isprala u deH₂O i tretirala otopinom koja je sadržavala 2% (w/v) FeCl₃ (Carlo Erba, Francuska) i 2% (w/v) K₃Fe(CN)₆ (Alfa Aesar, SAD) dok gel nije poprimio zelenu boju uz pojavu žutih proteinskih vrpca. Gel sam potom isprala u deH₂O i skenirala za daljnju analizu.

3.13.3. Određivanje aktivnosti izoforma APX

Za detekciju APX, elektroforezu sam provela u elektrodnom puferu uz dodatak 2 mM askorbata, kako je opisano u Mittler i Zilinskas (1993). Gel sam nakon elektroforeze ispirala 3× po 10 minuta u 50 mM kalij-fosfatnom puferu, pH 7,0, uz dodatak 2 mM askorbata, te potom 20 minuta inkubirala u istom puferu uz dodatak 4 mM askorbata i 2 mM H₂O₂. Nakon kratkog ispiranja u samom puferu, gel sam tretirala otopinom koja je sadržavala 2,45 mM NBT i 28 mM TEMED-a u 50 mM kalij-fosfatnom puferu, pH 7,8, do pojave akromatskih vrpca na ljubičastoj podlozi. Gel sam isprala u deH₂O i skenirala.

3.13.4. Određivanje aktivnosti izoforma PPX

Izoforme PPX detektirala sam metodom prema Maehly i Chance (1954). Nakon elektroforeze, gel sam 30 minuta ispirala u 50 mM kalij-fosfatnom puferu, pH 7,0, te potom inkubirala u istom puferu uz dodatak 20 mM pirogalola i 4 mM H₂O₂ do pojave smeđih proteinskih vrpca. Gel sam skenirala odmah nakon pojave vrpca, bez ispiranja, jer se stajanjem njihov intenzitet naglo smanjuje.

3.14. Ekstrakcija proteina fenolom

Za analizu ekspresije proteina koristila sam samo tretmane s najvećim koncentracijama AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, te njihove kombinacije s cys. Uzorke sam pripremila modificiranom fenolnom ekstrakcijom (Pavoković i sur. 2012, Peharec Štefanić i sur. 2018). 150 mg liofiliziranog tkiva klijanaca duhana homogenizirala sam u prethodno ohlađenom tarioniku s tučkom uz dodatak 10 mg PVP-a i 6 mL ekstrakcijskog pufera [500 mM Tris, 50 mM EDTA, 700 mM saharoze, 100 mM KCl, 1 mM fenilmetilsulfonyl fluorid (eng. *phenylmethylsulfonyl fluoride*, PMSF) i 2% (v/v) β-merkaptoetanol]. Ekstrakte sam prebacila u tubu od 15 mL, promiješala na vorteksu te 10 minuta inkubirala na tresilici u ledu. Potom sam u svaku tubu dodala 6 mL fenola, promiješala na vorteksu i inkubirala na sobnoj temperaturi 10 minuta na tresilici. Uzorke sam centrifugirala 15 minuta pri 4500 g i +4 °C, nakon čega sam supernatant prebacila u čistu tubu, dodala mu novih 6 mL ekstrakcijskog pufera, promiješala sadržaj na vorteksu i inkubirala 3 minute na tresilici pri sobnoj temperaturi. Uslijedilo je centrifugiranje uzoraka pri već navedenim uvjetima, nakon čega sam supernatante prebacila u tube od 50 mL, dodala im 4× veći volumen hladne precipitacijske otopine (0,1 M amonijev acetat u metanolu), promiješala sadržaj laganim okretanjem tube i ostavila preko noći na -20 °C. Sljedeći dan, uzorke sam centrifugirala 20 minuta pri 4500 g i +4 °C, a dobivene taloge sam potom 3× ispirala u 3 mL ledene precipitacijske otopine te 1× u 3 mL ledenog acetona, pri čemu je između svakog koraka ispiranja uslijedila centrifugiranje u trajanju od 10 minuta pri već navedenim uvjetima. Nakon uklanjanja acetona, taloge sam ostavila 1 minutu horizontalno polegnute u digestoru da se osuše pomoću strujanja zraka, te sam ih resuspendirala u 500 μL pufera za izoelektrično fokusiranje (IEF) sastavljenog od 9 M uree i 4% (w/v) 3-[(3-kolamidpropinil) dimetilamonijev]-1-propansulfata (CHAPS) uz dodatak 2 mg mL⁻¹ ditiotreitola (DTT) i 5,2 μL mL⁻¹ amfolita. Otopljene taloge sam prebacila u tubice od 1,5 mL i 5 minuta centrifugirala pri 20000 g i +4 °C, nakon čega sam supernatante prebacila u čiste tubice i kao proteinske ekstrakte čuvala na +4 °C.

Koncentraciju proteina u uzorcima izmjerila sam koristeći modificiranu Bradford metodu, koja se od originalne metode razlikuje po zakiseljavanju smjese koja pospješuje vezanje proteina za boju CBB (Pavoković i sur. 2012). U tubama od 15 mL pomiješala sam redom 10 μL 0,1 M HCl, 20 μL proteinskog ekstrakta, 70 μL reH₂O te 3,5 mL radne Bradford otopine (poglavlje 3.7.). Uzorke sam promiješala na vorteksu, inkubirala u mraku 10 minuta te potom očitala apsorbanciju pri valnoj duljini od 595 nm. Koncentraciju proteina u uzorcima izračunala sam iz baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina BSA poznatih koncentracija

(0,2 – 2,0 mg mL⁻¹) pripremljenih u IEF puferu uz dodatak DTT i amfolita i izmjerenih na isti način.

Ovako pripremljene uzorke koristila sam za analizu ekspresije ukupnih proteina nakon razdvajanja elektroforetskim tehnikama, te za analizu ekspresije enzima SOD, CAT, APX i peroksidaze iz hrena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP) nakon prijenosa na membranu.

3.15. Analiza ekspresije ukupnih topivih proteina

Za analizu ekspresije ukupnih topivih proteina koristila sam metodu jednodimenzionalne natrijeve dodecil sulfat - poliakrilamid gel elektroforeze (eng. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE), najčešće korištene elektroforetske tehnike za analizu proteina koja uključuje uporabu ovog anionskog detergenta za otapanje, denaturaciju i disocijaciju proteina. Vežanje SDS-a na nastale polipeptidne lance maskira njihov naboj, što omogućuje razdvajanje polipeptida isključivo na temelju njihove relativne molekulske mase (Balen i sur. 2011).

Za SDS-PAG elektroforezu koristila sam sustav *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* (Bio-Rad, SAD), prema protokolu opisanom u Balen i sur. (2011). Pripremila sam gelove prema sastavu opisanom u Tablici 4. Prije nanošenja na gel, u proteinske ekstrakte (poglavlje 3.13.) dodala sam pufer za denaturaciju [eng. *sample buffer*; 187,5 mM Tris-HCl, 20% (v/v) glicerol, 6% (w/v) SDS, 5% (v/v), β-merkaptoetanol, 0,1% BFB] u omjeru 5:1 te ih inkubirala 5 minuta na 95 °C u termobloku. Na gelove sam nanosila 15 µg proteina za bojanje bojom CBB, odnosno 7 µg proteina za bojanje srebrovim nitratom. Kao biljeg molekulskih masa na gelove sam nanosila *ColorBURST™ Electrophoresis Marker* (Sigma-Aldrich, Njemačka). Elektroforezu sam provodila na sobnoj temperaturi u elektrodnom puferu za SDS-PAG elektroforezu [0,25 M Tris, 1,92 M glicin i 10% (w/v) SDS, pH 8,3], kojega sam prethodno razrijedila 10×, prvih 15 minuta na 100 V, te na 190 V do kraja.

Tablica 4. Sastav otopina za pripremu 12% gelova za SDS-PAGE.

	12% gel za razdvajanje	4% gel za sabijanje
reH ₂ O	3,35 mL	3,050 mL
Tris/HCl	2,50 mL (1,5 M; pH 8,8)	1,250 mL (0,5 M; pH 6,8)
30% akrilamid/bisakrilamid (AA/Bis)	4,00 mL	0,665 mL
	vakuum	
10% amonijev dodecil sulfat (SDS)	100 µL	50 µL
10% amonijev peroksodisulfat (APS)	50 µL	35 µL
tetrametiletilendiamin (TEMED)	5 µL	8 µL

3.15.1. Bojanje gelova bojom *Coomassie Brilliant Blue*

Bojanje gelova bojom CBB provela sam kako je opisano u Balen i sur. (2011). Po završetku elektroforeze, gel sam 60 minuta inkubirala u otopini za bojenje [0,1% (w/v) CBB R-250, 45% (v/v) C₂H₅OH, 10% (v/v) ledena octena kiselina] na tresilici pri sobnoj temperaturi. Zatim je uslijedila inkubacija u otopini za odbojavanje [10% (v/v) octena kiselina i 20% (v/v) metanol] pri istim uvjetima, do pojave plavih proteinskih vrpca na prozirnome gelu. Otopinu za odbojavanje bilo je potrebno nekoliko puta promijeniti radi zasićenja. Gel sam čuvala u 10%-tnoj (v/v) otopini octene kiseline do skeniranja za daljnju analizu.

3.15.2. Bojanje gelova srebrovim nitratom

Za bojanje gelova srebrovim nitratom (AgNO₃) koristila sam metodu od Blum i sur. (1987). Nakon elektroforeze, gel sam fiksirala otopinom koja je sadržavala 50% (v/v) etanola, 12% (v/v) octene kiseline i 0,5% (v/v) formaldehida, 60 minuta na tresilici pri sobnoj temperaturi. Gel sam potom ispirala otopinom 30% (v/v) C₂H₅OH, 3× po 20 minuta pri navedenim uvjetima, nakon čega je uslijedila jednogminutna obrada 0,02%-tnom (w/v) otopinom natrijevog tiosulfata (Na₂S₂O₃). Nakon kratkog ispiranja u reH₂O, gel sam 20 minuta inkubirala u otopini za impregnaciju [0,2% (w/v) AgNO₃ i 0,075% (v/v) formaldehida]. Uslijedilo je razvijanje otopinom koja sadrži 6% (w/v) natrijevog karbonata (Na₂CO₃), 0,05% (v/v) formaldehida i 0,0004% (w/v) Na₂S₂O₃, do pojave smeđih proteinskih vrpca, nakon čega sam reakciju zaustavila naglim zakiseljavanjem dodatkom otopine sastava 50% (v/v) C₂H₅OH i 12% (v/v) octena kiselina. Gel sam nakon bojanja skenirala radi analize.

3.16. Imunodetekcija antioksidacijskih enzima na membrani

3.16.1. Razdvajanje proteina

Prijenosu proteina na membranu prethodilo je njihovo razdvajanje primjenom SDS-PAG elektroforeze, kako je opisano u prethodnom poglavlju. Za razdvajanje izoenzima SOD, APX i CAT koristila sam 12%-tne gelove za razdvajanje (Tablica 4.) na koje sam nanijela volumen uzoraka koji sadrži 15 µg proteina, a izoforme HRP razdvojila sam na 10%-tnom gelu za razdvajanje (Tablica 5.) na kojeg sam nanijela 10 µg proteina. Za kontrolu nanošenja uzoraka (eng. *loading control*) koristila sam protutijelo za β-aktin (ACT), protein staničnog citoskeleta veličine oko 42 kDa, čija je ekspresija ujednačena u svim tipovima stanica te nije podložna značajnim promjenama uslijed tretmana.

Tablica 5. Sastav otopina za pripremu 10% gelova za SDS-PAGE.

	10% gel za razdvajanje	4% gel za sabijanje
reH ₂ O	4,00 mL	3,050 mL
Tris/HCl	2,50 mL (1,5 M; pH 8,8)	1,250 mL (0,5 M; pH 6,8)
30% akrilamid/bisakrilamid (AA/Bis)	3,33 mL	0,665 mL
	vakuum	
10% amonijev dodecil sulfat (SDS)	100 µL	50 µL
10% amonijev peroksodisulfat (APS)	50 µL	35 µL
tetrametiletilendiamin (TEMED)	5 µL	8 µL

3.15.2. Prijenos proteina na membranu

Po završetku elektroforeze, gelove sam prenijela u vertikalni sustav za elektroprijenos *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad, SAD) koji se sastoji od plastičnog okvira, dvije spužvice, dva *Whatmann* filter papira te nitrocelulozne membrane koje sam prethodno namočila u puferu za prijenos [29 mM Tris, 192 mM glicin, 10% (v/v) metanol]. Gel sam položila na nitroceluloznu membranu ispod koje su se nalazili spužvica i *Whatmann* papir, preklapila s drugim *Whatmann* papirom i spužvicom te zatvorila okvir pazeći da između gela i membrane ne zaostanu mjehurići zraka koji bi onemogućili prijenos proteina. Sustav sam zatim prebacila u uređaj tako da membrana bude okrenuta prema + elektrodi, nadopunila hladnim puferom za prijenos te postavila posudu s ledom za dodatno hlađenje. Prijenos se odvijao

60 minuta na 60 V, nakon čega sam bojom *Rouge Ponceau S* [0,5% (w/v) *Rouge Ponceau S*, 1% (v/v) octena kiselina], koja se reverzibilno veže na proteine, provjerila kvalitetu prijenosa.

3.16.2. Obrada protutijelima i detekcija

Višak boje na membrani uklonila sam s deH₂O, nakon čega sam grafitnom olovkom ucrtala položaje biljega molekulskih masa. Membranu sam potom dodatno odbojala u TBS puferu (eng. *Tris-buffered saline*; 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5), nakon čega je slijedilo blokiranje membrana. Membrane za detekciju izoformi enzima SOD, CAT, APX i ACT blokirala sam u otopini A sastavljenoj od 1× PBS pufera (poglavlje 3.9.3), 1% (v/v) *Tween 20* i 2% (w/v) bezmasnog mlijeka u prahu. Membranu za detekciju izoformi enzima HRP blokirala sam u istoj otopini, ali uz dodatak 10% (w/v) bezmasnog mlijeka u prahu. Blokiranje je trajalo 60 minuta pri sobnoj temperaturi uz potresanje, nakon čega je uslijedila obrada membrana primarnim protutijelima (Agrisera, Švedska) otopljenima u otopini A, kako je prikazano u Tablici 6. Inkubacija u primarnim protutijelima odvijala se prvih 60 minuta na sobnoj temperaturi uz uporabu tresilice, te potom preko noći na +4 °C.

Sljedeći dan, membrane sam 3× po 10 minuta ispirala u pripadajućoj otopini A, te ih potom 60 minuta inkubirala u otopini A uz dodatak sekundarnog protutijela (Tablica 6), pri sobnoj temperaturi na tresilici. Uslijedilo je ispiranje u otopini B [1× PBS pufer, 1% (v/v) *Tween 20*], 2× po 10 minuta, nakon čega sam provela detekciju proteinskih vrpca uporabom otopina za kemiluminiscenciju (*Western-Sure® Chemiluminescent Substrate*, LI-COR Biosciences, SAD) i uređaja *C-DiGit Chemiluminescence Western Blot Scanner* (LI-COR Biosciences, SAD).

Tablica 6. Priprema protutijela korištenih za imunodetekciju proteina SOD, CAT, APX, HRP i ACT.

Protein	1° protutijelo	Razrjeđenje	2° protutijelo	Razrjeđenje
SOD	poliklonalno, kunićji anti-Cu/Zn SOD	1:1000	anti-kunićji IgG-HRP	1:30000
CAT	poliklonalno, kunićji anti-CAT	1:1000	anti-kunićji IgG-HRP	1:30000
APX	poliklonalno, kunićji anti-APX	1:1000	anti-kunićji IgG-HRP	1:30000
HRP	poliklonalno, kunićji anti-HRP	1:2000	anti-kunićji IgG-HRP	1:30000
ACT	poliklonalno, kunićji anti-ACT	1:1000	anti-kunićji IgG-HRP	1:30000

3.16.3. Analiza membrana

Za analizu intenziteta signala detektiranih proteinskih vrpca koristila sam računalni program *Image Studio Lite 5.2* (LI-COR Biosciences, SAD). Intenzitete signala SOD, CAT, APX i HRP sam normalizirala prema signalu ACT, a dobivene rezultate sam prikazala kao srednje vrijednosti relativnog intenziteta \pm standardna pogreška, dobivene u tri nezavisna pokusa. Razlike u ekspresiji između kontrole i različitih tretmana, sa i bez cisteina, sam analizirala koristeći jednosmjernu ANOVA uz Duncan post-hoc test, gdje sam statistički značajnom smatrala razliku $p \leq 0,05$ u programu *Statistica 12.0* (Stat Soft Inc., SAD).

3.17. Analiza proteina dvodimenzionalnom elektroforezom

Uporaba dvodimenzionalnih tehnika razdvajanja proteina omogućava analizu kompleksnih uzoraka i njihovo razlučivanje čak i u slučaju sličnih fizikalno-kemijskih svojstva, te nudi analizu proteinske ekspresije u cijelim stanicama i tkivima. Kombinacija metode IEF u prvoj dimenziji s SDS-PAG elektroforezom u drugoj dimenziji omogućuje razdvajanje proteina na osnovu naboja i veličine (Balen i sur. 2011).

3.17.1. Prva dimenzija - IEF

Kako bih proteinske ekstrakte (poglavlje 3.13.) pripremila za IEF, ekstraktima različitih tretmana sam dodatkom IEF pufera ujednačila koncentracije tako da je volumen uzoraka od 400 μ L sadržavao 400 μ g proteina. Potom sam uzorcima dodala 5 μ L boje BFB, centrifugirala 5 minuta na 20000 g pri sobnoj temperaturi, te ih prebacila u zasebne jažice u posudi za rehidraciju imobilina. Na uzorke sam potom položila imobiline (eng. *immobiline drystrip*) duljine 13 cm s nelinearnim gradijentnim gelom (pH 3-10), pazeći da se gel nalazi uronjen u uzorak te da između gela i uzorka nema mjehurića zraka. Imobiline sam potom prekrila s 900 μ L mineralnog ulja (*Immobiline DryStrip Cover Fluid*, GE Healthcare, SAD) kako bih spriječila njihovo isušivanje tijekom rehidracije koja je trajala između 12 i 16 h na sobnoj temperaturi.

Nakon rehidracije, imobiline sam prebacila na keramičku podlogu uređaja za IEF (Ettan IPHphore 3, GE Healthcare, SAD) u skladu s njihovom dužinom i orijentacijom. Na krajeve imobilina dodala sam elektrodne papiriće koje sam prethodno namočila u 150 μ L deH₂O te sam na njih postavila elektrode. Cijelu keramičku podlogu pretila sam sa 110 mL mineralnog ulja i pokrenula IEF prema programu u skladu s veličinom i brojem imobilina, pri čemu je kraj

označio prelazak 30 kVh. Nakon završetka prve dimenzije, imobiline sam spremila na -80 °C do uporabe.

3.17.2. Druga dimenzija – SDS-PAG elektroforeza

Prije provođenja druge dimenzije, provela sam ekvilibraciju imobilina koja im omogućuje potpunu reakciju sa SDS-om i pravilnu migraciju tijekom SDS-PAG elektroforeze (Balen i sur. 2011). Imobiline sam prvo 15 minuta inkubirala u puferu za ekvilibraciju [0,05 M Tris-HCl, pH 8,8, 6 M urea, 2% (w/v) SDS] uz dodatak 130 mM DTT-a za redukciju disulfidnih veza između polipeptidnih lanaca. Uslijedila je 15-minutna inkubacija u ekvilibracijskom puferu uz dodatak 135 mM jodacetamida (eng. *iodoacetamide*, IAA) koji alkiliranjem sulfhidridnih skupina sprječava ponovno stvaranje disulfidnih veza.

Nakon kratkog ispiranja u 1× elektrodnom puferu (poglavlje 3.14), ekvilibrirane gelove sam položila na prethodno pripremljeni SDS gel za drugu dimenziju (Tablica 7.), na način da se + strana imobilina nalazila s lijeve strane gela, pazeći da između gela i imobilina nema mjehurića zraka koji bi onemogućili prijenos proteina. Potom sam na komadić *Whatmann* papira dodala 5 µL biljega molekulskih masa te sam ga položila na gel s desne strane imobilina. Sve sam prelila otopinom agaroze [0,5% (w/v) agarozu, 0,1% (v/v) BFB, 1× elektrodni pufer] čije učvršćivanje dodatno spaja imobilin i SDS gel, a dodatak BFB stvara frontu koja omogućuje praćenje tijekom elektroforeze. Elektroforezu sam provodila uz dodatak elektrodnog pufera u sustavu *PROTEAN II xi Cell* (Bio-Rad, SAD) priključenom na izvor vode kako bi se održavala stalna temperatura, prvih 30 minuta na 100 V te na 220 V do kraja.

Tablica 7. Sastav otopina za pripremu 12% gelova za drugu dimenziju.

	12% SDS gel
reH ₂ O	20,3 mL
1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)	14,8 mL
30% akrilamid/bisakrilamid (AA/Bis)	24,0 mL
vakuum	
10% amonijev dodecil sulfat (SDS)	590 µL
10% amonijev peroksodisulfat (APS)	354 µL
tetrametiletilendiamin (TEMED)	35 µL

Po završetku druge dimenzije, proteinske mrlje sam vizualizirala bojanjem gela s CBB, na način kako je opisano u poglavlju 3.14.1. Obojane gelove sam skenirala i pohranila u 10%-tnoj octenoj kiselini na +4 °C do sljedećih koraka.

3.17.3. Analiza gelova dobivenih dvodimenzionalnom elektroforezom

Kvalitativna i kvantitativna analiza dobivenih gelova napravljena je pomoću računalnog programa *Image Master 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare, SAD). Količina proteina sadržana u pojedinačnim proteinskim mrljama na gelovima dobivenima dvodimenzionalnom elektroforezom izražena je u obliku volumnog postotka, a usporedbom volumnog postotka pojedinih proteinskih mrlja u gelovima kontrole i tretmana odabrala sam proteine za daljnju analizu. U obzir su došli proteini čija je ekspresija u tretmanima bila veća ili manja za faktor 1,5× u odnosu na kontrolu. Za detaljnu analizu razlika ekspresije između različitih tretmana, sa i bez cisteina, koristila sam jednosmjernu ANOVA uz Duncan post-hoc test, gdje sam statistički značajnom smatrala razliku $p \leq 0,05$. Analize su napravljene u programu *Statistica 12.0* (Stat Soft Inc., SAD).

3.18. Analiza proteina spektrometrijom masa

3.18.1. Priprema uzoraka za digestiju u gelu

Odabrane proteinske mrlje (poglavljje 3.16.3.) izrezala sam iz gelova pomoću plastičnog nastavka za pipetu odrezanog vrha. Izrezane komadiće gela prebacila sam u tubice u kojima se nalazila otopina za odbojavanje [10% (v/v) octena kiselina, 40% (v/v) metanol]. Gelove sam odbojavala na termobloku pri 550 rpm do potpunog obezbojenja.

3.18.2. Digestija u gelu

Protokol digestije započela sam uklanjanjem otopine za odbojavanje iz tubica s dijelovima gelova. Odbojane gelove potom sam isprala u otopini koja sadrži 5 mM amonijeva bikarbonata (NH_4HCO_3 ; eng. *ammonium bicarbonate*, ABC) i 50% (v/v) acetonitrila (CH_3CN ; ACN), 3× po 20 minuta na termobloku pri 25 °C i 900 rpm, kako bih uklonila zaostali CBB i SDS. Uslijedila je dehidracija gelova u 100% ACN u trajanju od 20 minuta pri istim uvjetima. Redukcija disulfidnih veza provedena je inkubacijom gela u otopini koja sadrži 10 mM DTT i 20 mM ABC, 45 minuta pri 900 rpm i 56 °C, nakon čega je uslijedila alkilacija cisteinskih ostataka otopinom koja sadrži 55 mM IAA u 20 mM ABC, 30 minuta u mraku pri 900 rpm i 25 °C. Gelovi su potom 2× isprani otopinom 5 mM ABC i 50% (v/v) ACN u trajanju od 20 minuta, te ponovo dehidrirani 15-minutnom inkubacijom u 100% ACN, sve pri 900 rpm i

25 °C. Preostali ACN sam uparila korištenjem vakuuma centrifuge (Savant DNA 120 SpeedVac, Thermo Scientific, SAD). Na osušene komadić gelova potom sam dodala po 50 µL tripsina (12,5 ng u 20 mM ABC), te ih ostavila na digestiji preko noći, pri 600 rpm i 37 °C.

3.18.3. Ekstrakcija peptida iz gela i pročišćavanje

Nakon prekonodne digestije, pokupila sam supernatant nad gelom te ga prenijela u čistu tubicu. Na gel sam dodala otopinu za ekstrakciju koja se sastoji od 50% (v/v) ACN i 1% (v/v) trifluoroctene kiseline (eng. *trifluoroacetic acid*, TFA), te sadržaj inkubirala 30 minuta na 900 rpm i 24 °C. Dobiveni supernatant sam pridodala prvom supernatantu dobivenom nakon prekonodne digestije. Ekstrakciju sam ponovila još jednom na isti način, nakon čega sam na gel dodala otopinu koja sadrži 80% (v/v) ACN i 1% (v/v) TFA, te ponovo inkubirala 30 minuta pri 900 rpm i 24 °C. Dobiveni supernatant pridodala sam prethodnima, a djelić gela na kojemu se vršila ekstrakcija bacila. Spojene supernatante sam potom uparila uporabom vakuuma centrifuge radi uklanjanja ACN do volumena od otprilike 50 µL.

Za pročišćavanje i ukoncentriravanje ekstrahiranih peptida koristila sam princip tekućinske kromatografije obrnutih faza, uz uporabu C18 *Stage tip* (eng. *Stop and go extraction tips*) kolonice pripremljene na Zavodu za biokemiju, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. *Stage tip* sam aktivirala dodatkom 100 µL metanola kojeg sam propustila kroz kolonicu kratkim centrifugiranjem pri 1000 g, pazеći da se kolonica pritom ne osuši, nakon čega sam uklonila propuštenu frakciju otopine. Ekvilibraciju sam provela prema istom principu, propuštanjem 200 µL otopine A* [2% (v/v) ACN, 1% (v/v) mravlja kiselina (eng. *formic acid*, FA)]. Na *Stage tip* sam zatim dodala sav volumen (~50 µL) uzorka peptida, pri čemu su tijekom centrifuge (1 minuta na 1000 g) peptidi zaostali na koloni, a kroz kolonu je prošlo otapalo koje sam potom uklonila. Peptide na koloni sam pročistila od soli dodatkom 200 µL otopine A (0,1% (v/v) FA) na način kako je prethodno opisano, te potom eluirala dodatkom 50 µL otopine B (80% (v/v) ACN u 0,1% (v/v) FA) uz pomoć šprice. Dobiveni eluat sam sakupila u plastičnu tubicu od 0,2 mL te uparila do volumena od ~5 µL. Prije postavljanja uzoraka u uređaj za spektrometriju masa, namjestila sam im volumen dodatkom 1,2 µL otopine A* i 5,8 µL otopine A, do konačnog volumena od 12 µL. Uzorke sam potom centrifugirala 10 minuta pri 12000 g i +4 °C radi uklanjanja čestica koje mogu začepiti kolonu.

3.18.4. Analiza peptida spektrometrijom masa

Dobivene peptide analizirala sam na spektrometru masa Q Exacutive Plus (Thermo Fisher Scientific, SAD) spregnutom s uređajem za nano-tekućinsku kromatografiju ultra visoke učinkovitosti (eng. *ultra high performance liquid chromatography*, nanoUHPLC) EASY-nLC 1200 (Thermo Fisher Scientific, SAD). Za separaciju peptida dobivenih triptičkom razgradnjom koristila sam HPLC kolonu za kromatografiju reverznih faza EASY-Spray™, dimenzija 75 μm × 25 cm, s veličinom čestica 2 μm. Analiza dobivenih podataka napravljena je programom *Proteome Discoverer 2.4*.

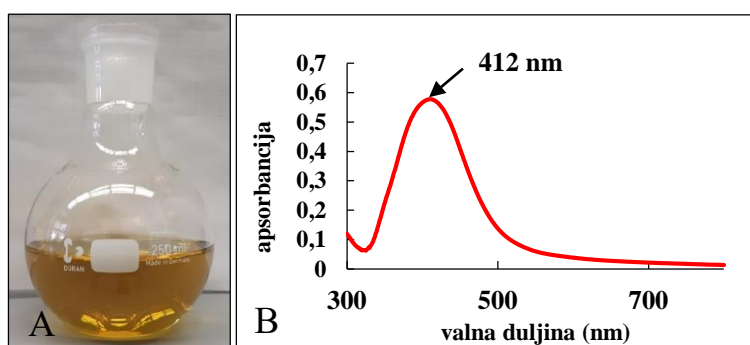
REZULTATI

4. REZULTATI

4.1. Sinteza i karakterizacija AgNP-PVP i AgNP-CTAB

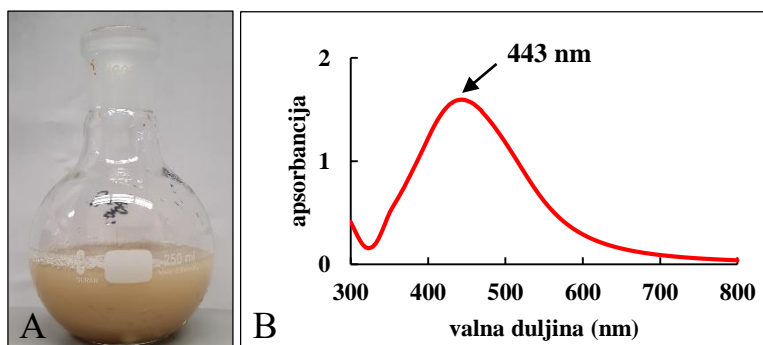
4.1.1. Izgled i apsorpcijski spektar AgNP-PVP i AgNP-CTAB

Izgled matične otopine suspenzije AgNP-PVP prikazan je na Slici 15A. Dobivena suspenzija bila je žute boje i bistrog izgleda. Apсорpcijski maksimum suspenzije AgNP-PVP, koji se nalazio na valnoj duljini od 412 nm, potvrdio je uspješnu sintezu AgNP nastalu uslijed redukcije iona Ag^+ (Zielinska i sur. 2009), a apсорpcijski spektar pokazao je usku distribuciju čestica u suspenziji veličine oko 40 nm (Paramelle i sur. 2014) (Slika 15B).



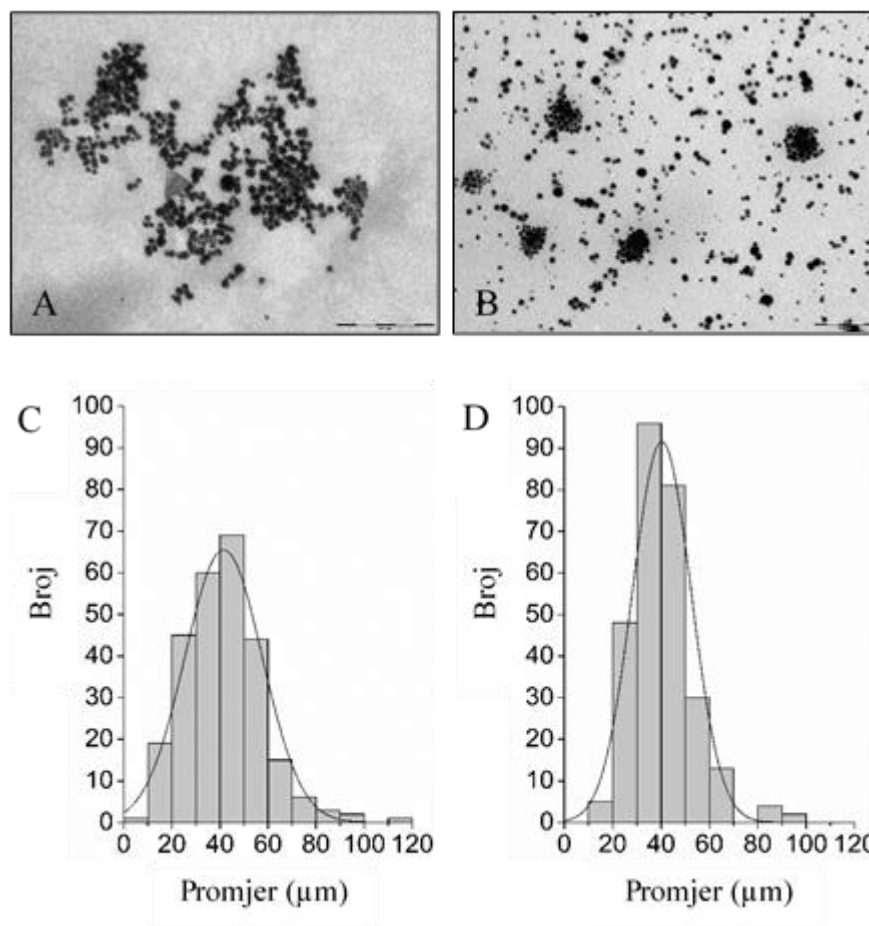
Slika 15. Izgled (A) i apsorpcijski spektar (B) suspenzije matične otopine AgNP-PVP neposredno nakon sinteze.

Suspenzija AgNP-CTAB bila je neprozirna otopina sivkasto-narančaste boje (Slika 16A). Apсорpcijski maksimum, smješten na valnoj duljini od 443 nm, potvrdio je uspješnost sinteze nanočestica srednje veličine oko 70 nm (Paramelle i sur. 2014) (Slika 16B). Širina dobivenog spektra ukazuje na široku distribuciju čestica različitih veličina sadržanih u suspenziji.



Slika 16. Izgled (A) i apsorpcijski spektar (B) suspenzije matične otopine AgNP-CTAB neposredno nakon sinteze.

Analize suspenzija AgNP-PVP (Slika 17A) i AgNP-CTAB (Slika 17B) primjenom TEM-a pokazale su pretežito sferične čestice, s veoma malim udjelom štapićastih oblika. Histogram distribucije veličina pokazao je srednju veličinu od oko 50 nm kod oba tipa AgNP (Slika 17C i D).



Slika 17. Suspenzije AgNP-PVP (A) i AgNP-CTAB (B) analizirane transmisijskim elektronskim mikroskopom (bar = 0,5 µm) te histogrami distribucije veličina AgNP-PVP (C) i AgNP-CTAB (D) dobiveni analizom slika transmisijskog elektronskog mikroskopa.

4.1.2. Fizikalno-kemijske karakteristike AgNP-PVP i AgNP-CTAB

Analiza hidrodinamičkog promjera (d_H) suspenzije AgNP-PVP pokazala je bimodalnu raspodjelu veličina (Tablica 8.), s primarnim pikom na $41,53 \pm 1,14$ nm, što je u skladu s podacima dobivenim UV-Vis spektrometrijom, te sekundarnim pikom na $8,16 \pm 0,37$ nm, koji vjerojatno predstavlja micelle PVP zaostale tijekom sinteze AgNP. Analiza d_H suspenzije AgNP-CTAB pokazala je trimodalnu distribuciju (Tablica 8), s primarnim pikom na $64,75 \pm 7,28$ nm, koji je odgovarao vrijednosti dobivenoj UV-Vis spektrometrijom. Pik na $26,28 \pm 6,37$ nm odgovarao je manjim AgNP koje su se formirale i stabilizirale u početku

sinteze uz suvišak CTAB, dok pik izmjeren na $227,00 \pm 16,02$ nm predstavlja manje aglomerate nanočestica.

Mjerenje ζ potencijala pokazalo je blago negativan površinski naboj AgNP-PVP ($-1,0 \pm 0,6$ mV) koji odgovara stabilizaciji neutralnim polimerom PVP, dok je pozitivan površinski naboj AgNP-CTAB ($11,4 \pm 1,1$ mV) posljedica stabilizacije kationskim surfaktantom (Tablica 8.).

Mjerenje koncentracije srebra u matičnim otopinama nanočestica pokazalo je 9,8 mM koncentraciju za AgNP-PVP te 11,5 mM koncentraciju za AgNP-CTAB (Tablica 8.), a navedene vrijednosti služile su za izračun pripreme radnih otopina za tretmane sjemenki i klijanaca duhana.

Tablica 8. Fizikalno-kemijske karakteristike AgNP-PVP i AgNP-CTAB u matičnim otopinama dobivenim kemijskom sintezom, prikazane kao hidrodinamički promjer (d_H) dobiven iz omjera distribucije po volumenu, ζ potencijal izražen u mV, maksimum apsorpcije izražen u nm i koncentracije matičnih otopina izražene u mM.

Karakteristike		AgNP-PVP	AgNP-CTAB
I. distribucija	d_H , nm	$8,16 \pm 0,37$	$26,28 \pm 6,37$
	volumni udio, %	$81,28 \pm 19,96$	$84,68 \pm 12,49$
II. distribucija	d_H , nm	$41,53 \pm 1,14$	$64,75 \pm 7,28$
	volumni udio, %	$1,05 \pm 0,96$	$6,10 \pm 0,93$
III. distribucija	d_H , nm	/	$227,00 \pm 16,02$
	volumni udio, %	/	$6,16 \pm 3,52$
ζ potencijal, mV		$-1,0 \pm 0,6$	$11,4 \pm 1,1$
Maksimum apsorpcije, nm		412	443
Koncentracija matične otopine, mM		9,8	11,5

4.2. Mjerenje stabilnosti AgNP-PVP i AgNP-CTAB u podlozi ½ MS

4.2.1. Spektrofotometrijsko mjerenje stabilnosti u krutoj podlozi ½ MS

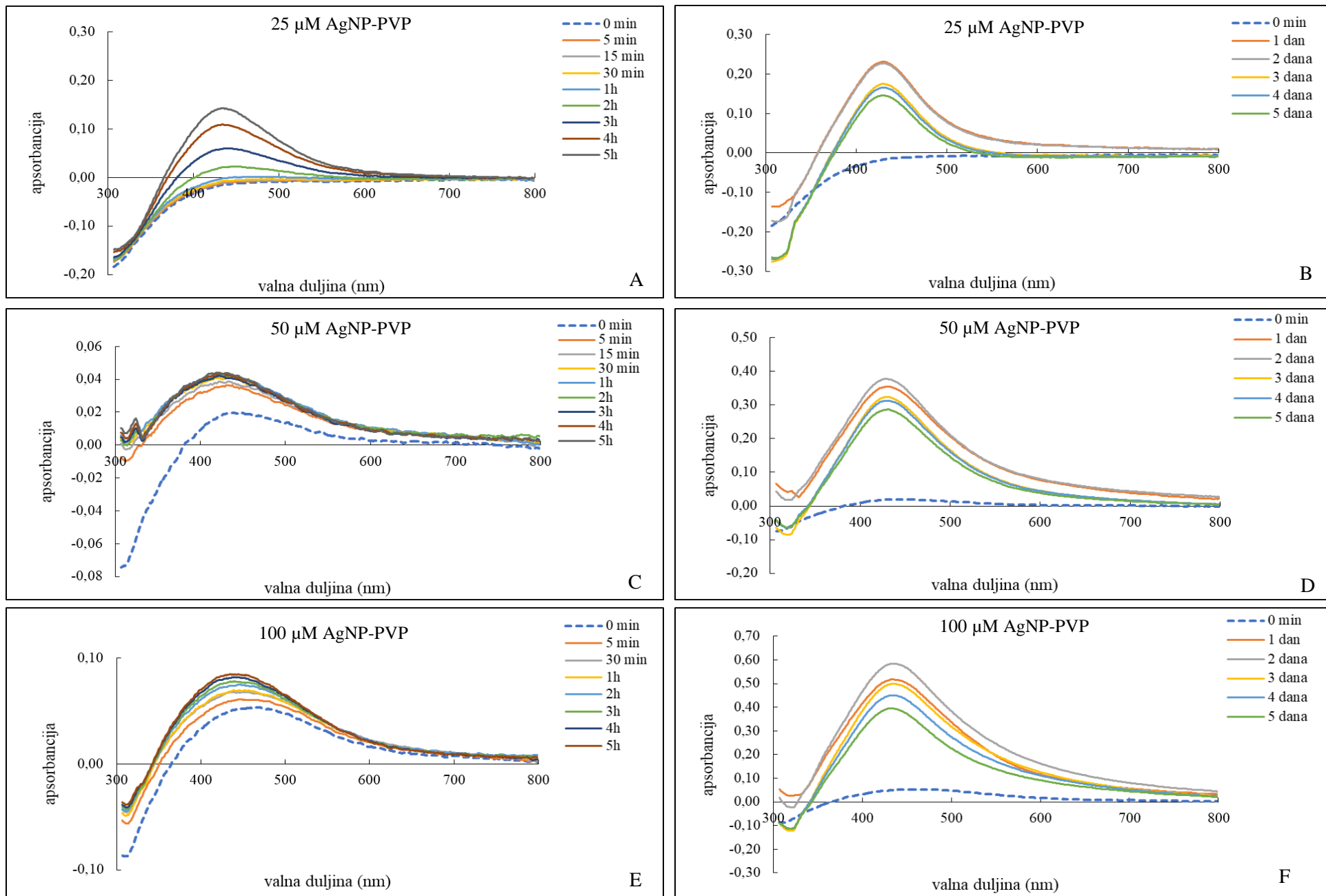
4.2.1.1. Spektar AgNP-PVP u krutoj podlozi ½ MS

Mjerenje spektra 25 μ M AgNP-PVP odmah po dodatku u podlogu nije rezultiralo stvaranjem apsorpcijskog maksimuma koji bi ukazao na postojanje nanočestica u podlozi (Slika 18A). Apсорpcijski maksimum na valnoj duljini od 435 nm počeo se formirati tek u 2. satu mjerenja, a pomak maksimuma u odnosu na matičnu otopinu AgNP-PVP (412 nm) ukazuje na znatnu aglomeraciju nanočestica u podlozi na početku mjerenja. U sljedećim satima došlo je do pomaka maksimuma prema 428 nm koji, uz značajan porast apsorpcije, ukazuje na

disocijaciju dijela nanočestica. Tijekom sljedećih mjerenja, maksimum apsorpcije nastavio se pomicati prema manjim valnim duljinama uz značajan porast intenziteta. Nakon 24 sata, maksimum apsorpcije izmjeren je na valnoj duljini od 421 nm te do kraja mjerenja nije bilo daljnjih promjena u njegovom položaju, ali je nakon drugog dana zabilježen mali pad njegova intenziteta, koji se nastavio i u sljedećim danima (Slika 18B).

Apsorpcijski spektar 50 μ M AgNP-PVP pokazao je maksimum apsorpcije na 434 nm već od 0. minute (Slika 18C), što upućuje na znatnu aglomeraciju nanočestica u odnosu na matičnu otopinu AgNP-PVP (412 nm). No u 1. satu mjerenja došlo je do pomaka maksimuma prema manjim valnim duljinama (nakon 1. sata na 426 nm), što uz značajan porast apsorpcije ukazuje na disocijaciju manjih nanočestica s prethodno formiranih aglomerata. U 2. satu mjerenja maksimum apsorpcije pomicao se prema manjim valnim duljinama i zadržao na 422 nm tijekom sljedeća tri sata. Nakon 24 sata zabilježen je značajan porast intenziteta u odnosu na mjerenja od 1. dana, te mali pomak apsorpcijskog maksimuma prema većim valnim duljinama (426 nm), ukazujući na stvaranje manjih aglomerata nanočestica (Slika 18D). Tijekom sljedećih pet dana AgNP-PVP su ostale stabilne u podlozi, položaj maksimuma nije se mijenjao, a izmjeren je postupni pad intenziteta apsorpcije nakon trećeg dana mjerenja.

U spektru 100 μ M AgNP-PVP apsorpcijski maksimum bio je vidljiv od samog početka mjerenja na valnoj duljini od 457 nm, što je značajan pomak u odnosu na matičnu otopnu AgNP-PVP i ukazuje na stvaranje većih aglomerata nanočestica u podlozi tijekom prvih minuta u odnosu na ista mjerenja s manjim koncentracijama AgNP-PVP (Slika 18E). Daljnja mjerenja unutar 1. sata pokazala su pomak maksimuma prema manjim valnim duljinama (nakon 1. sata na 445 nm), praćen disocijacijom nanočestica manjih dimenzija. Tijekom idućih sati nastavljen je pomak maksimuma apsorpcije prema manjim valnim duljinama praćen postupnim porastom intenziteta, te se nakon pet sati on nalazio na 431 nm, ukazujući na stabilizaciju AgNP-PVP u podlozi. Nakon 24 sata nije izmjeren pomak maksimuma apsorpcije u odnosu na prethodni dan, ali je došlo do značajnog porasta intenziteta, koji je bio još jače izražen u 2. danu mjerenja (Slika 18F). U 3. danu zabilježen je slabi pad apsorpcije, koji se nastavio do kraja mjerenja, pri čemu nije bilo dodatnih promjena u poziciji apsorpcijskog maksimuma.



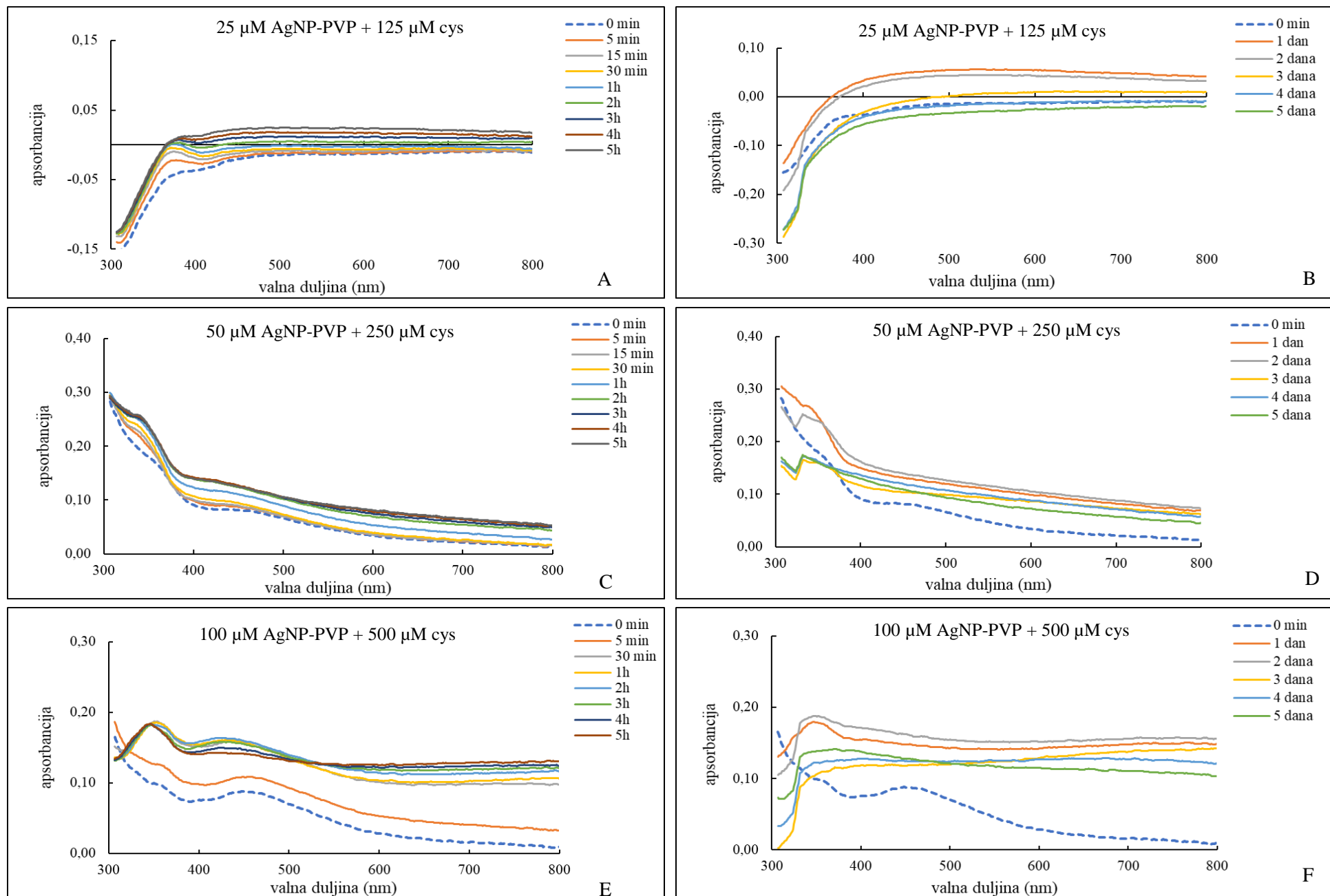
Slika 18. Apsorpcijski spektar AgNP-PVP u krutoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS: 25 μM u prvom danu (A), 25 μM tijekom pet dana mjerenja (B), 50 μM u prvom danu (C), 50 μM tijekom pet dana mjerenja (D), 100 μM u prvom danu (E), 100 μM tijekom pet dana mjerenja (F).

4.2.1.2. Spektar AgNP-PVP u krutoj podlozi ½ MS uz dodatak cisteina

Dodatak 125 μM cisteina u otopinu 25 μM AgNP-PVP u potpunosti je onemogućio stvaranje maksimuma apsorpcije karakterističnog za AgNP, što upućuje na snažnu i brzu disocijaciju iona Ag^+ s površine nanočestica (Slika 19A). Ipak, maksimum zabilježen na valnoj duljini od oko 380 nm ukazuje na moguće stvaranje sekundarnih nanočestica manjih dimenzija te interakciju iona Ag^+ s komponentama podloge. Mjerenje apsorpcijskog spektra tijekom sljedećih pet dana potvrdilo je potpuni raspad AgNP-PVP u podlozi, vjerojatno uzrokovan stvaranjem različitih kompleksa iona Ag^+ s ionima koji se nalaze u podlozi (Slika 19B).

Apsorpcijski spektar 50 μM AgNP-PVP i 250 μM cisteina pokazao je primarni (460 nm) i sekundarni (370 nm) maksimum već od 0. minute mjerenja (Slika 19C), sugerirajući simultanu aglomeraciju AgNP-PVP dodanih u podlogu pod utjecajem cisteina, ali i brzu disocijaciju iona Ag^+ te stvaranje sekundarnih nanočestica manjih dimenzija. Tijekom 1. dana mjerenja, primarni maksimum dodatno je slabio i pomicao se prema manjim valnim duljinama, dok je apsorpcija sekundarnog maksimuma rasla, a sam maksimum je uz pomak prema valnoj duljini od 360 nm postajao oštiji, ukazujući na daljnje stvaranje manjih AgNP. Sekundarni maksimum ostao je nepromijenjen i nakon 24 sata, dok je primarni u potpunosti nestao (Slika 19D). Nakon 1. dana više nije bilo moguće detektirati niti jedan maksimum apsorpcije u izmjerenom spektru, što ukazuje na potpuni raspad nanočestica u podlozi.

Apsorpcijski spektar 100 μM AgNP-PVP i 500 μM cisteina također je pokazao postojanje primarnog (450 nm) i sekundarnog (380 nm) maksimuma, vidljivih od samog početka mjerenja (Slika 19E). Oba maksimuma bila su jače oštine i intenziteta u usporedbi sa manjim koncentracijama, što je bilo jako izraženo nakon stabilizacije u 30. minuti mjerenja. Pri tome je došlo do pomaka apsorpcije primarnog maksimuma na 420 nm, koji sugerira daljnju disocijaciju AgNP-PVP pod utjecajem cisteina, što potvrđuje i stalni pad intenziteta apsorpcije. Usporedno s time dolazi do izoštravanja sekundarnog maksimuma te pomaka na valnu duljinu od 360 nm, što pokazuje stvaranje veće koncentracije sekundarnih AgNP manjih dimenzija u prvim satima mjerenja, vjerojatno u kombinaciji s različitim Ag kompleksima u podlozi. Nakon 24 sata mjerenja vidljiv je samo maksimum na 350 nm, što upućuje na potpunu disocijaciju inicijalnih AgNP-PVP pod utjecajem cisteina (Slika 19F). I sekundarni maksimum počinje slabjeti 3. dana mjerenja, nakon čega dolazi do potpunog raspada nanočestica u podlozi.



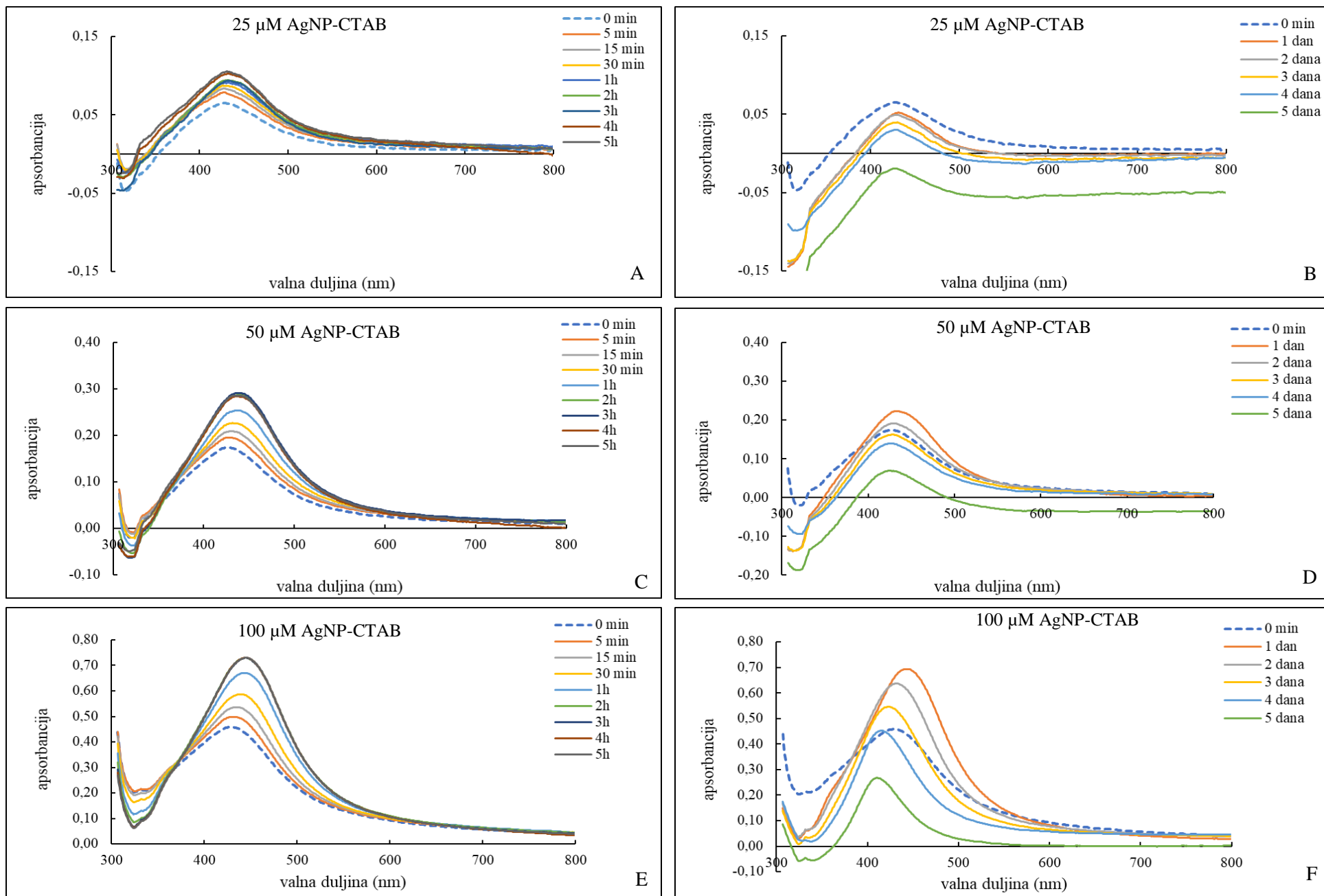
Slika 19. Apsorpcijski spektar kombinacije AgNP-PVP i cisteina (cys) u krutoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS: 25 μM + 125 μM u prvom danu (A), 25 μM + 125 μM tijekom pet dana mjerenja (B), 50 μM + 250 μM u prvom danu (C), 50 μM + 250 μM tijekom pet dana mjerenja (D), 100 μM + 500 μM u prvom danu (E), 100 μM + 500 μM tijekom pet dana mjerenja (F).

4.2.1.3. Spektar AgNP-CTAB u krutoj podlozi ½ MS

Apsorpcijski spektar 25 μM AgNP-CTAB pokazao je maksimum apsorpcije pri 427 nm odmah po skrućivanju podloge (Slika 20A), što je manja valna duljina u odnosu na maksimum matične otopine AgNP-CTAB (443 nm). To pokazuje da u interakciji s podlogom odmah dolazi do određene disocijacije i smanjenja veličine nanočestica. Tijekom prvih pet sati mjerenja nije došlo do daljnjeg pomaka maksimuma apsorpcije, ali je izmjereno pojačanje ukupnog intenziteta. Mjerenja tijekom sljedeća četiri dana pokazala su stabilnost AgNP-CTAB, pri čemu nije došlo do promjene u položaju maksimuma apsorpcije, iako je zamijećeno postupno smanjenje intenziteta apsorpcije koje upućuje na početak aglomeracije (Slika 20B). Značajan pad apsorpcije u 5. danu mjerenja ukazuje na značajan raspad AgNP-CTAB uslijed disocijacije iona Ag^+ , što dodatno potvrđuje pomak maksimuma na 420 nm.

Apsorpcijski spektar 50 μM AgNP-CTAB na početku mjerenja pokazao je maksimum apsorpcije na 426 nm, što je značajno smanjenje u odnosu na matičnu otopinu AgNP-CTAB i sugerira brzu disocijaciju iona Ag^+ te zastupljenost nanočestica manjih promjera (Slika 20C). Položaj apsorpcijskog maksimuma nije se mijenjao tijekom sljedećih mjerenja unutar 1. sata, iako je zabilježeno povećanje intenziteta apsorpcije koje je u skladu s nastajanjem manjih nanočestica. Pomak prema većim valnim duljinama dogodio se u mjerenjima do 5. sata, što uz stagnaciju intenziteta apsorpcije upućuje na početak aglomeracije nanočestica. Mjerenja napravljena u sljedećim danima pokazala su značajan pad intenziteta apsorpcije uz pomak maksimuma prema manjim valnim duljinama (420 nm u petom danu), sugerirajući simultanu agregaciju i disocijaciju AgNP-CTAB koja dovodi do njihovog postupnog raspada (Slika 20D).

Mjerenje spektra 100 μM AgNP-CTAB pokazalo je maksimum apsorpcije na valnoj duljini od 426 nm, koji ponovno predstavlja značajno smanjenje veličine nanočestica u odnosu na matičnu otopinu (Slika 20E). U sljedećim minutama mjerenja, maksimum apsorpcije pomicao se prema većim valnim duljinama (442 nm nakon 1. sata), ukazujući na stvaranje aglomerata. Ostala mjerenja u tijeku 1. dana pokazala su samo značajno povećanje njegovog intenziteta. Nakon 24 sata nisu zabilježene značajne promjene u spektru, ukazujući na stabilnost AgNP-CTAB (Slika 20F). Nakon drugog dana došlo je do pomaka maksimuma na 426 nm, što se uz postupni pad intenziteta nastavilo do zadnjeg dana mjerenja, ukazujući na postupnu disocijaciju iona Ag^+ i prevalenciju nanočestica manjih dimenzija unutar podloge.



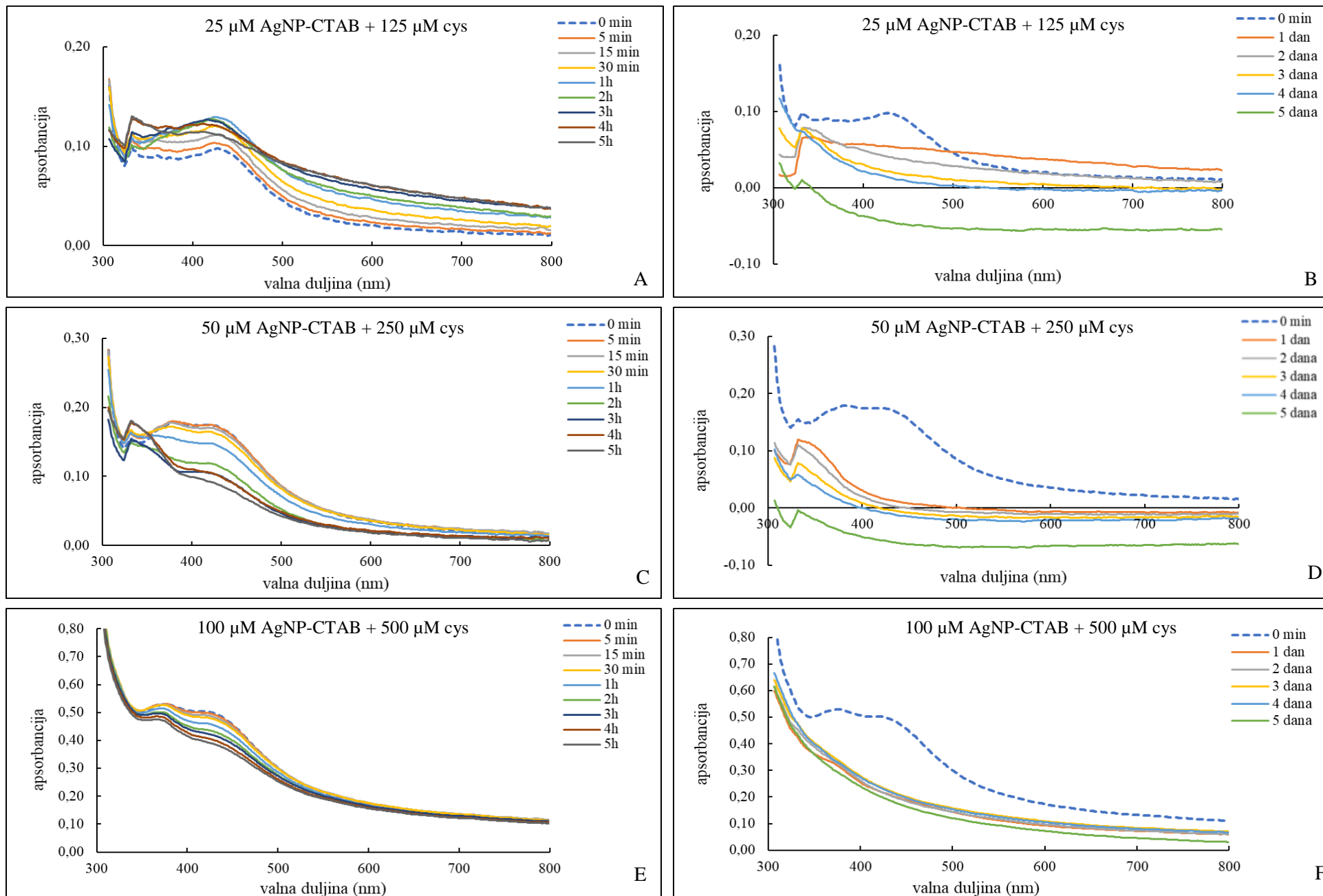
Slika 20. Apsorpcijski spektar AgNP-CTAB u krutoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS: 25 μM u prvom danu (A), 25 μM tijekom pet dana mjerenja (B), 50 μM u prvom danu (C), 50 μM tijekom pet dana mjerenja (D), 100 μM u prvom danu (E), 100 μM tijekom pet dana mjerenja (F).

4.2.1.4. Spektar AgNP-CTAB u krutoj podlozi ½ MS uz dodatak cisteina

Spektar 25 µM AgNP-CTAB s dodatkom 125 µM cisteina pokazao je maksimum apsorpcije na 419 nm, što je značajno smanjenje u odnosu na matičnu otopinu AgNP-CTAB (443 nm) i ukazuje na brzu disocijaciju iona Ag⁺ odmah nakon dodatka nanočestica u podlogu s cisteinom (Slika 21A). Mjerenje tijekom sljedeća dva sata pokazalo je samo porast intenziteta apsorpcije. Nakon 3. sata, izmjeren je maksimum na valnoj duljini od 414 nm te stvaranje sekundarnog maksimuma na 380 nm, što sugerira značajnu disocijaciju iona Ag⁺ i formiranje AgNP manjih veličina. Tijekom sljedećih dana zabilježen je nestanak primarnog maksimuma i postupno slabljenje sekundarnog, ukazujući na potpuni raspad AgNP-CTAB (Slika 21B).

Mjerenje stabilnosti 50 µM AgNP-CTAB i 250 µM cisteina pokazalo je formiranje dva maksimuma odmah nakon solidifikacije podloge (Slika 21C). Primarni maksimum, nastao zbog dodatka AgNP-CTAB, nalazio se na 412 nm, što ukazuje na značajno smanjenje veličine AgNP-CTAB uslijed disocijacije. Sekundarni maksimum na 380 nm nastao je formiranjem sekundarnih nanočestica i interakcijom s dijelovima podloge te pokazuje jači intenzitet u odnosu na primarni maksimum. Tijekom prvih 30 minuta mjerenja nije došlo do značajnih promjena u poziciji i intenzitetu maksimuma, a u 1. satu zabilježen je pomak sekundarnog maksimuma prema manjim valnim duljinama uz značajan pad apsorpcije, ukazujući na daljnju disocijaciju nanočestica. Sličan trend nastavio se do 5. sata, kada je izostanak primarnog maksimuma pokazao potpunu disocijaciju AgNP-CTAB uzrokovanu cisteinom u podlozi, a izostanak maksimuma tijekom mjerenja u sljedećih pet dana to je dodatno potvrdio (Slika 21D).

Dodatkom 500 µM cisteina, apsorpcijski spektar 100 µM AgNP-CTAB pokazao je dva maksimuma, kao i pri nižim koncentracijama tretmana (Slika 21E). Maksimum na valnoj duljini od 419 nm odgovara AgNP-CTAB, iako manjih veličina u odnosu na matičnu otopinu, što upućuje na znatnu disocijaciju Ag⁺ iona u interakciji s cisteinom. Sekundarni maksimum na 370 nm, kao i u prijašnjim mjerenjima, ukazuje na stvaranje manjih nanočestica te interakciju sa samom podlogom. Tijekom prvog dana mjerenja nije došlo do značajnih promjena u položaju maksimuma, iako je njihov intenzitet postupno slabio, što je bilo jače izraženo kod primarnog maksimuma. Mjerenja tijekom sljedećih pet dana ukazala su na potpuni raspad AgNP-CTAB izostankom maksimuma apsorpcije u izmjerenim spektrima (Slika 21F).



Slika 21. Apsorpcijski spektar kombinacije AgNP-CTAB i cisteina (cys) u krutoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS: 25 μ M + 125 μ M u prvom danu (A), 25 μ M + 125 μ M tijekom pet dana mjerenja (B), 50 μ M + 250 μ M u prvom danu (C), 50 μ M + 250 μ M tijekom pet dana mjerenja (D), 100 μ M + 500 μ M u prvom danu (E), 100 μ M + 500 μ M tijekom pet dana mjerenja (F).

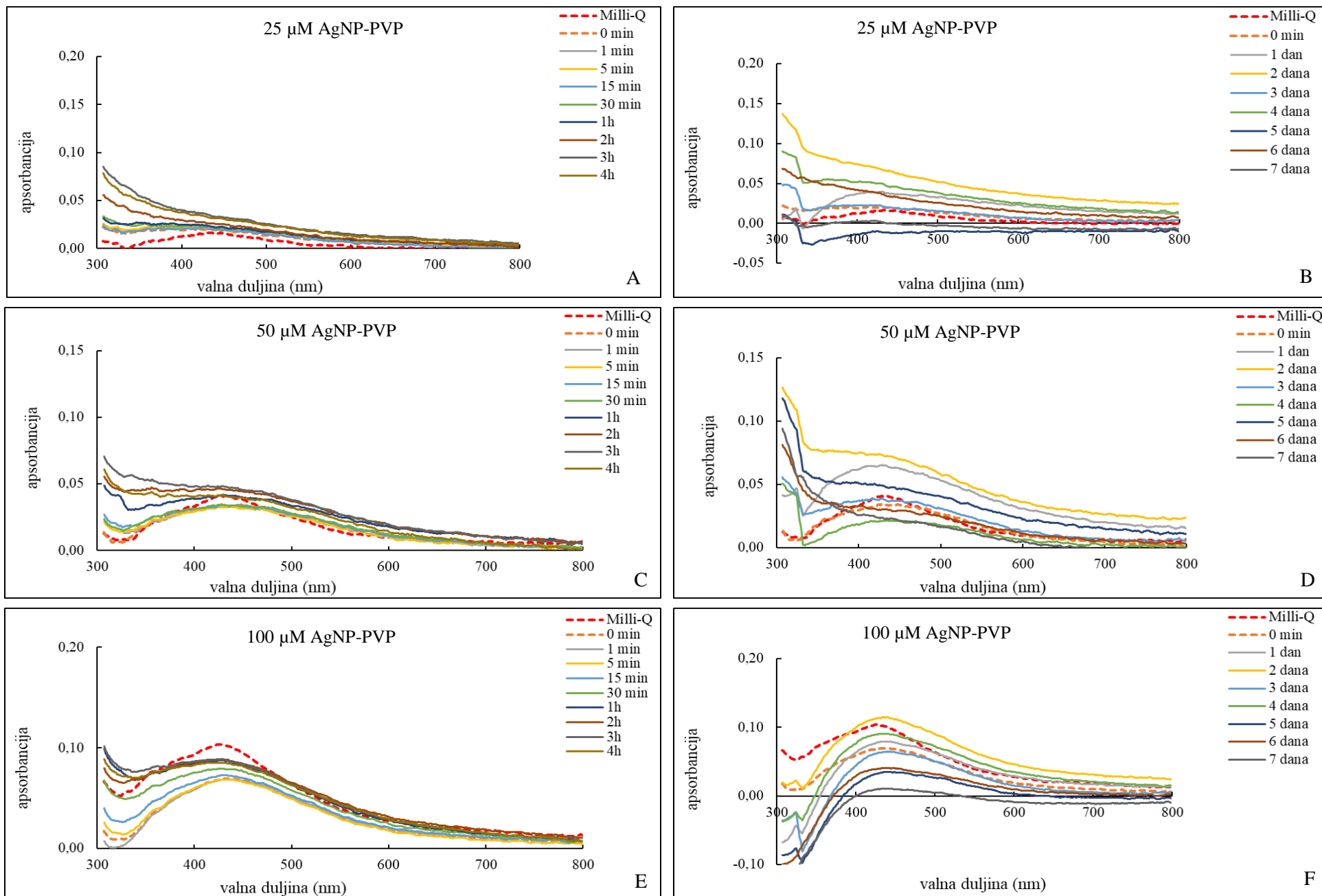
4.2.2. Spektrofotometrijsko mjerenje stabilnosti u tekućoj podlozi ½ MS

4.2.2.1. Spektar AgNP-PVP u tekućoj podlozi ½ MS

Apsorpcijski spektar AgNP-PVP na početku mjerenja pokazao je maksimum pri valnoj duljini od 428 nm, što u usporedbi s maksimumom spektra AgNP-PVP izmjenom u ultra-čistoj vodi (417 nm) ukazuje na djelomičnu aglomeraciju nanočestica odmah po dodatku u hranjivu podlogu (Slika 22A). Daljnja mjerenja utvrdila su nastanak manjih nanočestica uslijed disocijacije iona Ag^+ s površine AgNP-PVP, što je na spektru bilo vidljivo u pomaku apsorpcijskog maksimuma prema manjim valnim duljinama. Već nakon 30 minuta više nije bilo moguće izmjeriti apsorpcijski maksimum AgNP-PVP, što ukazuje na njihovu potpunu disocijaciju (Slika 22B).

Pri koncentraciji od 50 μM , maksimum apsorpcije AgNP-PVP na početku mjerenja nalazio se na 428 nm, jednako kao i maksimum apsorpcije izmjeren u ultra-čistoj vodi (Slika 22C). Ipak, spektar dobiven u hranjivoj podlozi bio je manjeg intenziteta te značajno širi. U 1. satu mjerenja nisu zabilježene promjene u položaju i intenzitetu apsorpcijskog maksimuma AgNP-PVP u podlozi. Nakon dva sata, maksimum se pomaknuo prema manjim valnim duljinama (409 nm) uz značajan porast apsorpcije, što odgovara disocijaciji iona Ag^+ i nastajanju manjih nanočestica, te je pri toj vrijednosti ostao pri svim mjerenjima toga dana. Sljedećeg dana apsorpcijski maksimum nalazio se na 427 nm, ukazujući na nastanak većih aglomerata nanočestica (Slika 22D). Slične vrijednosti zabilježene su i tijekom mjerenja 2., 3. i 4. dana. Nakon 5. dana nije bilo moguće detektirati apsorpcijski maksimum koji bi odgovarao AgNP u podlozi.

Usporedba apsorpcijskog spektra 100 μM AgNP-PVP u tekućoj podlozi i ultra-čistoj vodi u 0. minuti pokazala je mali pomak apsorpcijskog maksimuma prema većim valnim duljinama u podlozi (428 nm) u odnosu na vodu (424 nm) (Slika 22E) i njegovu smanjenu apsorpciju, što upućuje na djelomičnu aglomeraciju nanočestica. Tijekom 1. dana mjerenja nije došlo do značajnih promjena u poziciji i intenzitetu apsorpcijskog maksimuma, što ukazuje na dobru stabilnost AgNP-PVP u podlozi. Mjerenja tijekom sljedećih tjedan dana tek su u zadnjim danima pokazala dodatan pomak apsorpcijskog maksimuma prema većim valnim duljinama, što je uz postepeni pad apsorpcije ukazalo na aglomeraciju AgNP-PVP u podlozi (Slika 22F).



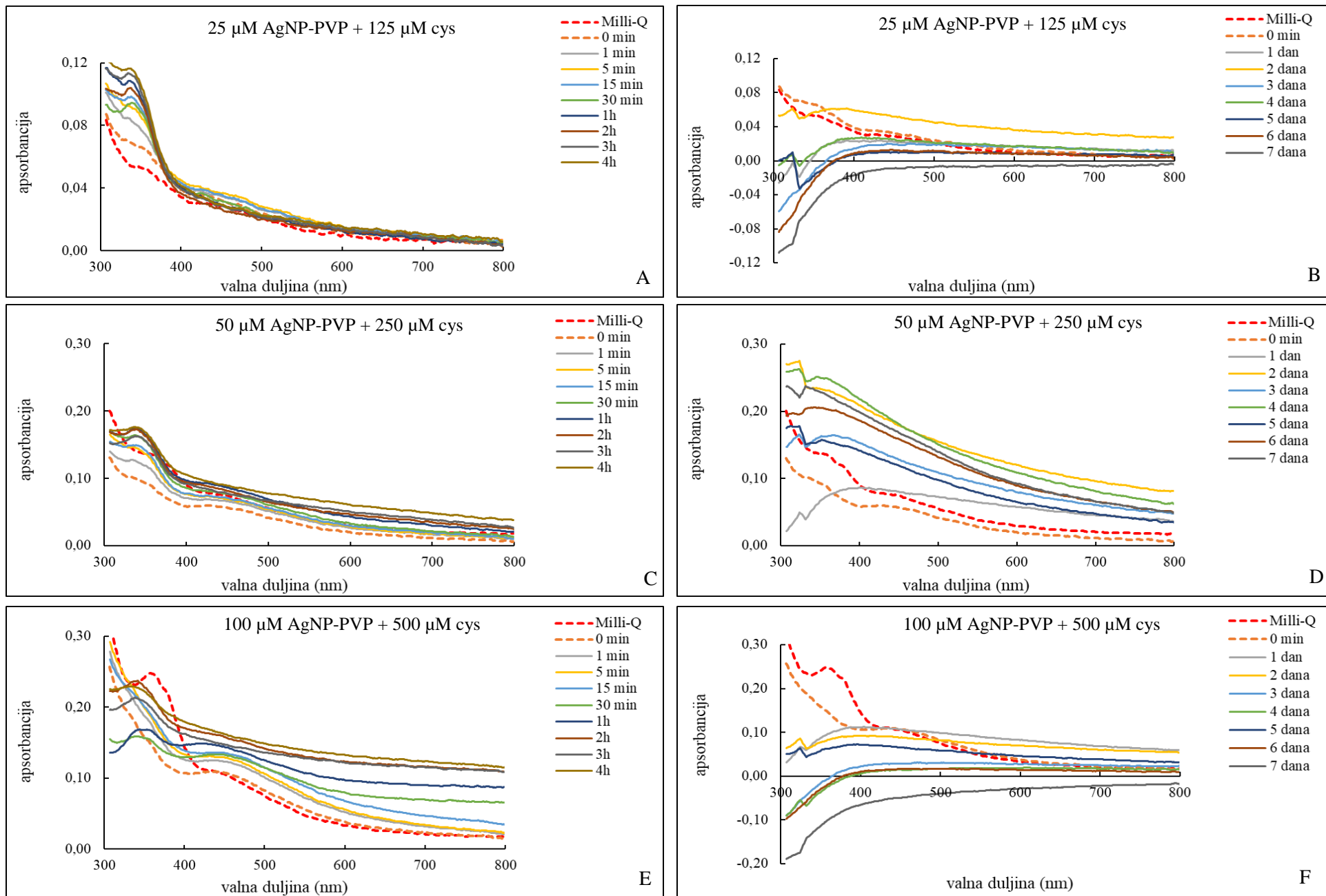
Slika 22. Apsorpcijski spektar AgNP-PVP u tekućoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS: 25 μM u prvom danu (A), 25 μM tijekom 7 dana mjerenja (B), 50 μM u prvom danu (C), 50 μM tijekom 7 dana mjerenja (D), 100 μM u prvom danu (E), 100 μM tijekom 7 dana mjerenja (F).

4.2.2.2. Spektar AgNP-PVP u tekućoj podlozi ½ MS uz dodatak cisteina

Dodatkom 125 µM cisteina u podlogu s 25 µM AgNP-PVP nije došlo do stvaranja apsorpcijskog maksimuma pri 400 nm očekivanog za AgNP-PVP, a isti nije zabilježen ni u istoj kombinaciji u ultra-čistoj vodi (Slika 23A). Ipak, već u 0. minuti javio se maksimum na valnoj duljini od 380 nm koji bi mogao predstavljati sitne nanočestice nastale uslijed brze disocijacije iona Ag⁺ s površine AgNP-PVP. Tijekom sljedećih mjerenja u 1. danu, maksimum apsorpcije pomaknuo se prema 360 nm uz značajan porast apsorpcije, što ukazuje na dodatno stvaranje manjih nanočestica u podlozi. Nakon 24 sata više nije bilo moguće detektirati apsorpcijski maksimum uslijed potpune disocijacije AgNP-PVP uzrokovane dodatkom cisteina (Slika 23B).

Mjerenje spektra 50 µM AgNP-PVP u kombinaciji s 250 µM cisteinom pokazalo je apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 380 nm prisutan od 0. minute, u ultra-čistoj vodi i tekućoj podlozi, što odgovara nanočesticama malih dimenzija (Slika 23C). I dok je mjerenje spektra u podlozi ukazalo na dodatan maksimum pri otprilike 415 nm, koji odgovara maksimumu AgNP-PVP dimenzija oko 40 nm, isti nije zabilježeno u vodi, gdje je već u 0. minuti došlo do potpune disocijacije nanočestica. Nastavkom mjerenja stabilnosti zabilježeno je postupno smanjenje intenziteta maksimuma koji se nalazio na 415 nm, dok se intenzitet maksimuma koji odgovara manjim nanočesticama značajno pojačao, a izmjeren je i postupni pomak maksimuma prema manjim valnim duljinama. Mjerenje spektra u sljedećim danima pokazalo je postupno smanjenje intenziteta apsorpcijskog maksimuma koje upućuje na potpunu disocijaciju AgNP-PVP (Slika 23D).

Za razliku od nižih koncentracija, spektar 100 µM AgNP-PVP uz dodatak 500 µM cisteina značajno se razlikovao u ultra-čistoj vodi i tekućoj podlozi u početku mjerenja (Slika 23E). Dok se u ultra-čistoj vodi maksimum apsorpcije formirao na 354 nm, ukazujući na značajnu disocijaciju Ag⁺ iona s površine AgNP-PVP, u tekućoj podlozi su nanočestice pokazale veću stabilnost te se maksimum nalazio na 427 nm. Ipak, nakon 30 minuta i u podlozi je započela snažnija disocijacija koja je dovela do stvaranja sekundarnog maksimuma na 360 nm. Tijekom sljedeća četiri sata, intenzitet sekundarnog maksimuma se pojačavao uz postupni nestanak primarnog maksimuma. Nakon 1. dana mjerenja više nije bilo moguće detektirati maksimum apsorpcije izmjerenih spektara, ukazujući na potpuni raspad AgNP-PVP uzrokovan dodatkom cisteina (Slika 23F).



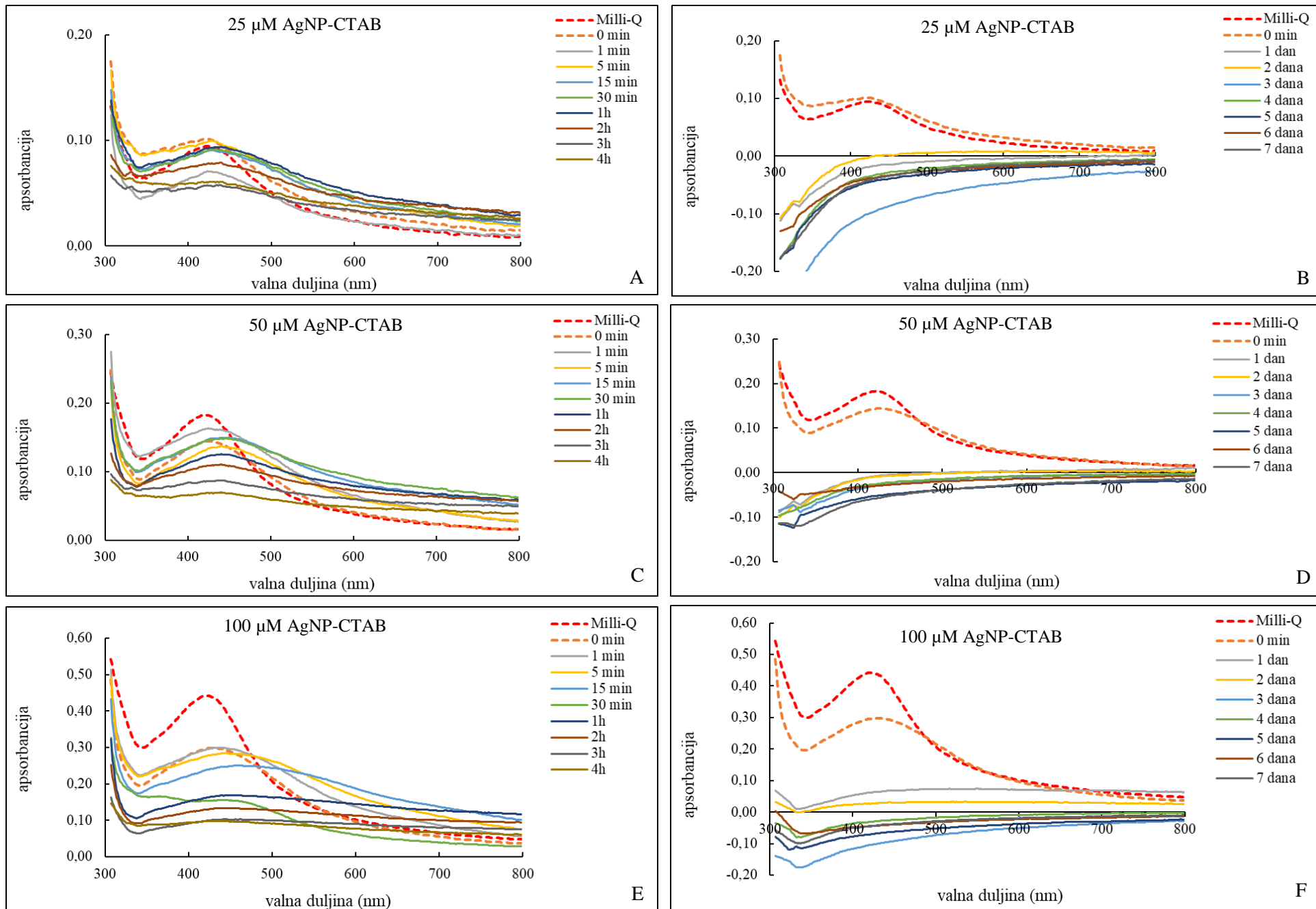
Slika 23. Apsorpcijski spektar kombinacije AgNP-PVP i cisteina (cys) u tekućoj podlozi ½ MS: 25 μM + 125 μM u prvom danu (A), 25 μM + 125 μM tijekom 7 dana mjerenja (B), 50 μM + 250 μM u prvom danu (C), 50 μM + 250 μM tijekom 7 dana mjerenja (D), 100 μM + 500 μM u prvom danu (E), 100 μM + 500 μM tijekom 7 dana mjerenja (F).

4.2.2.3. Spektar AgNP-CTAB u tekućoj podlozi ½ MS

Spektar 25 μM AgNP-CTAB na početku mjerenja nije pokazao velike razlike između maksimuma izmjerenog u ultra-čistoj vodi i tekućoj podlozi, koji se nalazio na 423 nm (Slika 24A). Ipak, spektar snimljen u podlozi bio je manje oštar, što je ukazivalo na širu distribuciju veličina nanočestica. U 1. satu mjerenja nisu zabilježene značajne promjene u položaju maksimuma, ali se njegov intenzitet smanjivao i gubio oštrinu. Nakon jednog sata izmjereni pomak maksimuma na 434 nm ukazao je na aglomeraciju nanočestica u podlozi koja se nastavila i tijekom sljedećih sati. Spektar izmjeren nakon 24 sata nije ukazao na postojanje AgNP-CTAB u podlozi, vjerojatno uslijed potpune aglomeracije i taloženja, bez značajnih razlika u mjerenjima tijekom sljedećih 7 dana (Slika 24B).

Maksimum apsorpcije 50 μM AgNP-CTAB nalazio se na valnoj duljini od 418 nm na spektru snimljenom u ultra-čistoj vodi i tekućoj podlozi u 0. minuti (Slika 24C), iako je i ovdje maksimum snimljen u podlozi bio manjeg intenziteta i oštrine u odnosu na onaj u vodi. Početak mjerenja ukazao je na značajnu aglomeraciju nanočestica u podlozi, pri čemu je u 30. minuti maksimum apsorpcije izmjeren na 445 nm. Mjerenja koja su uslijedila pokazala su pomak maksimuma prema manjim valnim duljinama, praćen smanjenjem intenziteta, što je označilo postepenu disocijaciju iona Ag^+ koja se nastavila tijekom svih mjerenja prvog dana. Mjerenja napravljena tijekom sljedećih 7 dana nisu pokazala postojanje nanočestica u podlozi (Slika 24D).

Na početku mjerenja, apsorpcijski maksimumi 100 μM AgNP-CTAB izmjereni u ultra-čistoj vodi i podlozi nalazili su se na istom položaju, pri valnoj duljini od 420 nm (Slika 24E). I u ovom slučaju, maksimum mjeren u ultra-čistoj vodi bio je oštiji i jačeg intenziteta u odnosu na maksimum izmjeren u podlozi, gdje je ubrzo započela aglomeracija AgNP-CTAB, uslijed čega je maksimum apsorpcije pomaknut na 450 nm nakon 1. sata mjerenja. Aglomeracija, praćena značajnim smanjenjem intenziteta maksimuma, nastavila se i tijekom mjerenja u sljedećim satima. Nakon 24 sata više nije bilo moguće detektirati postojanje nanočestica u podlozi, što ukazuje na njihovu potpunu aglomeraciju i taloženje (Slika 24F).



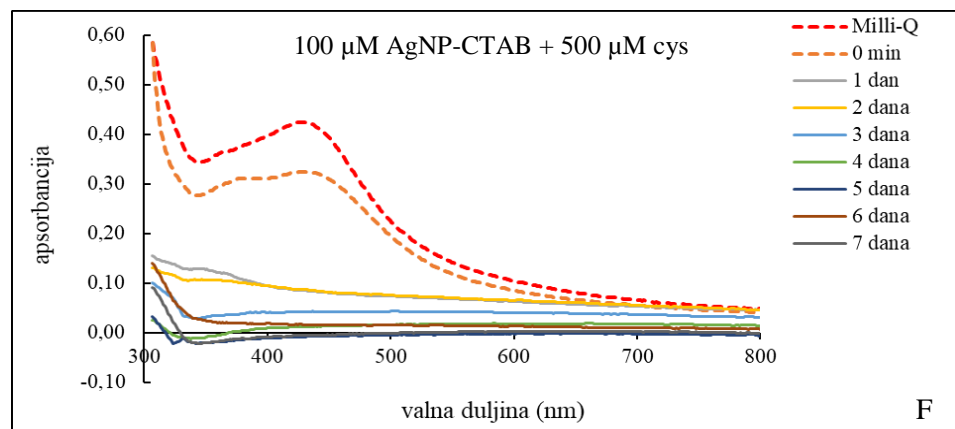
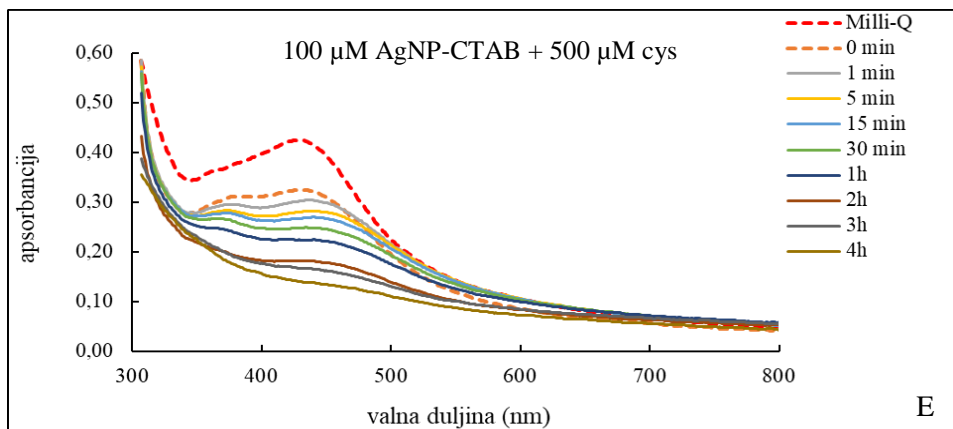
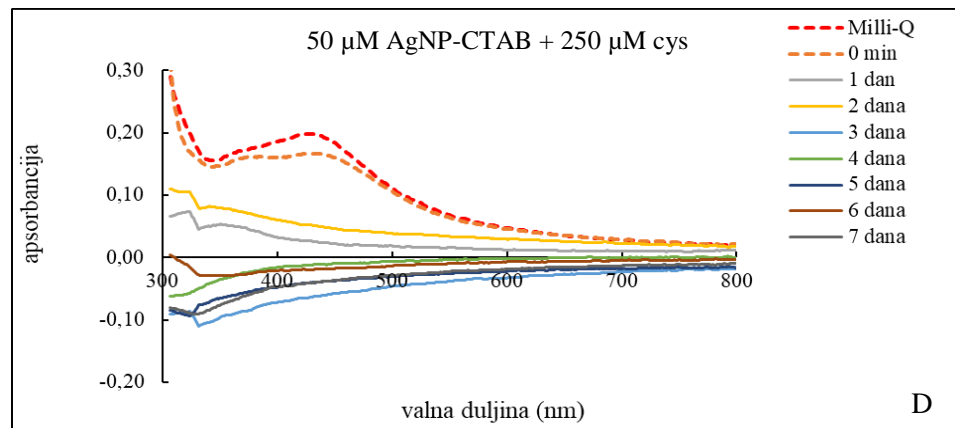
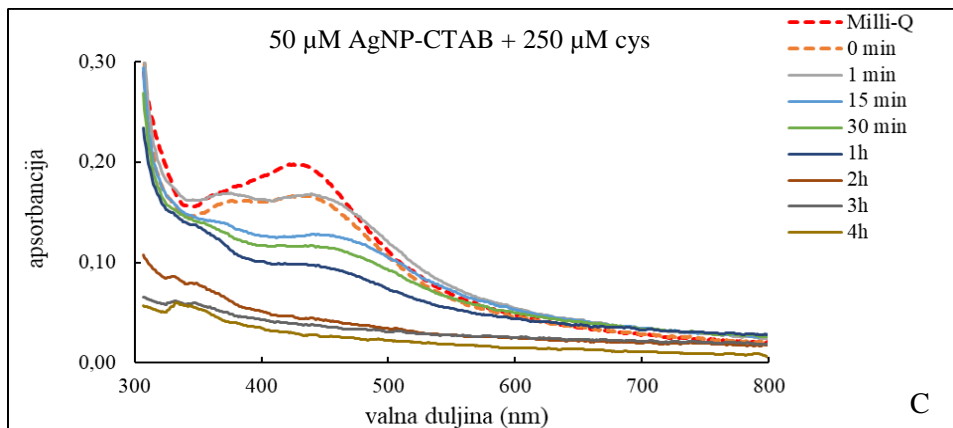
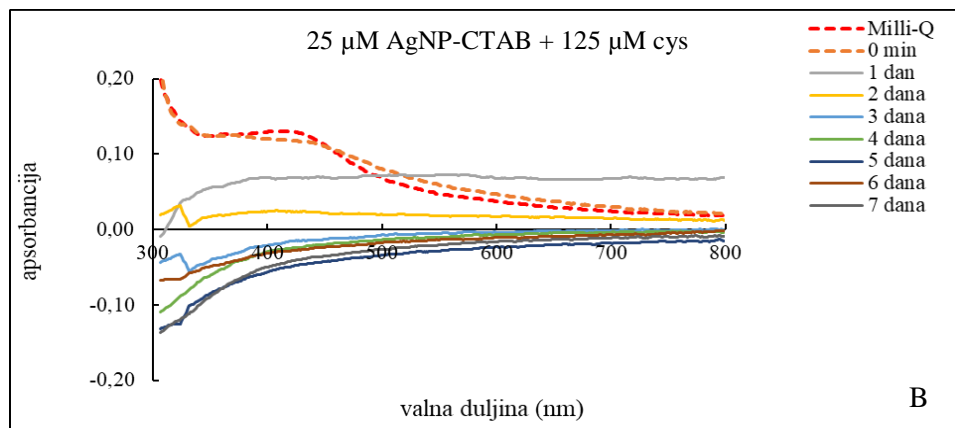
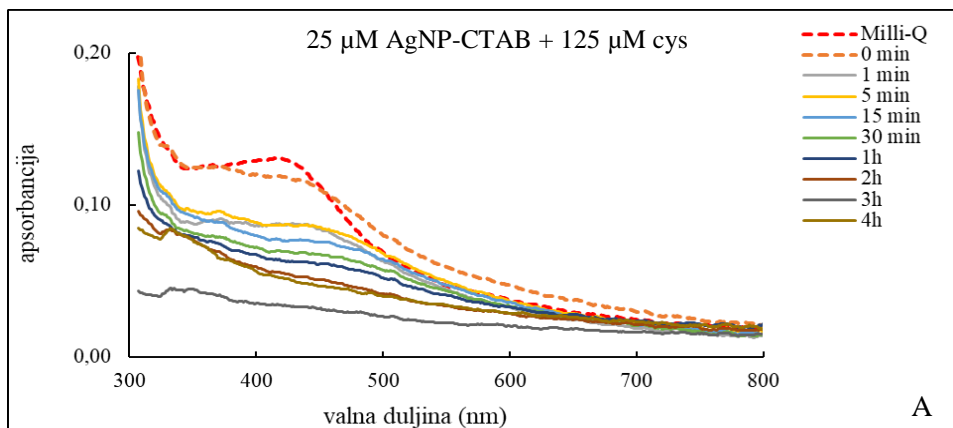
Slika 24. Apsorpcijski spektar AgNP-CTAB u tekućoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS: 25 μM u prvom danu (A), 25 μM tijekom 7 dana mjerenja (B), 50 μM u prvom danu (C), 50 μM tijekom 7 dana mjerenja (D), 100 μM u prvom danu (E), 100 μM tijekom 7 dana mjerenja (F).

4.2.2.4. Stabilnost AgNP-CTAB u tekućoj podlozi ½ MS uz dodatak cisteina

Apsorpcijski spektar 25 µM AgNP-CTAB uz dodatak 125 µM cisteina pokazao je maksimum na valnoj duljini od 414 nm nakon mjerenja u ultra-čistoj vodi. Spektar iste kombinacije u podlozi značajno se razlikovao, te u 0. minuti nije postojao jasan maksimum koji bi ukazivao na postojanje nanočestica, sugerirajući na njihovu potpunu disocijaciju (Slika 25A). Ostala mjerenja tijekom prvog dana, kao i sljedećih 7 dana, nisu dovela do značajnih promjena (Slika 25B).

Apsorpcijski spektar 50 µM AgNP-CTAB u ultra-čistoj vodi nakon dodatka 250 µM cisteina pokazao je maksimum pri 425 nm (Slika 25C). Ista kombinacija mjerena u podlozi pokazala je stvaranje primarnog (435 nm) i sekundarnog (380 nm) maksimuma već od 0. minute, koji su ukazali na simultanu aglomeraciju i disocijaciju nanočestica manjih dimenzija u podlozi. Intenzitet primarnog maksimuma s vremenom je slabio uz značajno pomicanje prema većim valnim duljinama, ukazujući na daljnju aglomeraciju AgNP-CTAB, a položaj sekundarnog maksimuma ukazao je na raspad manjih nanočestica nakon 1. sata mjerenja. Nakon 2. sata mjerenja više nije bilo moguće detektirati maksimum apsorbancije koji bi ukazao na postojanje nanočestica u podlozi (Slika 25D).

Slično kao i kod prethodne koncentracije, mjerenje spektra 100 µM AgNP-CTAB nakon dodatka 500 µM cisteina u ultra-čistoj vodi pokazalo je postojanje jednog maksimuma na 430 nm, dok je u tekućoj podlozi izmjereno stvaranje primarnog (435 nm) i sekundarnog (380 nm) maksimuma već od 1. minute (Slika 25E). Intenzitet oba maksimuma s vremenom je slabio, a postupni pomak primarnog maksimuma prema većim valnim duljinama ukazao je na značajnu aglomeraciju u podlozi tijekom prva tri sata mjerenja. Mjerenja tijekom sljedećih 7 dana ukazala su na potpunu aglomeraciju AgNP-CTAB u podlozi pod utjecajem cisteina (Slika 25F).



Slika 25. Apsorpcijski spektar kombinacije AgNP-CTAB i cisteina (cys) u tekućoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS: 25 μM + 125 μM u prvom danu (A), 25 μM + 125 μM tijekom 7 dana mjerenja (B), 50 μM + 250 μM u prvom danu (C), 50 μM + 250 μM tijekom 7 dana mjerenja (D), 100 μM + 500 μM u prvom danu (E), 100 μM + 500 μM tijekom 7 dana mjerenja (F).

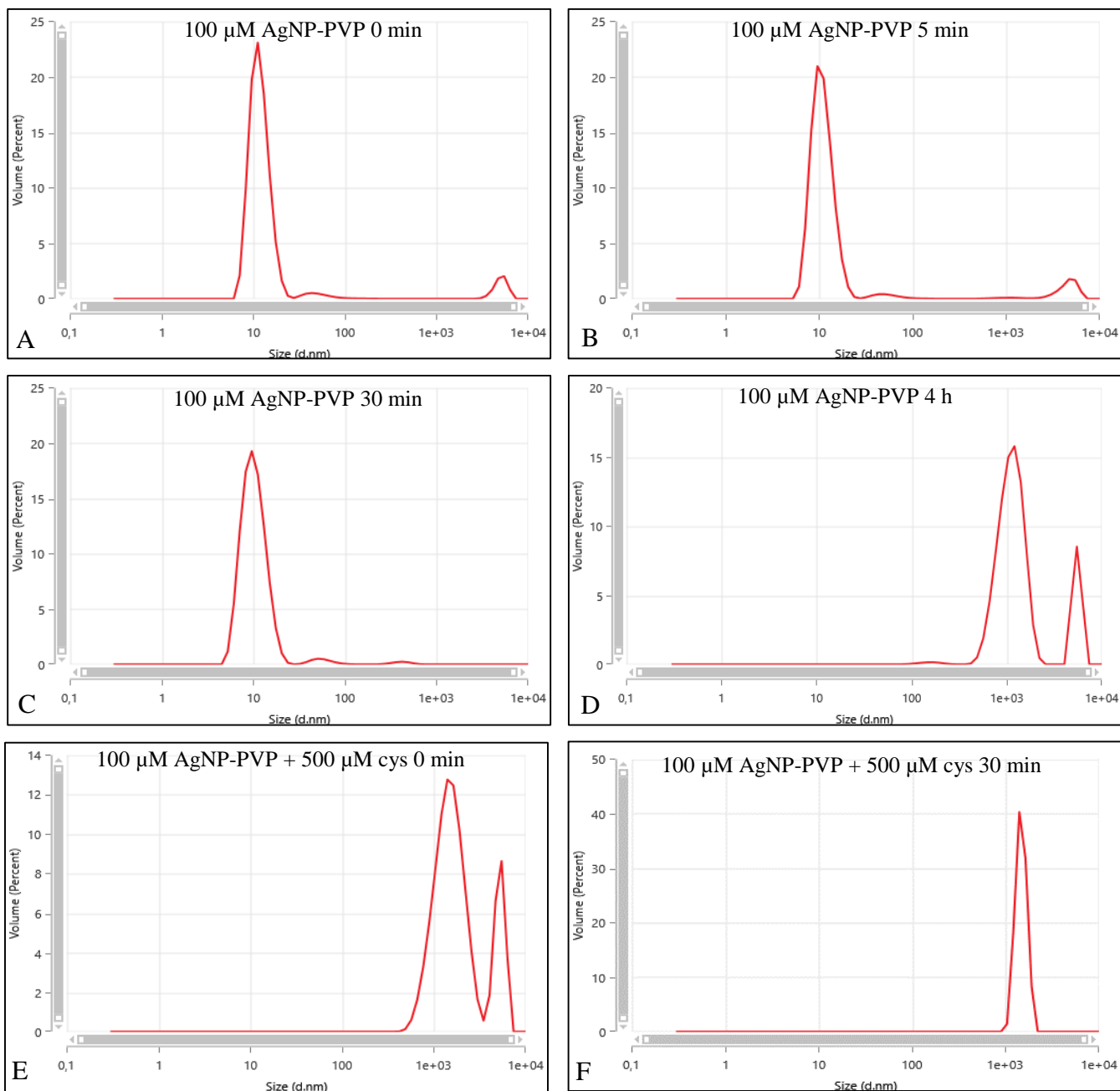
4.2.3. Mjerenje stabilnosti u tekućoj podlozi ½ MS praćenjem promjena veličine i naboja

Promjene veličine i naboja AgNP-PVP i AgNP-CTAB, samih ili u kombinaciji s cisteinom, mjerila sam za najveće koncentracije tretmana (100 µM AgNP + 500 µM cistein) u tekućoj podlozi ½ MS, koje su spektrofotometrijskim mjerenjima pokazale najznačajnije promjene. Uz to, snimljeni spektri ukazali su na to da se najveće promjene u stabilnosti oba tipa AgNP zbivaju tijekom prvih sati mjerenja, pa su prema tome izabrane točke za mjerenje promjena d_H i ζ potencijala.

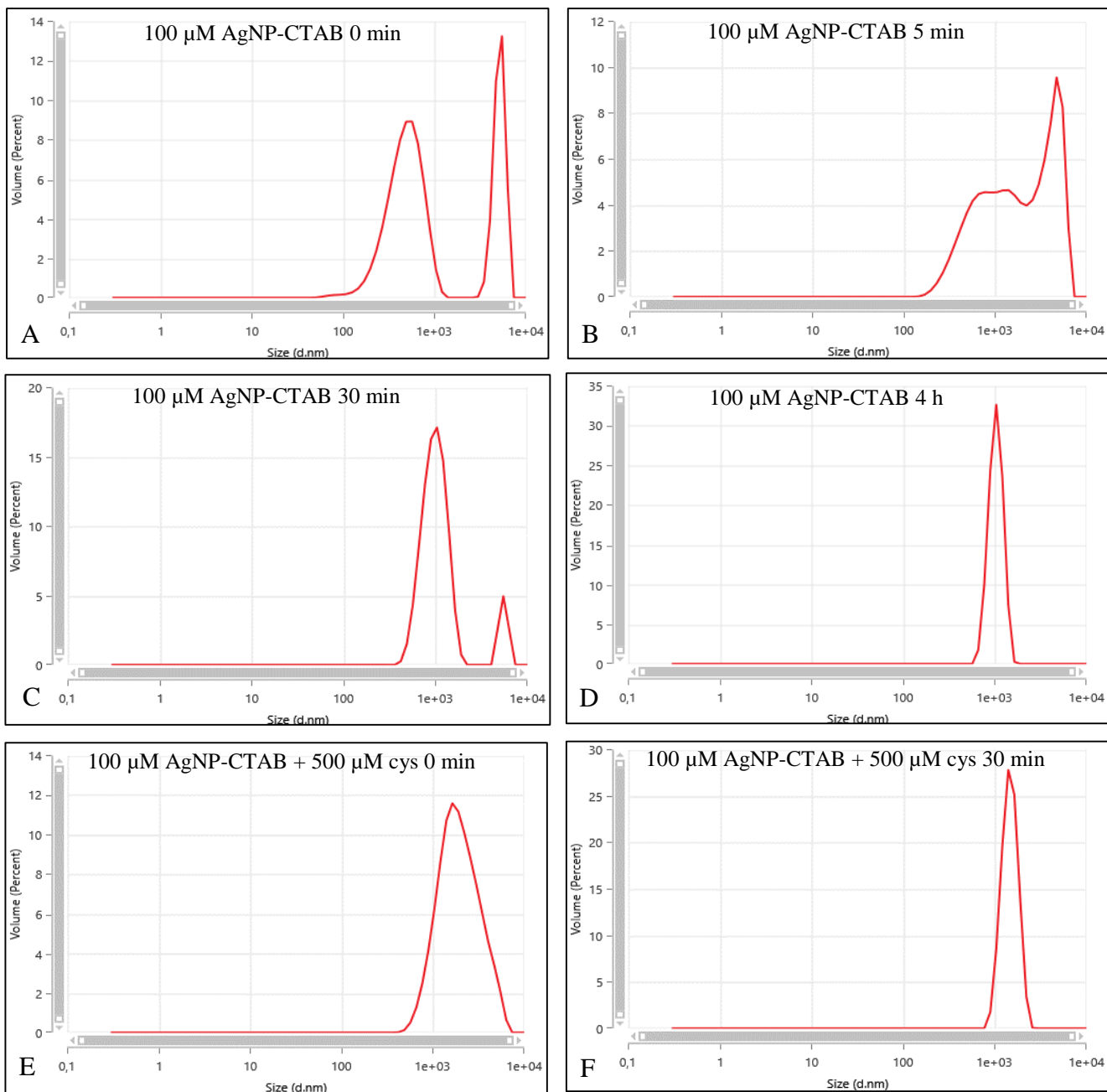
4.2.3.1. Promjene hidrodinamičkog promjera

Mjerenje d_H AgNP-PVP pokazalo je njihovu stabilnost u tekućoj podlozi ½ MS tijekom prvih 30 minuta mjerenja, gdje je izmjereni promjer čestica bio oko 50 nm (Slika 26A-C, Tablica 9). Pritom su zabilježene i manje populacije čestica od 10 nm koje vjerojatno predstavljaju miclele omotača PVP, ali i populacije veličine oko 5000 nm koje pokazuju djelomičnu aglomeraciju AgNP-PVP u podlozi. Nakon četiri sata, u podlozi ½ MS prevladavali su manji i veći aglomerati nanočestica dimenzija od 162 do 5457 nm, ukazujući na značajnu destabilizaciju AgNP-PVP (Slika 26D). Dodatak cisteina već je u 0. minuti izazvao značajnu aglomeraciju AgNP-PVP, pri čemu je većina čestica pokazivala d_H od oko 1300 nm (Slika 26E), a sličan je trend zabilježen i nakon 30 minuta (Slika 26F, Tablica 9).

Mjerenje d_H AgNP-CTAB pokazalo je brzu destabilizaciju nanočestica odmah po dodatku u podlogu ½ MS te je zabilježeno postojanje dvije populacije većih aglomerata čiji je promjer u prosjeku iznosio 480, odnosno 5066 nm (Slika 27A, Tablica 9). Daljnja mjerenja pokazala su dodatnu aglomeraciju i povećanje promjera detektiranih čestica prve populacije, dok se veličina druge populacije s vremenom smanjila (Slika 27B i C), da bi nakon četiri sata mjerenja sve izmjerene čestice imale d_H oko 1012 nm (Slika 27D). Dodatak cisteina značajno je ubrzao aglomeraciju AgNP-CTAB u ½ MS podlozi, te je u 0. minuti zabilježeno postojanje dvije populacije aglomerata veličina 1688 i 4500 nm (Slika 27E). Nakon 30 minuta sve su čestice imale d_H vrijednosti oko 1250 nm (Slika 27F, Tablica 9).



Slika 26. Promjena hidrodinamičkog promjera 100 μM AgNP-PVP u tekućoj podlozi ½ MS dobivena iz omjera distribucije po volumenu u početku mjerenja (A), nakon 5 minuta (B), 30 minuta (C) i četiri sata (D) te nakon dodatka 500 μM cisteina (cys) u početku mjerenja (E) i nakon 30 minuta (F).



Slika 27. Promjena hidrodinamičkog promjera 100 μM AgNP-CTAB u tekućoj podlozi ½ MS dobivena iz omjera distribucije po volumenu u početku mjerenja (A), nakon 5 minuta (B), 30 minuta (C) i četiri sata (D) te nakon dodatka 500 μM cisteina (cys) u početku mjerenja (E) i nakon 30 minuta (F).

Tablica 9. Promjene veličine 100 μM AgNP-PVP i AgNP-CTAB, samih i u kombinaciji s 500 μM cisteinom (cys) u tekućoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS izmjerene metodom DLS i prikazane kao hidrodinamički promjer dobiven iz omjera distribucije po volumenu.

		AgNP-PVP				AgNP-PVP + cys	
		0 min	5 min	30 min	4 h	0 min	30 min
Pik I	d_H , nm	10,15 \pm 1,50	10,91 \pm 0,98	10,36 \pm 1,15	162,2 \pm 64,0	1358,40 \pm 573,58	971,00 \pm 0,00
	volumni udio, %	95,06 \pm 3,14	92,84 \pm 5,34	94,04 \pm 3,82	0,7 \pm 0,3	84,76 \pm 16,04	100,00 \pm 0,00
Pik II	d_H , nm	47,83 \pm 7,05	56,53 \pm 3,16	51,78 \pm 6,87	1256,0 \pm 101,1	5243,33 \pm 211,97	1460,00 \pm 28,28
	volumni udio, %	1,97 \pm 1,84	1,47 \pm 1,38	3,40 \pm 1,02	77,6 \pm 10,3	15,24 \pm 16,04	100,00 \pm 0,00
Pik III	d_H , nm	5083,33 \pm 257,75	4507,50 \pm 625,27	413,60 \pm 174,88	5457,8 \pm 72,4	/	2590,00 \pm 197,99
	volumni udio, %	2,74 \pm 2,97	5,40 \pm 4,28	1,02 \pm 0,67	19,6 \pm 13,7	/	100,00 \pm 0,00
		AgNP-CTAB				AgNP-CTAB + cys	
Pik I	d_H , nm	479,60 \pm 113,33	640,00 \pm 48,07	1020,40 \pm 183,66	1012,20 \pm 210,84	1688,00 \pm 375,66	1250,00 \pm 181,38
	volumni udio, %	58,42 \pm 14,37	51,50 \pm 21,02	86,92 \pm 15,47	100,00 \pm 0,00	95,20 \pm 10,51	100,00 \pm 0,00
Pik II	d_H , nm	5066,00 \pm 91,27	911,00 \pm 113,14	5356,67 \pm 156,31	/	4500,00 \pm 0,00	/
	volumni udio, %	41,58 \pm 14,37	72,15 \pm 16,76	13,07 \pm 15,47	/	4,72 \pm 10,55	/
Pik III	d_H , nm	/	1450,00 \pm 0,00	/	/	/	/
	volumni udio, %	/	9,47 \pm 16,40	/	/	/	/
Pik IV	d_H , nm	/	4928,00 \pm 474,20	/	/	/	/
	volumni udio, %	/	34,46 \pm 11,32	/	/	/	/

4.2.3.2. Promjene ζ potencijala

Mjerenje ζ potencijala AgNP-PVP pokazalo je pojavu blago negativnog površinskog naboja koji se nije značajno mijenjao s vremenom, nastao vjerojatno uslijed interakcije s ionima prisutnima u tekućoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS (Tablica 10.).

I kod AgNP-CTAB, koje su u matičnoj otopini imale pozitivan površinski naboj, također je izmjerena pojava negativnog ζ potencijala nakon dodatka u podlogu $\frac{1}{2}$ MS (Tablica 10). Negativan površinski naboj, zajedno sa snažnom aglomeracijom koja je prethodno izmjerena, ukazuje na mogućnost otpuštanja molekula CTAB s površine nanočestica koja je dovela do njihove destabilizacije.

Tablica 10. Promjena ζ potencijala 100 μ M AgNP-PVP i AgNP-CTAB u tekućoj $\frac{1}{2}$ MS podlozi u periodu od četiri sata.

	AgNP-PVP / mV	AgNP-CTAB / mV
0 min	-11,20 \pm 0,80	-7,00 \pm 2,70
5 min	-8,70 \pm 1,37	-4,90 \pm 0,50
30 min	-12,73 \pm 0,23	-5,30 \pm 2,40
4 h	-12,13 \pm 0,65	-5,20 \pm 0,50

4.3. Mjerenje parametara iskljavanja

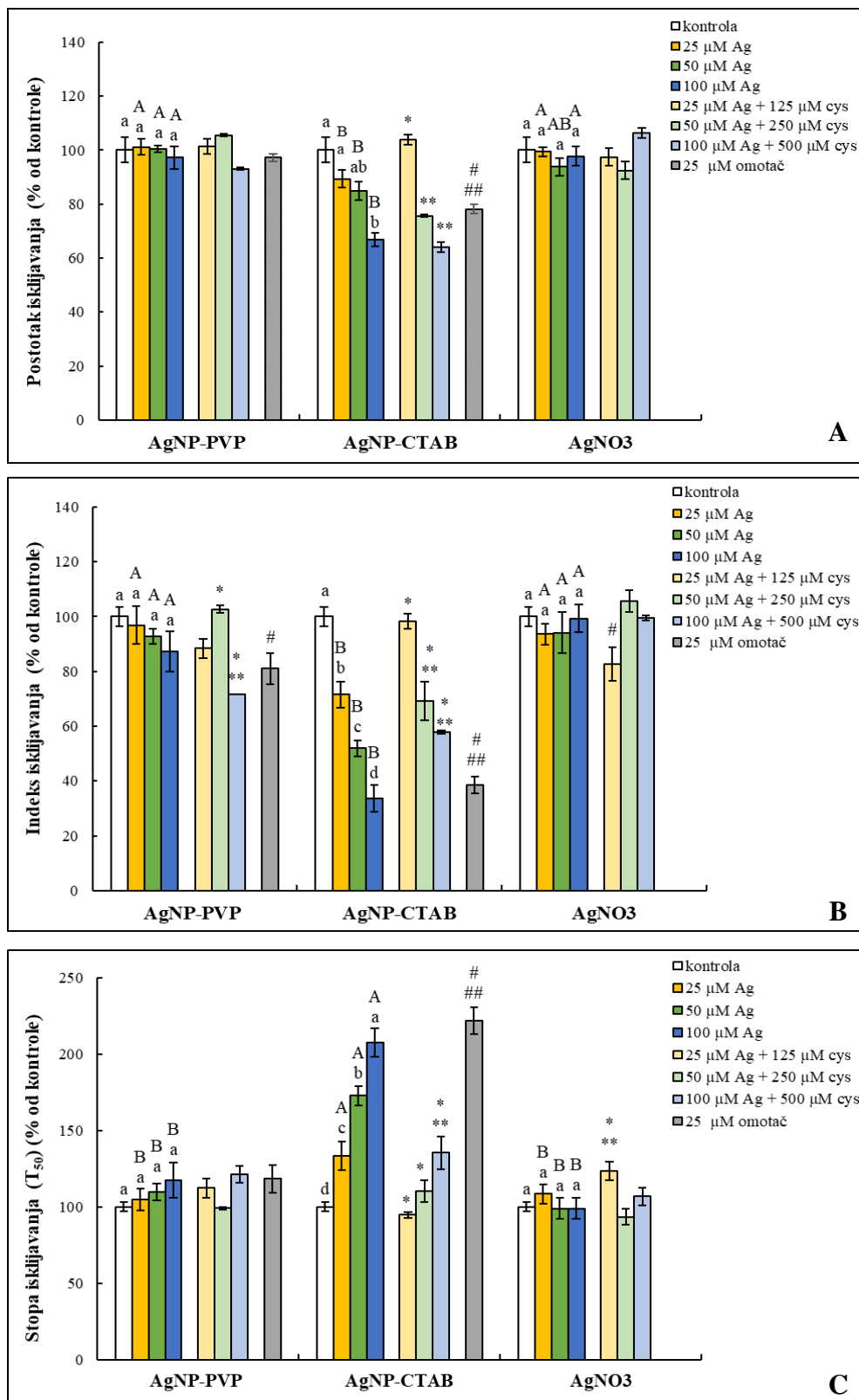
Kako bih utvrdila utjecaj AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ i njihove kombinacije s cisteinom, kao i utjecaj samih omotača PVP i CTAB na iskljavanje sjemenki duhana, pratila sam tri različita parametra: postotak, indeks i stopu iskljavanja.

Ukupan postotak iskljavanja duhana pokazao je značajnu ovisnost o tipu tretmana (F = 13,14, p < 0,001), ali ne i o primijenjenoj dozi. Iako je tretman s AgNP-CTAB uzrokovao smanjenje postotka iskljavanja pri svim koncentracijama, statistički značajna inhibicija zabilježena je samo pri tretmanu sa 100 μ M AgNP-CTAB, koji je izazvao smanjenje od 40% (Slika 28A). Dodatak cisteina značajno je umanjio utjecaj AgNP-CTAB samo pri 25 μ M koncentraciji. Osim toga, sam omotač CTAB također je značajno umanjio postotak iskljavanja duhana.

Usporedba različitih tretmana jednakih koncentracija dodatno je potvrdila ovisnost postotka iskljavanja o primijenjenom tretmanu; tretman s AgNP-CTAB imao jači utjecaj na smanjenje klijavosti sjemenki duhana u usporedbi s AgNP-PVP i gotovo svim koncentracijama AgNO₃, gdje je zabilježena sličnost samo pri koncentraciji od 50 µM.

Indeks iskljavanja sjemenki duhana pokazao je ovisnost o koncentraciji ($F = 4,92$, $p < 0,05$) i tipu primijenjenog tretmana ($F = 58,99$, $p < 0,001$). Značajno smanjenje indeksa iskljavanja ovisno o koncentraciji izmjereno je pri tretmanima s AgNP-CTAB, kao i sa samim omotačem CTAB u odnosu na kontrolu, ukazujući na smanjenje brzine iskljavanja (Slika 28B). Dodatak cisteina značajno je umanjio utjecaj AgNP-CTAB pri svim ispitanim koncentracijama, ali samo pri najnižoj koncentraciji (25 µM) je vrijednost približio vrijednosti kontrole. Tretmani s AgNP-PVP i AgNO₃ istih koncentracija nisu pokazali značajne utjecaje na indeks iskljavanja duhana, dok je primjena omotača PVP uzrokovala inhibiciju indeksa iskljavanja, koja je ipak bila značajno slabija u odnosu na omotač CTAB.

Stopa iskljavanja prikazana u obliku vrijednosti T₅₀ pokazala je značajnu ovisnost o primijenjenoj koncentraciji ($F = 8,25$, $p < 0,005$) i tretmanu ($F = 70,04$, $p < 0,001$). Mjerenje je pokazalo značajne promjene vrijednosti T₅₀ samo pri tretmanu s AgNP-CTAB (Slika 28C), gdje je zabilježen porast ovisan o povećanju koncentracije tretmana, dodatno ukazujući na negativan utjecaj AgNP-CTAB na brzinu i postotak iskljavanja. Značajno povećanje T₅₀ izmjereno je i pri tretmanu s omotačem CTAB, gdje su dobivene vrijednosti bile slične kao kod najveće koncentracije tretmana AgNP-CTAB. Dodatak cisteina značajno je umanjio negativan utjecaj AgNP-CTAB na stopu iskljavanja; na tretmanima sa 25 i 50 µM AgNP-CTAB vrijednosti T₅₀ nisu se značajno razlikovale od vrijednosti izmjerenih na kontroli, dok pri koncentraciji od 100 µM to smanjenje, iako značajno, nije bilo potpuno. Vrijednosti T₅₀ izračunate na tretmanima s AgNP-PVP i AgNO₃ nisu se značajno razlikovale od kontrole, niti između njih međusobno.



Slika 28. Postotak (A), indeks (B) i stopa iskljavanja (C) sjemenki duhana nakon 5 dana klijanja na krutoj podlozi ½ MS uz dodatak 25, 50 i 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, njihove kombinacije sa 125, 250 and i 500 μM cisteinom (cys) te 25 μM omotačima PVP i CTAB. Rezultati prikazuju srednju vrijednost od ukupno 300 sjemenki ± standardna pogreška. Upotreba različitih slova označava značajne razlike ($p \leq 0,05$, dvosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test) između različitih koncentracija istog tretmana (mala slova) i različitih tretmana istih koncentracija (velika slova). Zvezdica (*) označava značajnu razliku između tretmana sa i bez cisteina pri jednakoj koncentraciji tretmana, dvostruke zvezdice (**) označavaju značajnu razliku između tretmana s cisteinom i kontrole. Ljestve (#) označavaju značajnu razliku između tretmana s omotačima (PVP i CTAB) i kontrole, a dvostruke ljestve (##) označavaju razliku između različitih omotača.

4.4. Rani rast klijanaca

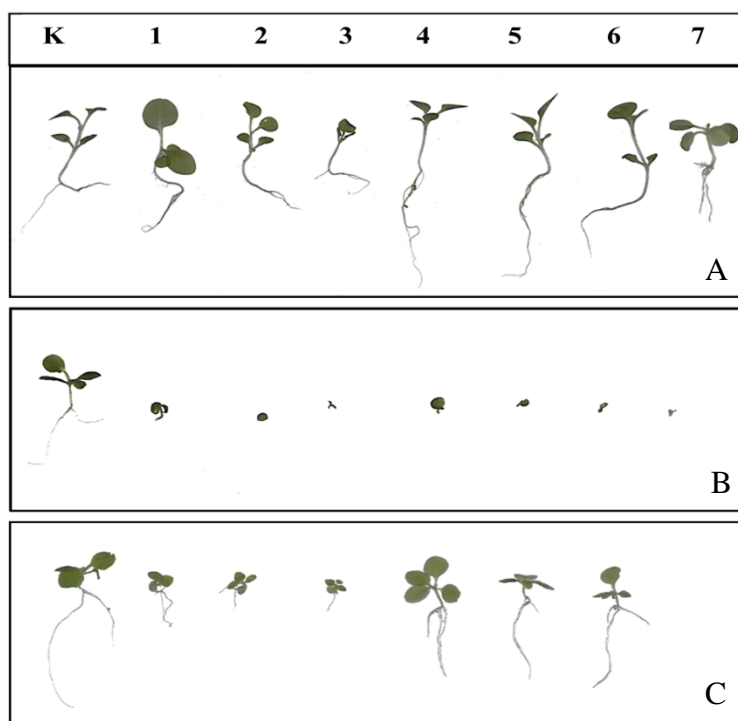
Rani rast klijanaca duhana tretiranih s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, njihove kombinacije s cisteinom, te samim omotačima PVP i CTAB pratila sam mjerenjem duljine korjenčića te svježe i suhe mase klijanaca.

Na smanjenje duljine korjenčića utjecali su i koncentracija ($F = 98,62$, $p < 0,0001$) i tip tretmana ($F = 225,09$, $p < 0,0001$). Oba tipa AgNP te AgNO₃ doveli su do smanjenja duljine korjenčića u odnosu na kontrolu (Slika 29, Slika 30A), koje je u tretmanu s AgNP-CTAB bilo značajno jače u usporedbi s istim koncentracijama AgNP-PVP i AgNO₃, dovodeći do potpune inhibicije rasta korijena pri 100 μM koncentraciji. AgNP-CTAB i AgNO₃ negativno su utjecali na rast korjenčića već od 25 μM koncentracije, dok je jednaka koncentracija AgNP-PVP dovela do suprotnog učinka, uzrokujući značajno povećanje duljine korjenčića duhana. Osim toga, dodatak cisteina tretmanima s AgNP-PVP nije samo umanjio negativan utjecaj koji je zabilježen pri 50 i 100 μM koncentraciji, nego je doveo i do značajnog povećanja duljine korjenčića u odnosu na kontrolu. Dodatak cisteina značajno je umanjio negativan utjecaj 25 i 100 μM AgNO₃, ali na tretmanima s AgNP-CTAB nije doveo do značajnih razlika u odnosu na tretmane sa samim nanočesticama. Dapače, pri 25 i 50 μM koncentraciji, dodatak cisteina dodatno je pojačao negativan utjecaj AgNP-CTAB. Tretman omotačima PVP i CTAB također je uzrokovao smanjenje duljine korjenčića u odnosu na kontrolu, pri čemu je CTAB imao značajno jači utjecaj u odnosu na PVP.

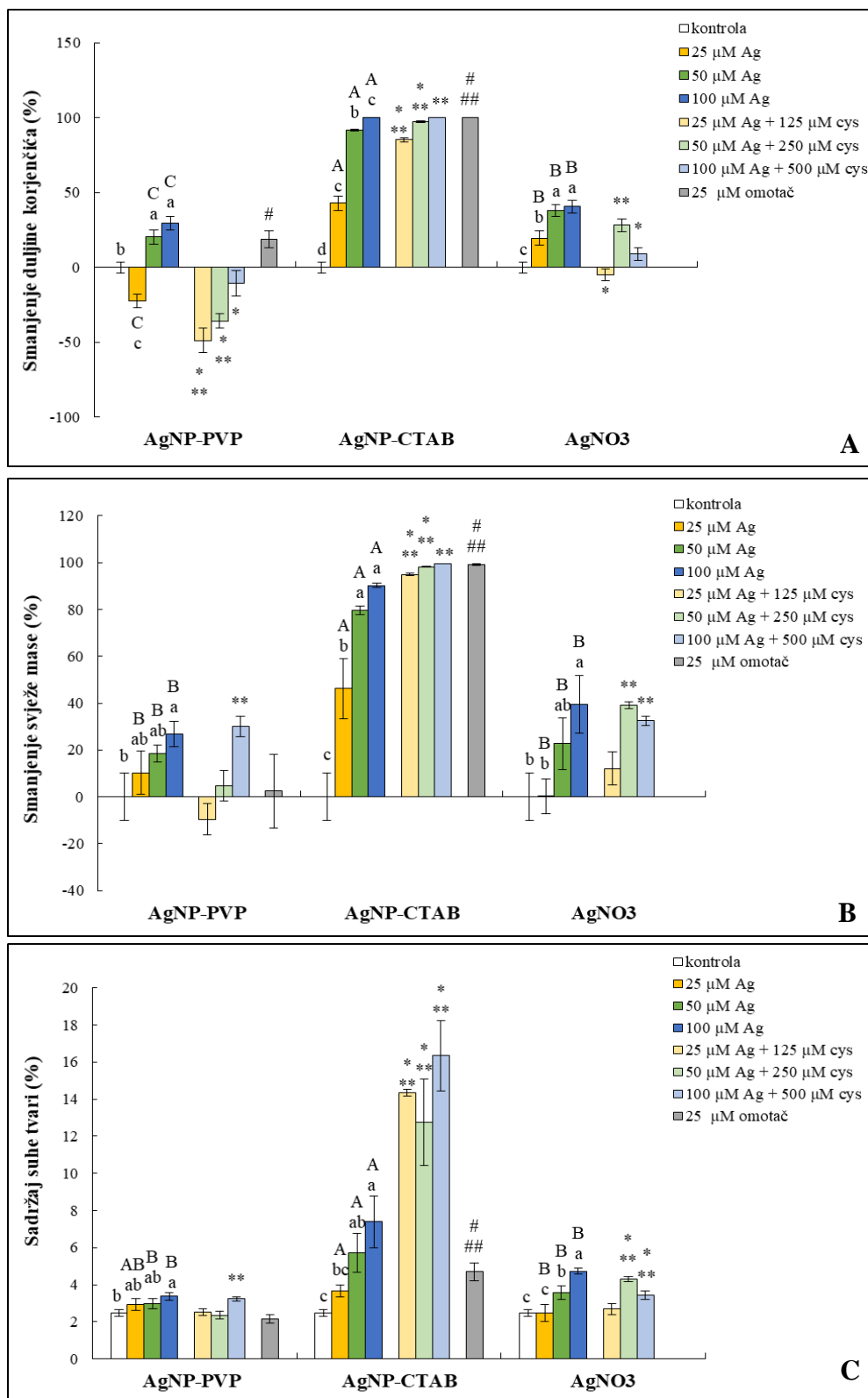
Na smanjenje svježe mase utjecali su koncentracija ($F = 12,23$, $p < 0,0001$) i tip tretmana ($F = 40,02$, $p < 0,0001$). Tretmani sa AgNP-PVP i AgNO₃ pri tome su pokazali sličan trend uzrokujući značajno slabiji rast izdanka samo pri najvećoj primijenjenoj koncentraciji tretmana (100 μM), iako su i koncentracije od 25 i 50 μM pokazale negativan utjecaj na ovaj parametar, ali bez statističkog značaja (Slika 30B, Slika 31). Štetni učinak AgNP-CTAB značajno je veći u odnosu na ostale oblike Ag; već i najniža koncentracija tretmana dovela je do 40%-tnog smanjenja svježe mase u odnosu na kontrolu, s povećanjem do 90% pri koncentraciji od 100 μM. Dodatak cisteina niti u jednom tipu tretmana nije uspio umanjiti negativan utjecaj na svježnu masu klijanaca. Dapače, kombinirani tretmani cisteina s AgNP-CTAB uzrokovali su dodatno smanjenje pri 25 i 50 μM koncentraciji u odnosu na tretman sa samim AgNP-CTAB. Uz to, i sam omotač CTAB

prouzročio je značajno smanjenje svježe mase klijanaca, koje je bilo jače izraženo nego kod tretmana s AgNP-CTAB. Omotač PVP nije značajno utjecao na smanjenje svježe mase.

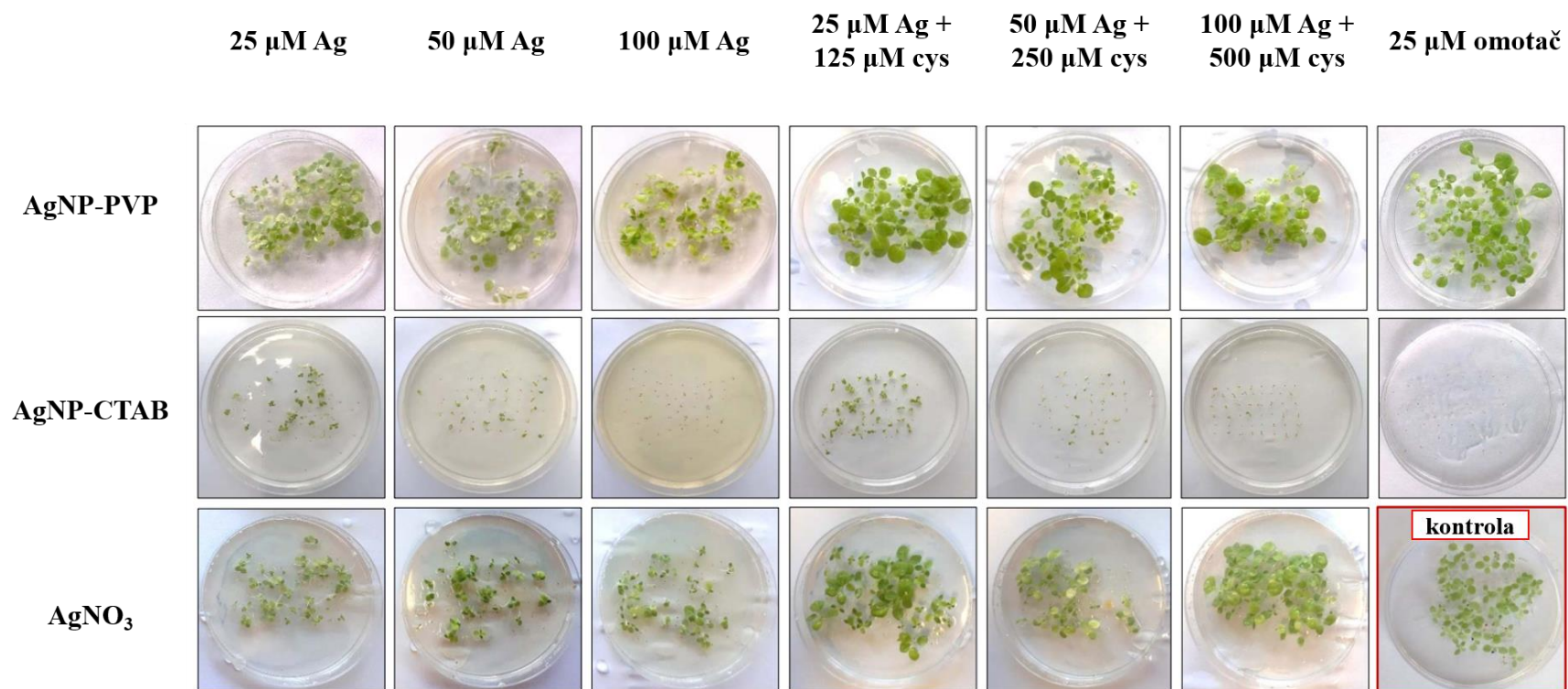
Na promjene u sadržaju suhe tvari u klijancima duhana značajan utjecaj imale su koncentracija ($F = 8,41$, $p < 0,001$) i tip tretmana ($F = 12,99$, $p < 0,0001$). AgNP-PVP i AgNO₃ pokazali su sličan utjecaj na povećanje sadržaja suhe tvari u klijancima duhana (Slika 30C. Slika 31); AgNP-PVP uzrokovao je značajno povećanje samo pri 100 μM koncentraciji, dok je nakon tretmana s AgNO₃ utjecaj bio vidljiv već pri 50 μM koncentraciji u odnosu na kontrolu. Iako je i na tretmanu s AgNP-CTAB povećanje sadržaja suhe tvari bilo značajno tek na koncentracijama od 50 i 100 μM , ono je bilo značajno veće u odnosu na tretmane AgNP-PVP i AgNO₃ istih koncentracija. Dodatak cisteina nije umanjio utjecaj niti jednog od ispitanih tretmana. Slično kao i kod svježe mase, dodatak cisteina tretmanima s AgNP-CTAB doveo je do značajnog povećanja sadržaja suhe tvari u odnosu na tretmane bez cisteina. Tretman omotačem PVP nije značajno utjecao na sadržaj suhe tvari u klijancima duhana, dok je primjena omotača CTAB značajno povećala njihov sadržaj.



Slika 29. Duljina korjenčića klijanaca duhana nakon tri tjedna rasta na krutoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS uz dodatak AgNP-PVP (A), AgNP-CTAB (B) i AgNO₃ (C), njihove kombinacije sa cisteinom (cys) te omotačima PVP i CTAB. K – kontrola, 1 – 25 μM Ag, 2 – 50 μM Ag, 3 – 100 μM Ag, 4 – 25 μM Ag + 125 μM cys, 5 – 50 μM Ag + 250 μM cys, 6 – 100 μM Ag + 500 μM cys, 7 – 25 μM omotač.



Slika 30. Smanjenje duljine korjenčića (A) i svježe mase (B) te sadržaj suhe tvari (C) u kljancima duhana nakon tri tjedna rasta na krutoj podlozi 1/2 MS uz dodatak 25, 50 i 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, njihove kombinacije sa 125, 250 and i 500 μM cisteinom (cys) te 25 μM omotačima PVP i CTAB. Rezultati prikazuju srednju vrijednost od ukupno 60 kljancina ± standardna pogreška. Upotreba različitih slova označava značajne razlike (p ≤ 0,05, dvosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test) između različitih koncentracija istog tretmana (mala slova) i različitih tretmana istih koncentracija (velika slova). Zvezdica (*) označava značajnu razliku između tretmana sa i bez cisteina pri jednakoj koncentraciji tretmana, dvostruke zvezdice (**) označavaju značajnu razliku između tretmana s cisteinom i kontrole. Ljestve (#) označavaju značajnu razliku između tretmana s omotačima (PVP i CTAB) i kontrole, a dvostruke ljestve (##) označavaju razliku između različitih omotača.

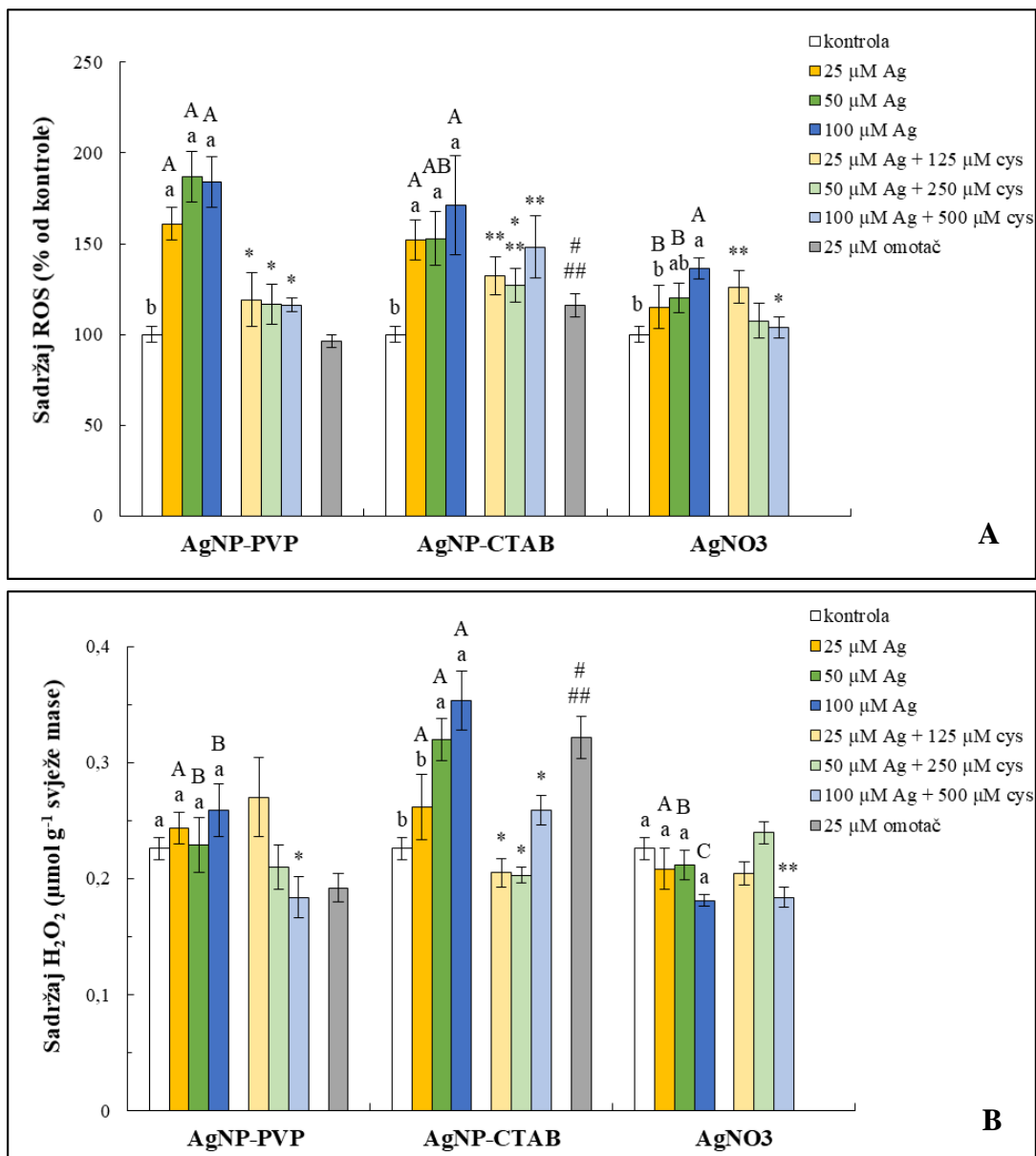


Slika 31. Klijanci duhana nakon tri tjedna rasta na krutoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS uz dodatak 25, 50 i 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, njihove kombinacije sa 125, 250 i 500 μM cisteinom (cys) te 25 μM omotačima PVP i CTAB.

4.5. Reaktivni oblici kisika

Na stvaranje ukupnih ROS utjecali su i koncentracija ($F = 11,67$, $p < 0,0001$) i tip tretmana ($F = 9,18$, $p < 0,001$). Nakon tretmana s oba tipa AgNP čestica izmjereno je povećanje sadržaja ROS već od najniže koncentracije u odnosu na kontrolu i te se vrijednosti između AgNP-PVP i AgNP-CTAB nisu značajno razlikovale (Slika 32A). Pojačano stvaranje ROS zabilježeno je i na tretmanu s AgNO₃, ali samo pri koncentraciji od 100 μM. Dodatak cisteina značajno je umanjio stvaranje ROS u tretmanima s AgNP-PVP pri svim koncentracijama, kao i pri najvišoj koncentraciji AgNO₃ tretmana, a dobivene vrijednosti nisu se značajno razlikovale od kontrolnih. Cistein nije uspio umanjiti negativan utjecaj AgNP-CTAB; značajno smanjenje sadržaja ROS izmjereno je samo u kombinaciji cisteina s tretmanom od 50 μM u odnosu na tretman samim AgNP-CTAB, ali je dobivena vrijednost i dalje bila značajno veća nego u kontroli. I sam omotač CTAB izazvao je značajno povećanje sadržaja ROS u klijanacima duhana u odnosu na kontrolu, što nije bilo zabilježeno na tretmanu s PVP omotačem.

Na razinu H₂O₂ u tkivu klijanaca duhana utjecaj je imao samo tip tretmana ($F = 18,07$, $p < 0,0001$), a ne i primijenjena koncentracija. Povećanje sadržaja H₂O₂ u odnosu na kontrolu zabilježeno je samo pri 50 i 100 μM tretmanima AgNP-CTAB, dok tretmani AgNP-PVP i AgNO₃ nisu doveli do značajnih promjena (Slika 32B). Dodatak cisteina umanjio je negativan utjecaj AgNP-CTAB pri svim koncentracijama tretmana, te je vrijednosti H₂O₂ približio vrijednostima kontrole. Omotač CTAB također je uzrokovao povećano stvaranje H₂O₂ u tkivu, što nije bilo zabilježeno u tretmanu s omotačem PVP.



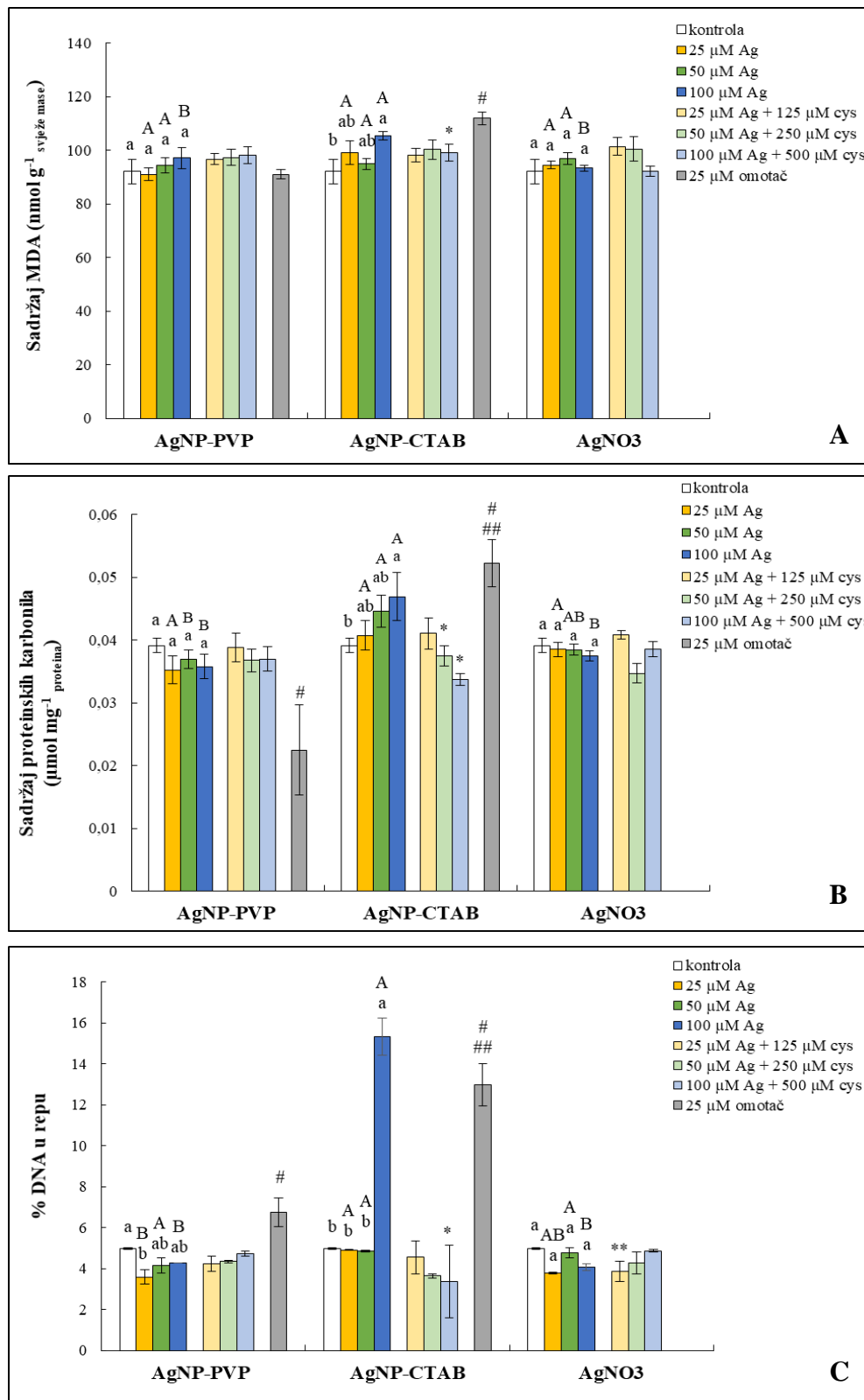
Slika 32. Sadržaj ukupnih ROS (A) i H₂O₂ (B) u kljancima duhana nakon tretmana s 25, 50 i 100 µM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, njihove kombinacije sa 125, 250 i 500 µM cisteinom (cys) te 25 µM omotačima PVP i CTAB. Rezultati prikazuju srednju vrijednost 12 replika ± standardna pogreška, dobivenih u dva nezavisna mjerenja. Upotreba različitih slova označava značajne razlike ($p \leq 0,05$, dvosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test) između različitih koncentracija istog tretmana (mala slova) i različitih tretmana istih koncentracija (velika slova). Zvezdica (*) označava značajnu razliku između tretmana sa i bez cisteina pri jednakoj koncentraciji tretmana, dvostruke zvezdice (**) označavaju značajnu razliku između tretmana s cisteinom i kontrole. Ljestve (#) označavaju značajnu razliku između tretmana s omotačima (PVP i CTAB) i kontrole, a dvostruke ljestve (##) označavaju razliku između različitih omotača.

4.6. Oštećenje biomolekula

Na razinu lipidne peroksidacije u tkivu klijanaca duhana nisu utjecali ni koncentracija ni tip tretmana. Ipak, mjerenjem je zabilježena pojačana razina sadržaja MDA pri tretmanima s AgNP-CTAB u odnosu na kontrolu, što je od statističkog značaja bilo izraženo samo pri najvećoj koncentraciji, a umanjeno je u kombiniranom tretmanu s cisteinom (Slika 33A). Povećanje sadržaja MDA izmjereno je i na tretmanu sa samim omotačem CTAB, za razliku od omotača PVP koji nije doveo do pojave lipidne peroksidacije.

Na oštećenje proteina u tkivu klijanaca duhana utjecao je samo tip tretmana ($F = 9,49$, $p < 0,0005$), ali ne i koncentracija. Tretmani s AgNP-PVP i AgNO₃ nisu pokazali značajne razlike u sadržaju proteinskih karbonila niti pri jednoj od ispitanih koncentracija u odnosu na kontrolu i međusobno, dok je u AgNP-CTAB tretmanu zabilježeno blago povećanje pri 25 i 50 μM koncentraciji, a značajno povećanje pri koncentraciji od 100 μM (Slika 33B). Dodatak cisteina tretmanu s AgNP-CTAB značajno je smanjio stvaranje proteinskih karbonila pri kombiniranim tretmanima na višim koncentracijama (50 i 100 μM). I sami omotači uzrokovali su promjene u sadržaju proteinskih karbonila, ali je njihov utjecaj bio različit; nakon tretmana s omotačem PVP izmjeren je smanjen sadržaj proteinskih karbonila u odnosu na kontrolu, dok je tretman omotačem CTAB doveo do značajnog povećanja karbonila u odnosu na kontrolu i omotač PVP.

Na oštećenje molekule DNA, koje je izmjereno primjenom Comet testa, utjecali su koncentracija ($F = 46,62$, $p < 0,0001$) i tip tretmana ($F = 66,18$, $p < 0,0001$). Tretmani s AgNP-PVP i AgNO₃ nisu uzrokovali oštećenja molekule DNA, te je pri koncentraciji od 25 μM AgNP-PVP zabilježen i niži % DNA u repu u odnosu na kontrolu (Slika 33C). S druge strane, tretman najvišom koncentracijom AgNP-CTAB doveo je do značajnog oštećenja molekule DNA koje je bilo 3× jače u odnosu na kontrolu, te je u potpunosti uklonjeno dodatkom cisteina. I primjena omotača dovela je do značajnog porasta vrijednosti % DNA u repu, što je bilo jače izraženo kod omotača CTAB u odnosu na PVP.



Slika 33. Sadržaj MDA (A), proteinskih karbonila (B) i % DNA u repu (C) u klijancima duhana nakon tretmana s 25, 50 i 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, njihove kombinacije sa 125, 250 i 500 μM cisteinom (cys) te 25 μM omotačima PVP i CTAB. Rezultati prikazuju srednju vrijednost 12 replika ± standardna pogreška, dobivenih u dva nezavisna mjerenja. Upotreba različitih slova označava značajne razlike ($p \leq 0,05$, dvosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test) između različitih koncentracija istog tretmana (mala slova) i različitih tretmana istih koncentracija (velika slova). Zvezdica (*) označava značajnu razliku između tretmana sa i bez cisteina pri jednakoj koncentraciji tretmana, dvostruke zvezdice (**) označavaju značajnu razliku između tretmana s cisteinom i kontrole. Ljestve (#) označavaju značajnu razliku između tretmana s omotačima (PVP i CTAB) i kontrole, a dvostruke ljestve (##) označavaju razliku između različitih omotača.

4.7. Aktivnost antioksidacijskih enzima

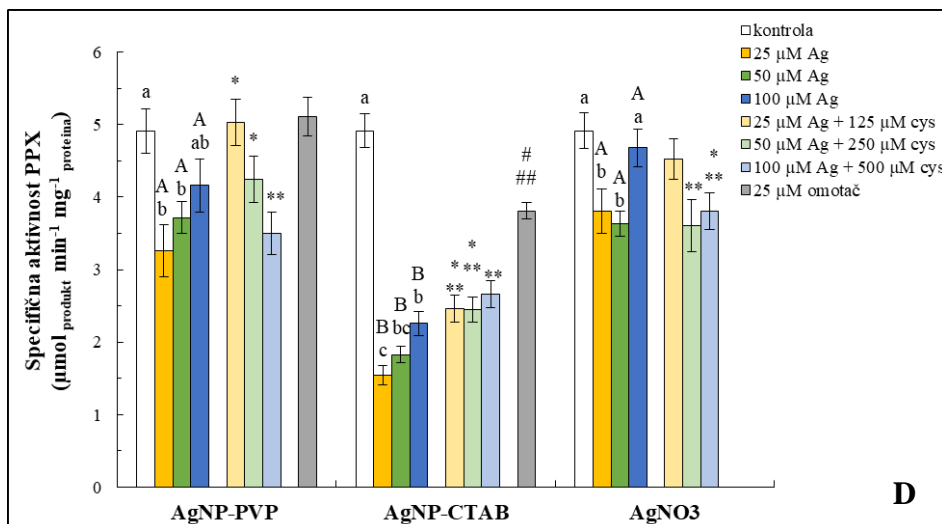
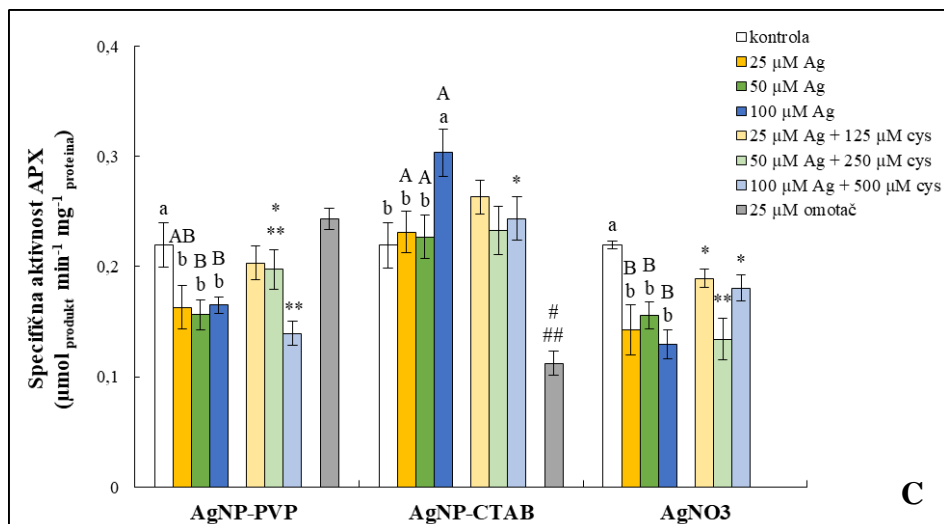
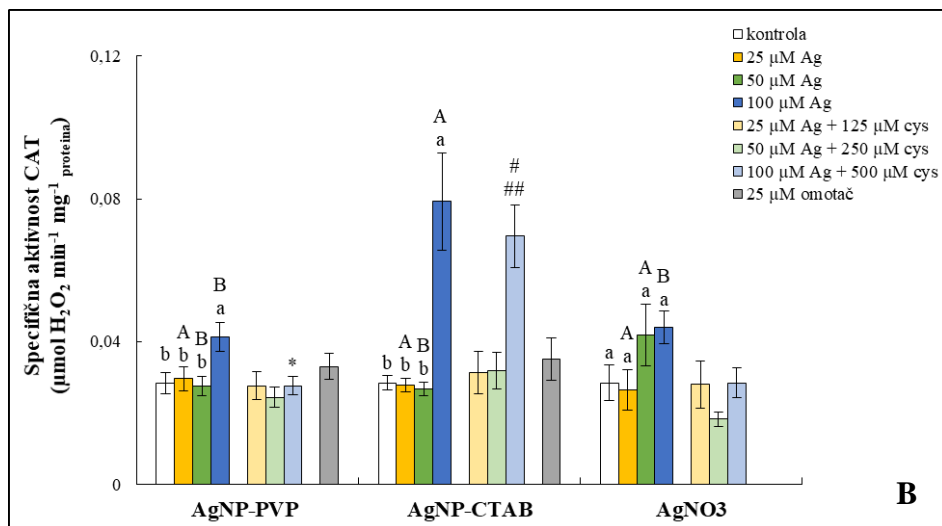
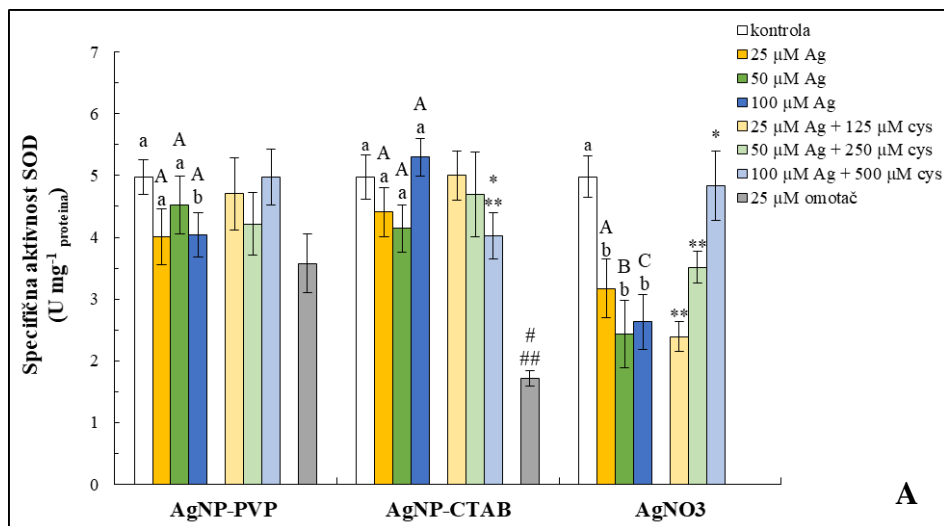
Na aktivnost SOD utjecali su koncentracija ($F = 5,08$, $p < 0,005$) i tip tretmana ($F = 8,21$, $p < 0,001$), pri čemu su zabilježene značajne razlike između utjecaja srebra u nanočestičnom i ionskom obliku. Tretmani AgNP-PVP i AgNP-CTAB nisu rezultirali značajnim promjenama u aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu i međusobno, dok je nakon tretmana s AgNO₃ izmjereno značajno smanjenje pri svim ispitanim koncentracijama u odnosu na kontrolu i izlaganje nanočesticama (Slika 33A). Smanjenje aktivnosti SOD nije se statistički razlikovalo između različitih koncentracija AgNO₃, a dodatak cisteina umanjio je njihov utjecaj samo pri najvećoj koncentraciji. Zanimljiv fenomen dogodio se u kombiniranom tretmanu 100 μM AgNP-CTAB i 500 μM cisteina, gdje je dodatak cisteina značajno smanjio aktivnost SOD u odnosu na tretman samim nanočesticama kao i na kontrolu. Značajno smanjenje aktivnosti SOD uzrokovao je i omotač CTAB, dok isto nije zabilježeno na tretmanu s omotačem PVP.

Na aktivnost CAT utjecale su koncentracija ($F = 17,34$, $p < 0,0001$) i tip tretmana ($F = 3,98$, $p < 0,05$). Pri koncentracijama od 25 i 50 μM nisu izmjerene značajne promjene aktivnosti CAT u tretmanima srebrom u odnosu na kontrolu (Slika 33B). Pojačana aktivnost zabilježena je u tretmanima s najvećom koncentracijom svih tipova srebra, što je bilo najjače izraženo u tretmanu s AgNP-CTAB, a najslabije na tretmanu s AgNO₃ gdje nije zabilježena statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu. Dodatak cisteina umanjio je aktivnost CAT u kombiniranom tretmanu sa 100 μM AgNP-PVP, ali ne i u tretmanu sa 100 μM AgNP-CTAB, gdje je vrijednost i dalje bila značajno veća u odnosu na kontrolnu. Tretmani omotačima PVP i CTAB nisu izazvali promjene u aktivnosti enzima CAT.

Na aktivnost enzima APX utjecao je tip tretmana ($F = 18,64$, $p < 0,0001$), ali ne i koncentracija. Tretmani s AgNP-PVP i AgNO₃ izazvali su značajno smanjenje aktivnosti APX pri svim ispitanim koncentracijama (Slika 34C). S druge strane, tretman sa 100 μM AgNP-CTAB doveo je do značajnog porasta aktivnosti APX. Pri nižim koncentracijama AgNP-CTAB nisu zabilježene značajne promjene aktivnosti u odnosu na kontrolu, ali su dobivene vrijednosti bile značajno više u odnosu na druge tipove tretmana jednakih koncentracija. Dodatak cisteina umanjio je negativne utjecaje gotovo svih tretmana; u tretmanu s AgNP-PVP vrijednosti slične kontrolnima izmjerene su na kombiniranim tretmanima nižih koncentracija, ali ne i pri koncentraciji od 100 μM. Slično, povećanje aktivnosti APX u odnosu na tretman samim srebrom zabilježeno je i u kombiniranim

tretmanima 25 i 100 μM AgNO_3 i cisteina. Uz to, dodatak cisteina značajno je umanjio aktivnost APX u tretmanu sa 100 μM AgNP-CTAB, pri čemu se dobivena vrijednost nije razlikovala od kontrolne. Omotač CTAB također je pokazao značajan utjecaj na smanjenje aktivnosti APX u odnosu na kontrolu i tretman omotačem PVP.

Na aktivnost PPX u klijancima duhana utjecali su koncentracija ($F = 36,74$, $p < 0,0001$) i tip primijenjenog tretmana ($F = 45,87$, $p < 0,0001$). AgNP-PVP i AgNO_3 pokazali su sličan utjecaj na aktivnost PPX; tretmani s koncentracijama od 25 i 50 μM izazvali su značajno smanjenje aktivnosti, dok 100 μM koncentracija u oba tipa tretmana nije dovela do značajnih promjena u odnosu na kontrolu i između njih međusobno (Slika 34D). Tretman s AgNP-CTAB također je doveo do smanjenja aktivnosti PPX, koje je bilo značajno jače u odnosu na ostale tretmane. Smanjenje aktivnosti je bilo najviše izraženo pri 25 μM koncentraciji, a postupno je slabjelo pri porastu koncentracije AgNP-CTAB. Dodatak cisteina doveo je do značajnog povećanja aktivnosti PPX u kombiniranim tretmanima s 25 i 50 μM AgNP-PVP i 25 μM AgNO_3 , dok je pri najvećoj koncentraciji u oba tretmana uzrokovao značajno smanjenje aktivnosti PPX u odnosu na tretmane bez cisteina. Značajno smanjenje aktivnosti PPX u odnosu na kontrolu uzrokovao je i tretman omotačem CTAB, iako manje u odnosu na tretmane s AgNP-CTAB, dok isto nije bilo izmjereno nakon tretmana s omotačem PVP.



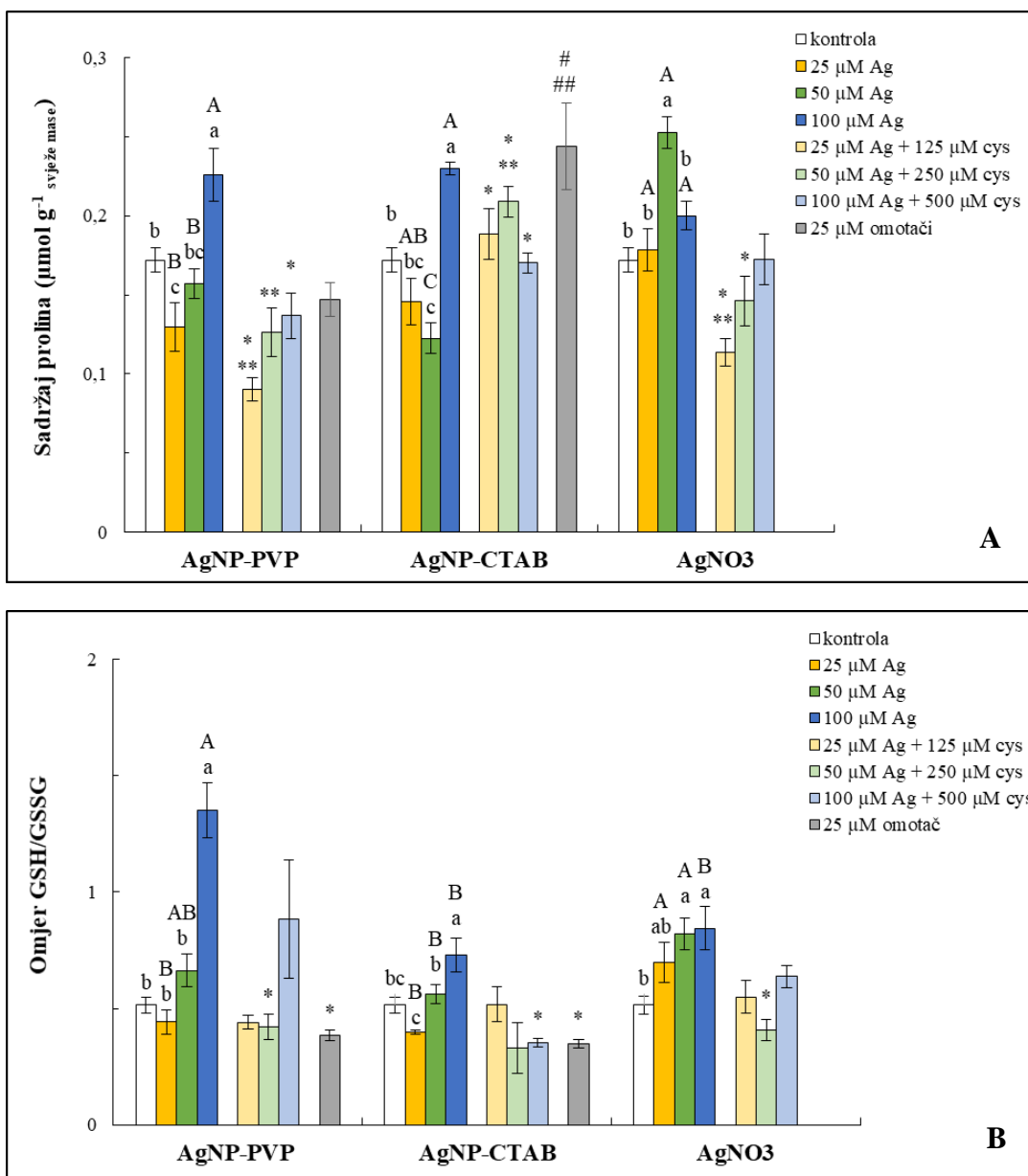
Slika 34. Specifična aktivnost SOD (A), CAT (B), APX (C) i PPX (D) u klijancima duhana nakon tretmana s 25, 50 i 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO_3 , njihove kombinacije sa 125, 250 and 500 μM cisteinom (cys) te 25 μM omotačima PVP i CTAB. Rezultati prikazuju srednju vrijednost 12 replika \pm standardna pogreška, dobivenih u dva nezavisna mjerenja. Upotreba različitih slova označava značajne razlike ($p \leq 0,05$, dvosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test) između različitih koncentracija istog tretmana (mala slova) i različitih tretmana istih koncentracija (velika slova). Zvezdica (*) označava značajnu razliku između tretmana sa i bez cisteina pri jednakoj koncentraciji tretmana, dvostruke zvezdice (**) označavaju značajnu razliku između tretmana s cisteinom i kontrole. Ljestve (#) označavaju značajnu razliku između tretmana s omotačima (PVP i CTAB) i kontrole, a dvostruke ljestve (##) označavaju razliku između različitih omotača.

4.8. Sadržaj neenzimskih antioksidansa

Na promjene u sadržaju prolina u klijancima duhana utjecali su koncentracija ($F = 15,47$, $p < 0,0001$) i tip primijenjenog tretmana ($F = 6,45$, $p < 0,005$). Niske koncentracije oba tipa AgNP dovele su do smanjenja sadržaja prolina u tkivu, što je bilo značajno izraženo u tretmanima s $25 \mu\text{M}$ AgNP-PVP i $50 \mu\text{M}$ AgNP-CTAB (Slika 35A). Ipak, pri koncentraciji od $100 \mu\text{M}$, oba tipa nanočestica s jednakim intenzitetom izazvala su značajan porast u odnosu na kontrolu. Tretman s AgNO_3 nije doveo do smanjenja sadržaja prolina, ali je $50 \mu\text{M}$ koncentracija izazvala značajan porast u odnosu na kontrolu i tretmane nanočesticama istih koncentracija. Utjecaj cisteina značajno se razlikovao između različitih tretmana srebrom. U kombiniranom tretmanu s AgNP-PVP, cistein je značajno umanjio povećanje sadržaja prolina pri svim ispitanim koncentracijama, pri čemu su izmjerene vrijednosti bile niže (25 i $50 \mu\text{M}$ tretman) ili jednake ($100 \mu\text{M}$ tretman) u odnosu na kontrolu. Sličan utjecaj cisteina zabilježen je i u kombiniranom tretmanu s AgNO_3 , gdje je pri najnižoj koncentraciji ($25 \mu\text{M}$ tretman) došlo do značajnog smanjenja sadržaja prolina u odnosu na kontrolu i tretman bez cisteina, pri $50 \mu\text{M}$ smanjenje je bilo značajno u odnosu na tretman bez cisteina ali ne i kontrolu, dok koncentracija od $100 \mu\text{M}$ nije dovela do značajnih promjena. Kombinirani tretman AgNP-CTAB i cisteina s druge strane izazvao je značajno povećanje sadržaja prolina u odnosu na tretman bez cisteina ($25 \mu\text{M}$ tretman), te također i u odnosu na kontrolu ($50 \mu\text{M}$ tretman). Ipak, dodatak cisteina u tretman sa $100 \mu\text{M}$ koncentracijom AgNP-CTAB značajno je umanjio povećanje sadržaja prolina uzrokovano nanočesticama. Tretman samim omotačem izazvao je značajno povećanje sadržaja prolina u klijancima, za razliku od tretmana omotačem PVP gdje nije zabilježena značajna razlika u usporedbi s kontrolom.

Na promjene u omjeru sadržaja GSH i GSSG djelovali su podjednako koncentracija ($F = 25,87$, $p < 0,0001$) i tip tretmana ($F = 8,22$, $p < 0,001$). Najveće povećanje omjera GSH/GSSG uzrokovao je tretman sa $100 \mu\text{M}$ AgNP-PVP, u kojem je izmjerena vrijednost bila značajno veća od kontrole, ali i tretmana ostalim oblicima srebra iste koncentracije (Slika 35B). Niže koncentracije AgNP-PVP nisu izazvale značajne promjene. Slično, nakon tretmana s AgNP-CTAB, vrijednost GSH/GSSG pri koncentracijama od 25 i $50 \mu\text{M}$ nije bila značajno promijenjena u odnosu na kontrolu, dok je $100 \mu\text{M}$ koncentracija izazvala značajno povećanje. Na tretmanu s AgNO_3 značajno povećanje omjera GSH/GSSG bilo je podjednako pri koncentracijama od 50 i $100 \mu\text{M}$, dok tretman s $25 \mu\text{M}$ koncentracijom nije doveo do značajnih promjena u odnosu na kontrolu. Dodatak cisteina tretmanu s AgNP-PVP značajno je umanjio omjer GSH/GSSG te se približio

kontrolnoj vrijednosti samo pri koncentraciji od 50 μM . U kombiniranom tretmanu AgNP-CTAB i cisteina značajno smanjenje omjera GSH/GSSG zabilježeno je samo pri koncentraciji od 100 μM , gdje se vrijednost nije znatno razlikovala od kontrolne. Slično, u kombiniranom tretmanu AgNO₃ i cisteina, pri koncentraciji od 50 μM izmjeren je smanjeni omjer GSH/GSSG u odnosu na tretman bez cisteina, dok se ostale koncentracije nisu značajno razlikovale od tretmana bez cisteina, ali i od kontrole. Primjena oba omotača, PVP i CTAB, dovela je do značajnog smanjenja omjera GSH/GSSG u klijancima duhana.

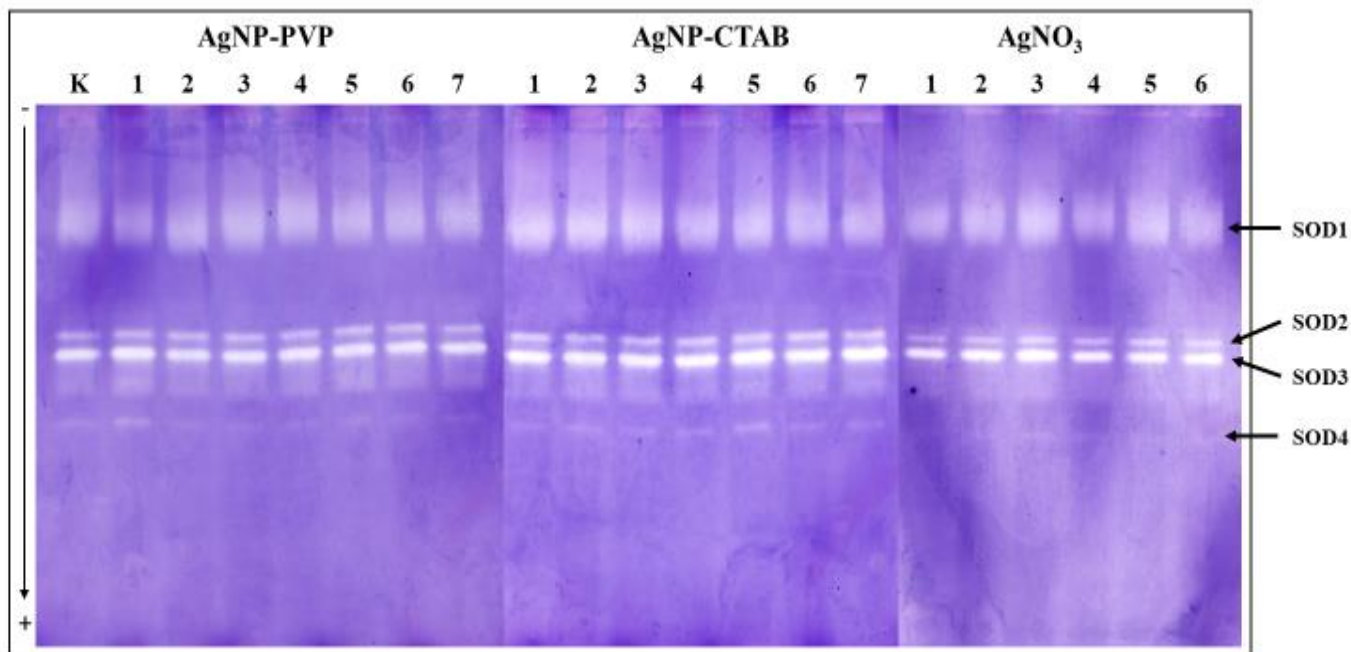


Slika 35. Sadržaj prolina (A) i omjer reduciranog (GSH) i oksidiranog (GSSG) oblika glutationa (B) u klijancima duhana nakon tretmana s 25, 50 i 100 µM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, njihove kombinacije sa 125, 250 i 500 µM cisteinom (cys) te 25 µM omotačima PVP i CTAB. Rezultati prikazuju srednju vrijednost 150 jezgara ± standardna pogreška. Upotreba različitih slova označava značajne razlike ($p \leq 0,05$, dvosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test) između različitih koncentracija istog tretmana (mala slova) i različitih tretmana istih koncentracija (velika slova). Zvezdica (*) označava značajnu razliku između tretmana sa i bez cisteina pri jednakoj koncentraciji tretmana, dvostruke zvezdice (**) označavaju značajnu razliku između tretmana s cisteinom i kontrole. Ljestve (#) označavaju značajnu razliku između tretmana s omotačima (PVP i CTAB) i kontrole, a dvostruke ljestve (##) označavaju razliku između različitih omotača.

4.9. Izoforme i aktivnost antioksidacijskih enzima u gelu

Na slici 36. prikazana je aktivnost izoenzima SOD u klijancima duhana nakon tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, njihove kombinacije s cisteinom te omotačima PVP i CTAB. Nakon obrade specifičnim supstratom, u gelu su detektirane četiri izoforme različite elektroforetske pokretljivosti, označene kao SOD1 – SOD4.

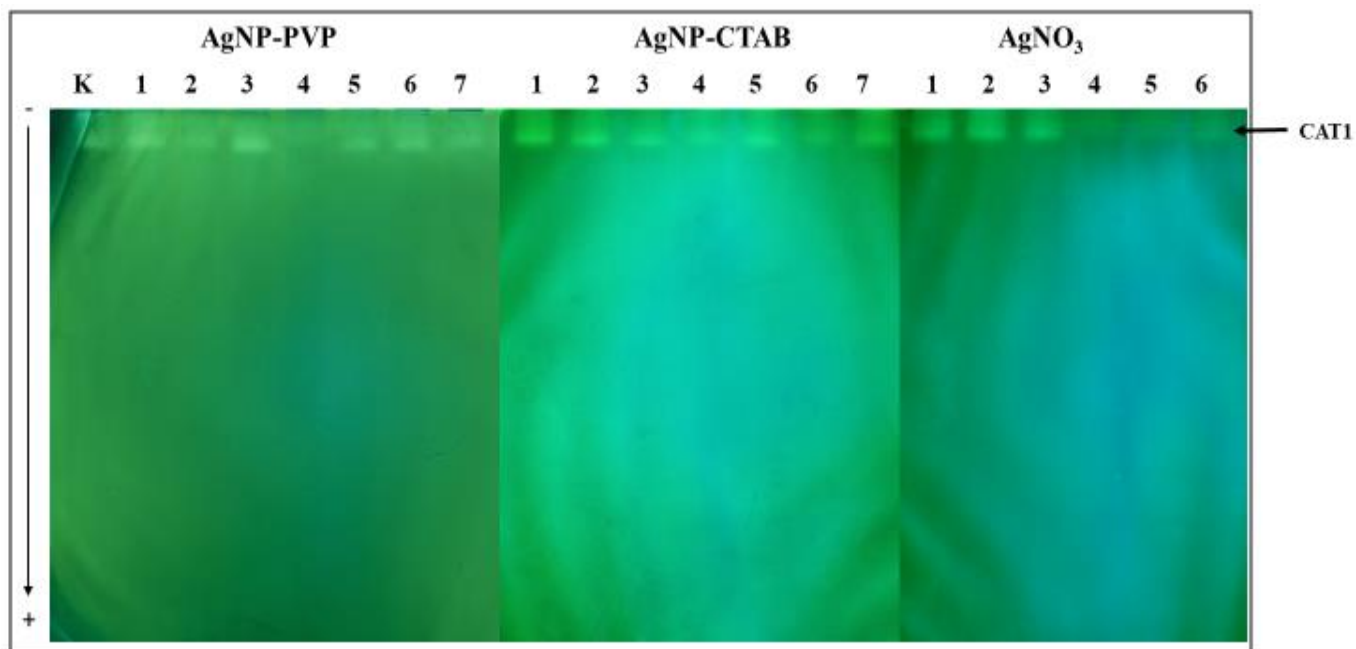
Aktivnost izoforme SOD1 bila je pojačana u tretmanu s višim koncentracijama AgNP-PVP (50 i 100 μM) te nakon tretmana sa svim koncentracijama AgNP-CTAB, dok se u tretmanima s AgNO₃ intenzitet vrpce SOD1 pojačavao s porastom koncentracije srebra. Dodatak cisteina nije značajno utjecao na aktivnost SOD1 u kombiniranim tretmanima s AgNP-PVP i AgNP-CTAB, ali je umanjio aktivnost ove izoforme u kombiniranim tretmanima s 25 i 100 μM AgNO₃. Tretman omotačima PVP i CTAB nije doveo do značajnih promjena u aktivnosti SOD1. Intenzitet vrpce SOD2 nije pokazao značajne promjene u tretmanima sa srebrom, u kombiniranim tretmanima s cisteinom kao ni nakon izlaganja samim omotačima. Izoforma SOD3 pokazala je pojačanu aktivnost u tretmanu s 25 μM AgNP-PVP, dok pri 50 i 100 μM koncentracijama nisu zabilježene značajne promjene. U tretmanu s AgNP-CTAB, pojačana aktivnost SOD3 bila je vidljiva na svim ispitanim koncentracijama, između kojih nisu bile vidljive značajne razlike. Tretman s AgNO₃ izazvao je pojačanu aktivnost SOD3 pri 50 i 100 μM koncentracijama. Dodatak cisteina umanjio je pojačanu aktivnost ove izoforme u kombiniranim tretmanima s AgNP-PVP i AgNO₃, ali ne i kod AgNP-CTAB, gdje je u kombiniranom tretmanu 50 μM AgNP-CTAB i 250 μM cisteina zabilježeno i dodatno pojačanje intenziteta vrpce SOD3 u odnosu na tretman bez cisteina. Utjecaj samih omotača značajno se razlikovao; aktivnost SOD3 nije se mijenjala u tretmanu s omotačem PVP, ali je bila značajno pojačana u tretmanu s omotačem CTAB. Izoforma SOD4 bila je slabo izražena u svim tretmanima, posebice u tretmanima s AgNO₃ i kombiniranim tretmanima AgNO₃ i cisteina, gdje je vrpca bila jedva primjetna. Ipak, povećana aktivnost ove izoforme primjećena je nakon izlaganja 25 μM AgNP-PVP i kombiniranom tretmanu 50 μM AgNP-CTAB i 250 μM cisteina u odnosu na kontrolu.



Slika 36. Aktivnost i izoforme SOD u gelu nakon provedene nativne PAG elektroforeze u klijancima duhana tretiranih sa AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, njihove kombinacije s cisteinom (cys), te omotačima PVP i CTAB. K – kontrola, 1 – 25 μM Ag, 2 – 50 μM Ag, 3 – 100 μM Ag, 4 – 25 μM Ag + 125 μM cys, 5 – 50 μM Ag + 250 μM cys, 6 – 100 μM Ag + 500 μM cys, 7 – 25 μM omotač.

Na slici 37. prikazana je aktivnost enzima CAT u gelu nakon tretmana klijanaca duhana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, njihove kombinacije s cisteinom te omotačima PVP i CTAB. U gelu je detektirana jedna izoforma ovog enzima, označena kao CAT1, čija je aktivnost značajno ovisila o tipu tretmana.

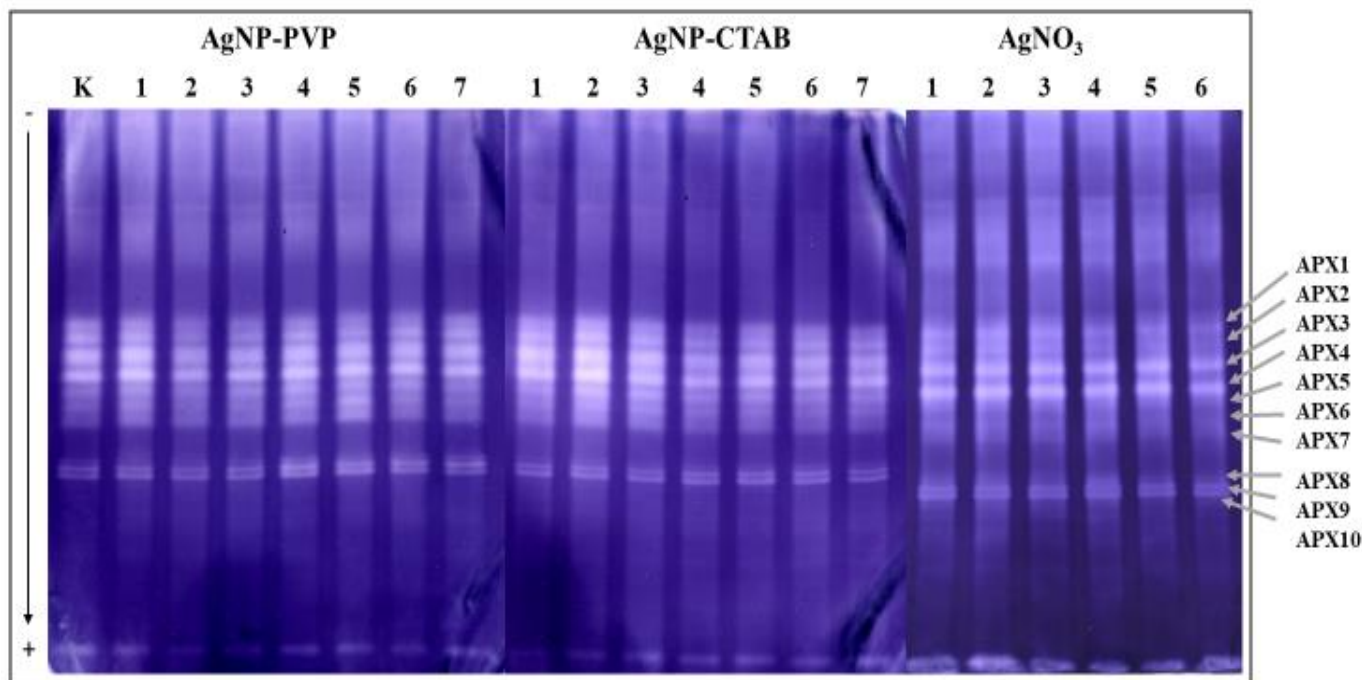
U tretmanu s AgNP-PVP, povećanje aktivnosti CAT1 vidljivo je nakon primjene 25 i 100 μM koncentracije, dok je aktivnost pri koncentraciji od 50 μM bila slična kontrolnoj. U odnosu na kontrolu i tretman s AgNP-PVP, aktivnost CAT1 bila je značajno pojačana pri svim koncentracijama tretmana s AgNP-CTAB i AgNO₃, gdje nisu primjećene velike razlike između ispitanih koncentracija. Dodatak cisteina tretmanima s AgNP-PVP i AgNO₃ umanjio je aktivnost CAT1 te su dobivene vrpce po intenzitetu nalikovale kontrolnoj. Djelomično smanjenje aktivnosti zabilježeno je i u kombiniranim tretmanima 25 i 100 μM AgNP-CTAB i cisteina, dok je nakon izlaganja 50 μM AgNP-CTAB i 250 μM cisteinu aktivnost CAT1 ostala jednaka kao i u tretmanu bez cisteina. Omotač PVP nije značajno djelovao na aktivnost CAT1. S druge strane, u tretmanu s omotačem CTAB zabilježen je porast aktivnosti CAT1 u gelu u odnosu na kontrolu.



Slika 37. Aktivnost i izoforme CAT u gelu nakon provedene native PAG elektroforeze u klijancima duhana tretiranih sa AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, njihove kombinacije s cisteinom (cys), te omotačima PVP i CTAB. K – kontrola, 1 – 25 μM Ag, 2 – 50 μM Ag, 3 – 100 μM Ag, 4 – 25 μM Ag + 125 μM cys, 5 – 50 μM Ag + 250 μM cys, 6 – 100 μM Ag + 500 μM cys, 7 – 25 μM omotač.

Na slici 38. prikazana je aktivnost izoenzima APX u klijancima duhana nakon tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, njihove kombinacije s cisteinom te omotačima PVP i CTAB. Nakon obrade specifičnim supstratom, u gelu je detektirano 10 izoformi ovog enzima različite elektroforetske pokretljivosti, označenih kao APX1 – APX10.

Značajno povećanje aktivnosti izoformi APX1-APX7 u gelu zabilježeno je nakon tretmana s 25 μM AgNP-PVP te 25 i 50 μM AgNP-CTAB u odnosu na kontrolu. S druge strane, tretmani sa svim koncentracijama AgNO₃ doveli su do smanjenja aktivnosti izoformi APX1, APX2, APX3, APX6 i APX7 u odnosu na kontrolu i tretman nanočesticama. Dodatak cisteina umanjio je učinak AgNP-CTAB, ali ne i AgNP-PVP, gdje je u kombiniranim tretmanima zabilježeno dodatno povećanje aktivnosti navedenih izoformi APX u odnosu na kontrolu i tretmane bez cisteina pri svim koncentracijama, a zabilježeno je i povećanje intenziteta vrpce APX8, APX9 i APX10. Kombinirani tretmani AgNO₃ i cisteina dodatno su umanjili aktivnost izoformi APX1, APX2 i APX3, a detektirana je i izoforma APX8 koja nije bila prisutna u tretmanu bez cisteina. Tretmani omotačima PVP i CTAB nisu značajno utjecali na aktivnost i broj izoformi APX.

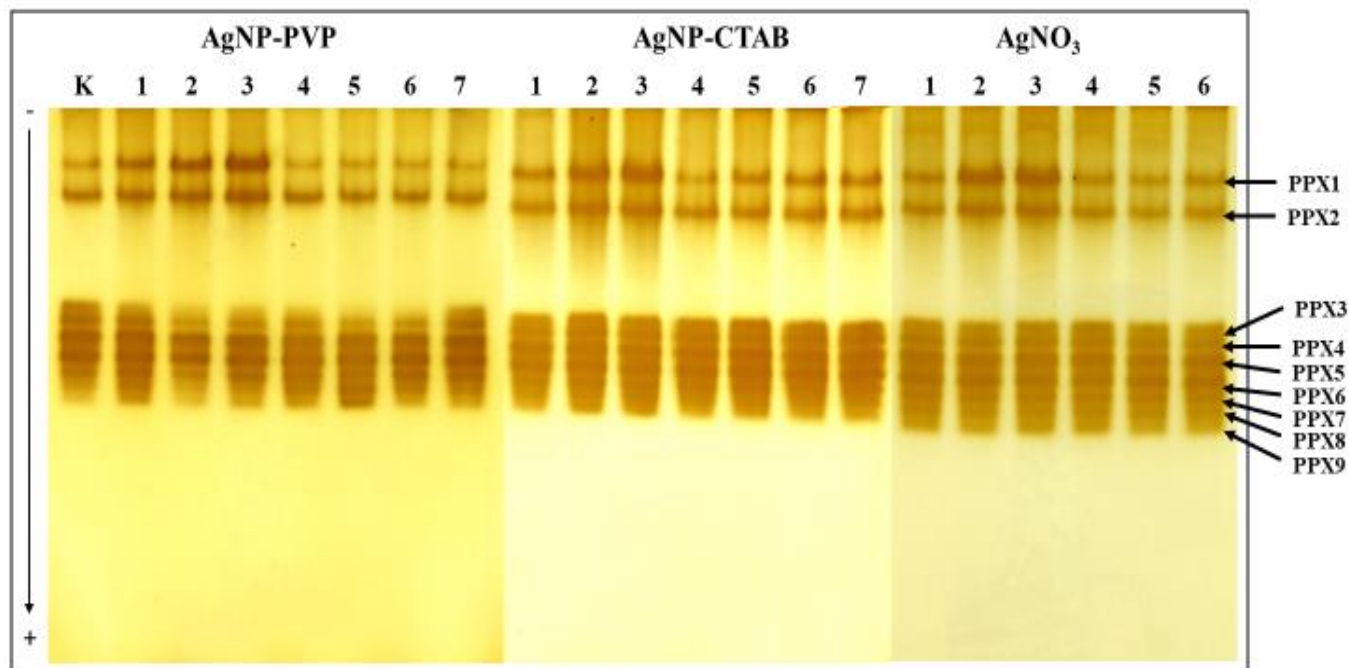


Slika 38. Aktivnost i izoforme APX u gelu nakon provedene native PAG elektroforeze u klijancima duhana tretiranih sa AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, njihove kombinacije s cisteinom (cys), te omotačima PVP i CTAB. K – kontrola, 1 – 25 μM Ag, 2 – 50 μM Ag, 3 – 100 μM Ag, 4 – 25 μM Ag + 125 μM cys, 5 – 50 μM Ag + 250 μM cys, 6 – 100 μM Ag + 500 μM cys, 7 – 25 μM omotač.

Na slici 39. prikazana je aktivnost izoenzima PPX u klijancima duhana nakon tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, njihove kombinacije s cisteinom te omotačima PVP i CTAB. Nakon obrade specifičnim supstratom, u gelu je detektirano 9 izoformi PPX različite elektroforetske pokretljivosti, označenih kao PPX1 – PPX9.

Pojačana aktivnost izoformi PPX1 i PPX2, ovisna o koncentraciji srebra, detektirana je kod oba tipa AgNP, kao i u tretmanu s 50 i 100 μM AgNO₃. Dodatak cisteina značajno je umanjio aktivnost ovih izoformi u svim kombiniranim tretmanima u odnosu na tretmane bez cisteina, što je bilo posebice izraženo nakon izlaganja svim kombiniranim tretmanima AgNP-PVP i AgNO₃ s cisteinom, gdje su detektirane vrpce po intenzitetu nalikovale kontrolnima. Aktivnost izoformi PPX1 i PPX2 bila je pojačana i u tretmanu s omotačem CTAB, dok omotač PVP nije izazvao značajne promjene. Sve koncentracije AgNP-PVP, kao i njihove kombinacije s cisteinom, uzrokovale su značajno smanjenje aktivnosti PPX3 i PPX4 u odnosu na kontrolu. S druge strane, aktivost PPX3 i PPX4 nije se značajno razlikovala u tretmanima s AgNP-CTAB i AgNO₃, kao ni

pri tretmanu omotačima PVP i CTAB. Vrpce PPX5, PPX6 i PPX7 nisu pokazale promjene niti u jednom od tretmana, dok je aktivnost PPX8 i PPX9 bila značajno pojačana nakon izlaganja 25 μM AgNP-PVP te svim koncentracijama AgNP-CTAB i AgNO₃ u odnosu na kontrolu. Dodatak cisteina umanjio je utjecaj AgNP-PVP, no isto nije zabilježeno u kombiniranim tretmanima cisteina s AgNP-CTAB i AgNO₃. Oba omotača također su izazvala pojačanu aktivnost izoformi PPX8 i PPX9.



Slika 39. Aktivnost i izoforme PPX u gelu nakon provedene nativne PAG elektroforeze u kljancima duhana tretiranih sa AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, njihove kombinacije s cisteinom (cys), te omotačima PVP i CTAB. K – kontrola, 1 – 25 μM Ag, 2 – 50 μM Ag, 3 – 100 μM Ag, 4 – 25 μM Ag + 125 μM cys, 5 – 50 μM Ag + 250 μM cys, 6 – 100 μM Ag + 500 μM cys, 7 – 25 μM omotač.

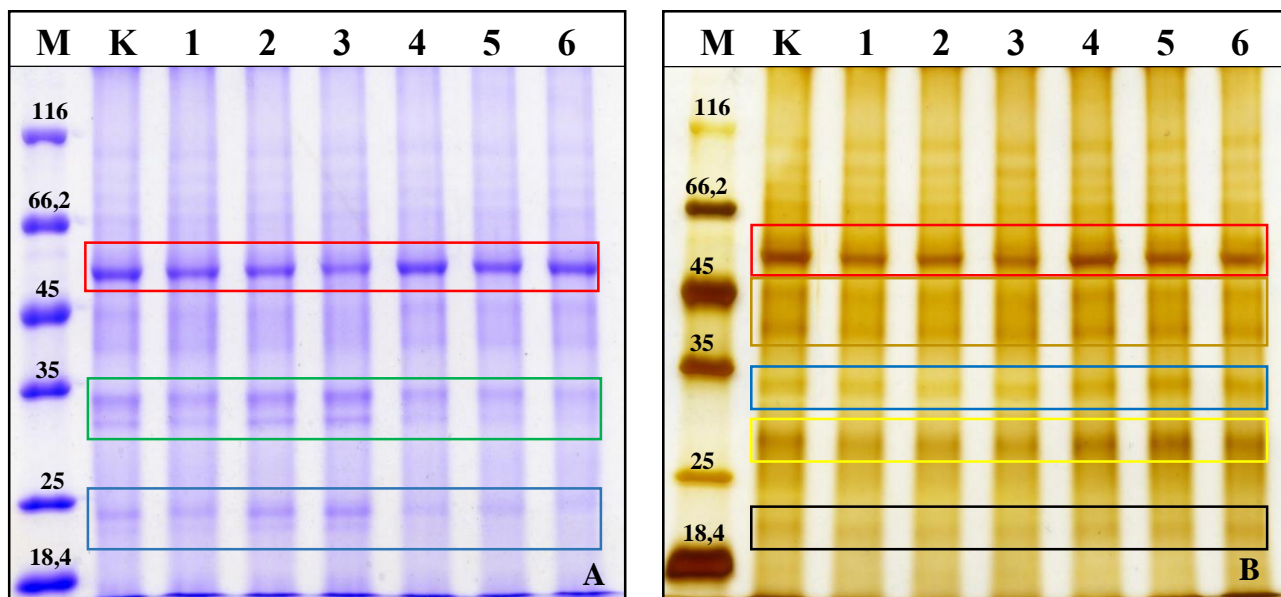
4.10. Analiza ekspresije ukupnih topivih proteina

Ekspresiju ukupnih topivih proteina analizirala sam nakon provedene SDS-PAG elektroforeze i bojanja dobivenih gelova na dva načina – bojom CBB i primjenom AgNO_3 . Za istraživanje promjena u ekspresijskim profilima proteina izabrala sam tretmane sa $100 \mu\text{M}$ koncentracijama AgNP-PVP , AgNP-CTAB , AgNO_3 i njihove kombinirane tretmane s $500 \mu\text{M}$ cisteinom, jer su navedeni tretmani pokazali najznačajnije povećanje količine ROS, oštećenje važnih biomolekula i promjene u sadržaju enzimskih i neenzimskih antioksidansa.

Nakon tretmana sa $100 \mu\text{M}$ AgNP-PVP , AgNP-CTAB , AgNO_3 i njihove kombinacije s $500 \mu\text{M}$ cisteinom, na gelu obojanom bojom CBB vidljiva je promjena u ekspresiji ukupno pet proteinskih vrpca (Slika 40A). Vrpca koja se nalazi na 50 kDa (crveni pravokutnik) na tretmanima s AgNP-PVP , AgNP-CTAB i AgNO_3 pokazala je slabiju ekspresiju u odnosu na kontrolu i odgovarajuće kombinirane tretmane s cisteinom. Smanjenje ekspresije bilo je najizraženije na tretmanu s AgNO_3 , dok između tretmana s dva tipa AgNP nije bilo značajne razlike. Na proteinskim vrpca veličina oko 35 i 30 kDa (zeleni pravokutnik) vidljiva je pojačana ekspresija nakon tretmana s AgNP-CTAB i AgNO_3 u odnosu na kontrolu i tretman AgNP-PVP . Dodatak cisteina tretmanima srebrom značajno je umanjio ekspresiju ovih proteinskih vrpca u odnosu na tretmane bez cisteina, ali i u odnosu na kontrolu, što je bilo najjače izraženo u kombiniranom tretmanu AgNO_3 i cisteina. Sličan je trend zabilježen i za proteinske vrpce od 20 i 24 kDa (plavi pravokutnik). Tretmani s AgNP-CTAB i AgNO_3 značajno su pojačali ekspresiju ovih proteinskih vrpca u odnosu na kontrolu, dok je ekspresija na tretmanu s AgNP-PVP bila nešto slabija od kontrole i ostalih tretmana. Dodatak cisteina doveo je do smanjenja ekspresije vrpce od 24 kDa u svim kombiniranim tretmanima u odnosu na tretmane bez cisteina i kontrolu, dok vrpca od 20 kDa na istim tretmanima nije detektirana.

Na gelu obojanom AgNO_3 detektirala sam promjenu ekspresije 6 proteinskih vrpca nakon tretmana sa $100 \mu\text{M}$ AgNP-PVP , AgNP-CTAB , AgNO_3 i njihove kombinacije s $500 \mu\text{M}$ cisteinom (Slika 40B). Proteinska vrpca veličine oko 50 kDa (crveni pravokutnik), pokazala je smanjenu ekspresiju na tretmanima s AgNP-PVP , AgNP-CTAB i AgNO_3 u odnosu na kontrolu i kombinirane tretmane s cisteinom, što je u skladu s rezultatom dobivenim na gelu obojanom bojom CBB za isti protein (crveni pravokutnik, Slika 41A). Proteinske vrpce od 40 i 45 kDa (smeđi pravokutnik) imale su smanjenu ekspresiju na tretmanima svim tipovima srebra u odnosu na kontrolu, što je značajno

umanjeno dodatkom cisteina pri čemu je intenzitet vrpca kombiniranih tretmana bio sličan kontroli. Ekspresija proteina od 32 kDa (plavi pravokutnik) bila je znatno slabija u tretmanu s AgNP-CTAB u odnosu na kontrolu i tretmane s AgNP-PVP i AgNO₃, koji nisu izazvali značajne promjene u njenom intenzitetu. Dodatak cisteina u svim je tretmanima doveo do pojačane ekspresije navedenih proteina, ne samo u odnosu na tretmane bez cisteina, nego i u odnosu na kontrolu. Za protein veličine oko 28 kDa (žuti pravokutnik) zabilježen je sličan trend te je uočena smanjena ekspresija u tretmanima sa svim oblicima srebra u odnosu na kontrolu, dok je dodatak cisteina značajno pojačao ekspresiju ovog proteina u svim kombiniranim tretmanima u odnosu na kontrolu i tretmane bez cisteina. Ekspresija proteina od oko 20 kDa (crni pravokutnik) također je bila smanjena u svim tretmanima srebrom u odnosu na kontrolu, dok je intenzitet vrpce u kombiniranim tretmanima s cisteinom bio jednak kontroli.



Slika 40. Razlike u ekspresiji ukupnih topivih proteina klijanaca duhana tretiranih sa 100 μ M AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, te njihove kombinacije s 500 μ M cisteinom nakon provedene SDS-PAG elektroforeze i bojanja gela bojom CBB (A) i AgNO₃ (B). M – biljezi molekulskih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 100 μ M AgNP-PVP, 2 – 100 μ M AgNP-CTAB, 3 – 100 μ M AgNO₃, 4 – 100 μ M AgNP-PVP + 500 μ M cys, 5 – 100 μ M AgNP-CTAB + 500 μ M cys, 6 – 100 μ M AgNO₃ + 500 μ M cys

4.11. Imunodetekcija proteina na membrani

Analiza ekspresije enzima SOD detektirala je postojanje jedne izoforme veličine oko 20 kDa prisutne u klijancima duhana (Slika 41A). Iako su svi tretmani srebrom pojačali ekspresiju te izoforme u odnosu na kontrolu, značajna razlika zabilježena je samo na tretmanu s AgNO₃ (Slika 42A). Dodatak cisteina umanjio je ekspresiju SOD u kombiniranom tretmanu s AgNO₃ u odnosu na tretman bez cisteina, te se dobivena vrijednost nije značajno razlikovala od kontrolne. Kombinirani tretman cisteina s AgNP-CTAB također je pojačao ekspresiju SOD u odnosu na kontrolu, ali i odgovarajući tretman bez cisteina, ukazujući na to da mehanizam djelovanja AgNP-CTAB nije ovisan o ionima Ag⁺.

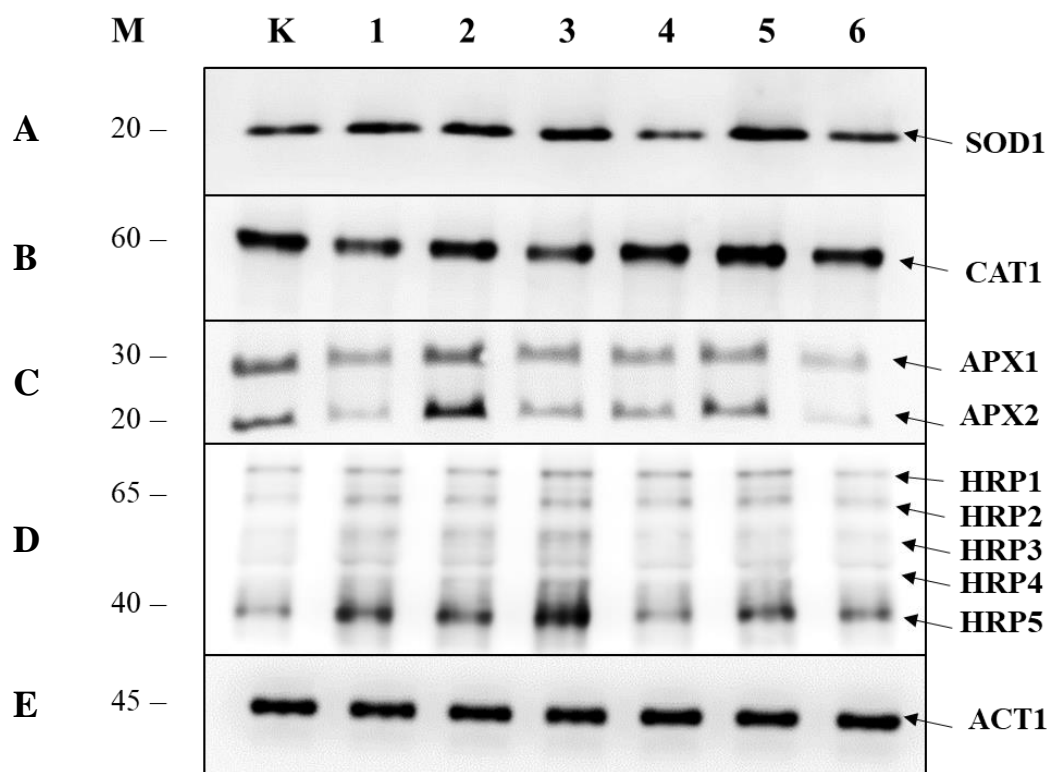
Na membrani koja prikazuje ekspresiju enzima CAT detektirala sam jednu izoformu veličine oko 60 kDa (Slika 41B). Analiza dobivenih vrpca na membrani pokazala je smanjenu ekspresiju CAT na tretmanima sa 100 μM AgNP-PVP i AgNO₃ u odnosu na kontrolu, dok je ekspresija vrpce nakon izlaganja AgNP-CTAB pokazala intenzitet sličan kontroli (Slika 42B). Dodatak cisteina značajno je umanjio utjecaj AgNP-PVP na promjenu ekspresije CAT, dok isto nije bilo zabilježeno u kombiniranom tretmanu s AgNO₃.

Imunodetekcija APX pokazala je postojanje dvije izoforme ovog proteina prisutne u klijancima duhana, veličine oko 30 kDa (APX1) i 20 kDa (APX2) (Slika 41C). Analizom je utvrđena različita ekspresija ovih izoformi u tkivu klijanaca nakon tretmana (Slika 42C). Izoforma APX1 nije pokazala značajne razlike u ekspresiji tijekom tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃. Ipak, značajno smanjenje zabilježeno je nakon svih kombiniranih tretmana s cisteinom u odnosu na kontrolu i tretmane bez cisteina. Izoforma APX2 pokazala je značajno povećanje ekspresije samo u tretmanu s AgNP-CTAB u odnosu na kontrolu, što je smanjeno dodakom cisteina. Smanjenje ekspresije APX2 detektirano je i na kombiniranim tretmanima AgNP-PVP i AgNO₃ s cisteinom u odnosu na kontrolu i tretmane bez cisteina.

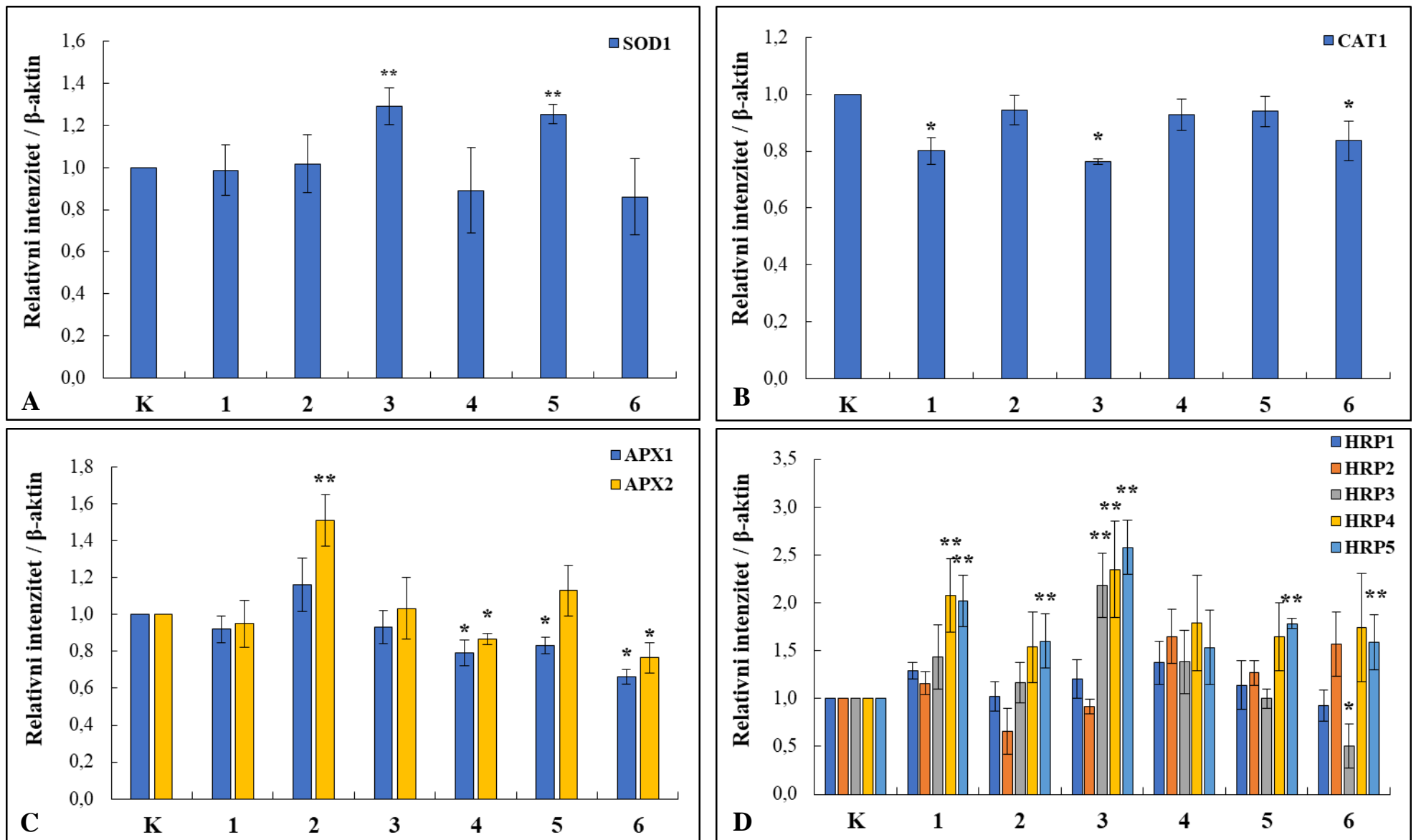
Analiza membrane nakon imunodetekcije enzima HRP u klijancima duhana otkrila je ekspresiju pet izoformi veličina od 70 kDa (HRP1), 65 kDa (HRP2), 55 kDa (HRP3), 50 kDa (HRP4) i 40 kDa (HRP5) (Slika 41D). Izoforme HRP1 i HRP2 bile su jednako ekspimirane u kontroli i svim tretmanima srebrom, kao i u kombiniranim tretmanima srebra i cisteina (Slika 42D). Ekspresija izoforme HRP3 značajno se povećala samo nakon tretmana s AgNO₃ u odnosu na kontrolu, a dodatkom cisteina ekspresija se značajno smanjila u odnosu na tretman bez cisteina i

kontrolu. Na pojačanu ekspresiju izoforme HRP4 utjecali su tretmani s AgNP-PVP i AgNO₃, dok je dodatak cistena vratio na kontrolnu vrijednost. Najveće promjene zabilježene su u ekspresiji izoforme HRP5. Svi su tretmani srebrom značajno pojačali ekspresiju ove izoforme u odnosu na kontrolu, što je bilo najviše izraženo u tretmanu s AgNO₃. Dodatak cisteina dobivene je vrijednosti značajno približio kontrolnim samo u kombiniranom tretmanu s AgNP-PVP, iako je pozitivan utjecaj cisteina vidljiv i nakon tretmana s AgNO₃. S druge strane, dodatak cisteina tretmanu s AgNP-CTAB nije izazvao značajne promjene u ekspresiji HRP5 u odnosu na tretman bez cisteina, te je vrijednost ostala značajno veća od kontrolne.

Ekspresiju proteina ACT koristila sam kao kontrolu nanošenja uzoraka i za normalizaciju dobivenih vrijednosti intenziteta. Analizom membrane nakon imunodetekcije ACT detektirana je jedna izoforma veličine oko 45 kDa čija je ekspresija u tkivu klijanaca bila jednaka u svim primijenjenim tretmanima (Slika 41E).



Slika 41. Imunodetekcija proteina SOD (A), CAT (B), APX (C), HRP (D) i ACT (E) u klijanacima duhana tretiranih sa 100 μ M AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, te njihove kombinacije s 500 μ M cisteinom (cys) nakon provedene SDS-PAG elektroforeze i prijenosa na nitroceluloznu membranu. M – biljezi molekularnih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 100 μ M AgNP-PVP, 2 – 100 μ M AgNP-CTAB, 3 – 100 μ M AgNO₃, 4 – 100 μ M AgNP-PVP + 500 μ M cys, 5 – 100 μ M AgNP-CTAB + 500 μ M cys, 6 – 100 μ M AgNO₃ + 500 μ M cys.



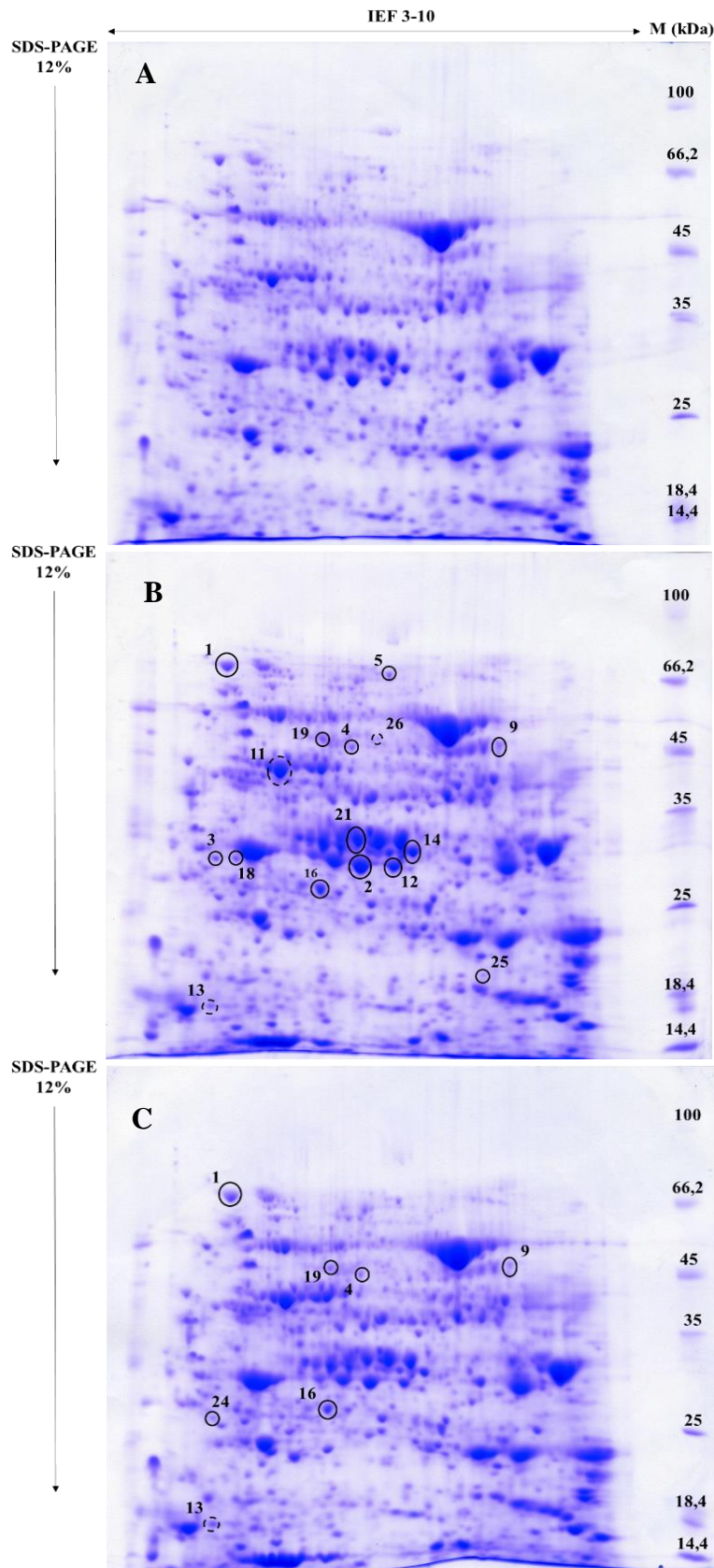
Slika 42. Analiza ekspresije proteina SOD (A), CAT (B), APX (C) i HRP (D) u klijancima duhana tretiranih sa 100 μ M AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, te njihove kombinacije s 500 μ M cisteinom (cys) nakon provedene SDS-PAG elektroforeze i prijenosa na nitroceluloznu membranu. Rezultati su normalizirani prema ekspresiji β -aktina i prikazuju srednju vrijednost tri replike \pm standardna pogreška. Jednostruka zvjezdica (*) označava smanjenu, a dvostruka zvjezdica (**) pojačanu ekspresiju u odnosu na kontrolu ($p \leq 0,05$) nakon provedene jednosmjerne ANOVA i post-hoc Duncan testa. K – kontrola, 1 – 100 μ M AgNP-PVP, 2 – 100 μ M AgNP-CTAB, 3 – 100 μ M AgNO₃, 4 – 100 μ M AgNP-PVP + 500 μ M cys, 5 – 100 μ M AgNP-CTAB + 500 μ M cys, 6 – 100 μ M AgNO₃ + 500 μ M cys.

4.12. Promjene u proteomu

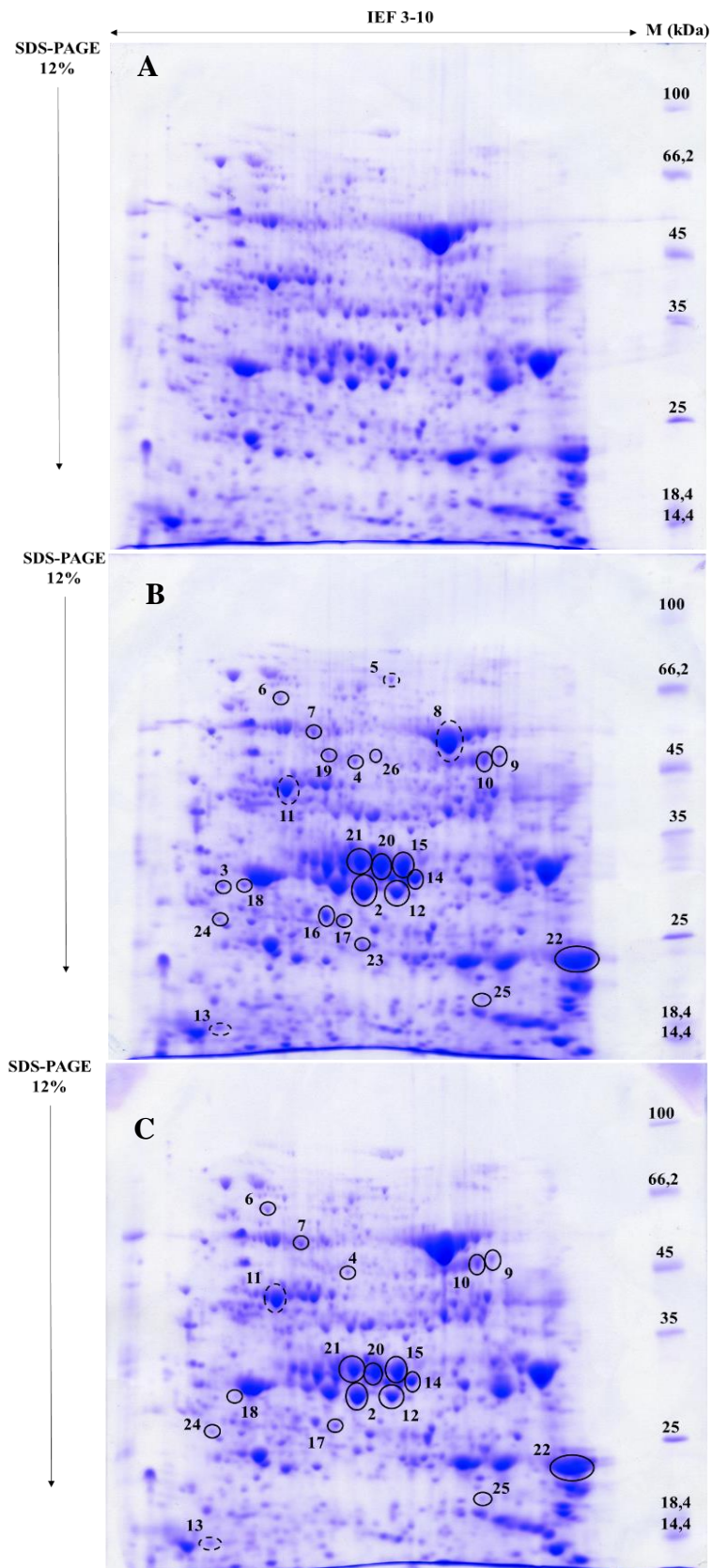
Razlike u ekspresijskim profilima proteina klijanaca duhana tretiranih sa 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ te njihove kombinacije sa 500 μM cisteinom utvrdila sam nakon provedene dvodimenzionalne elektroforeze te računalne analize dobivenih gelova, a rezultati kvantitativne obrade gelova prikazani su na slikama 43, 44 i 45.

U tkivu klijanaca duhana ukupno je detektirano 26 proteinskih mrlja koje su pokazale značajnu razliku u ekspresiji između kontrole i ispitivanih tretmana, a njihova identifikacija rezultirala je pronalaskom ukupno 21 proteina, čija je ekspresija u tretmanima uglavnom bila pojačana u odnosu na kontrolu. U tretmanu s AgNP-PVP promjena ekspresije zabilježena je za ukupno 13 proteina, od kojih je 10 imalo pojačanu ekspresiju u odnosu na kontrolu, dok je ekspresija tri proteina bila značajno smanjena (Slika 43B). Dodatkom cisteina tretmanu s AgNP-PVP, broj diferencijalno eksprimiranih proteina se smanjio na 6, od kojih je 5 zadržalo pojačanu, a jedan smanjenu ekspresiju u odnosu na kontrolu (Slika 43C). U tretmanu s AgNP-CTAB zabilježen je najveći broj diferencijalno eksprimiranih proteina u odnosu na kontrolu, ukupno 21, od kojih je 17 imalo pojačanu, a četiri smanjenu ekspresiju (Slika 44B). Dodatkom cisteina taj se broj smanjio na ukupno 13 proteina, pri čemu je njih 11 zadržalo pojačanu, a dva smanjenu ekspresiju u usporedbi s kontrolom (Slika 45C). Analiza gelova nakon tretmana s AgNO₃ pokazala je 15 diferencijalno eksprimiranih proteina u odnosu na kontrolu, od kojih je 13 proteina imalo pojačanu, a dva smanjenu ekspresiju (Slika 45B). U kombiniranom tretmanu AgNO₃ i cisteina došlo je do smanjenja ukupnog broja proteina s razlikovnom ekspresijom; od 6 detektiranih proteina 5 ih je zadržalo pojačanu ekspresiju, a jedan smanjenu (Slika 45C).

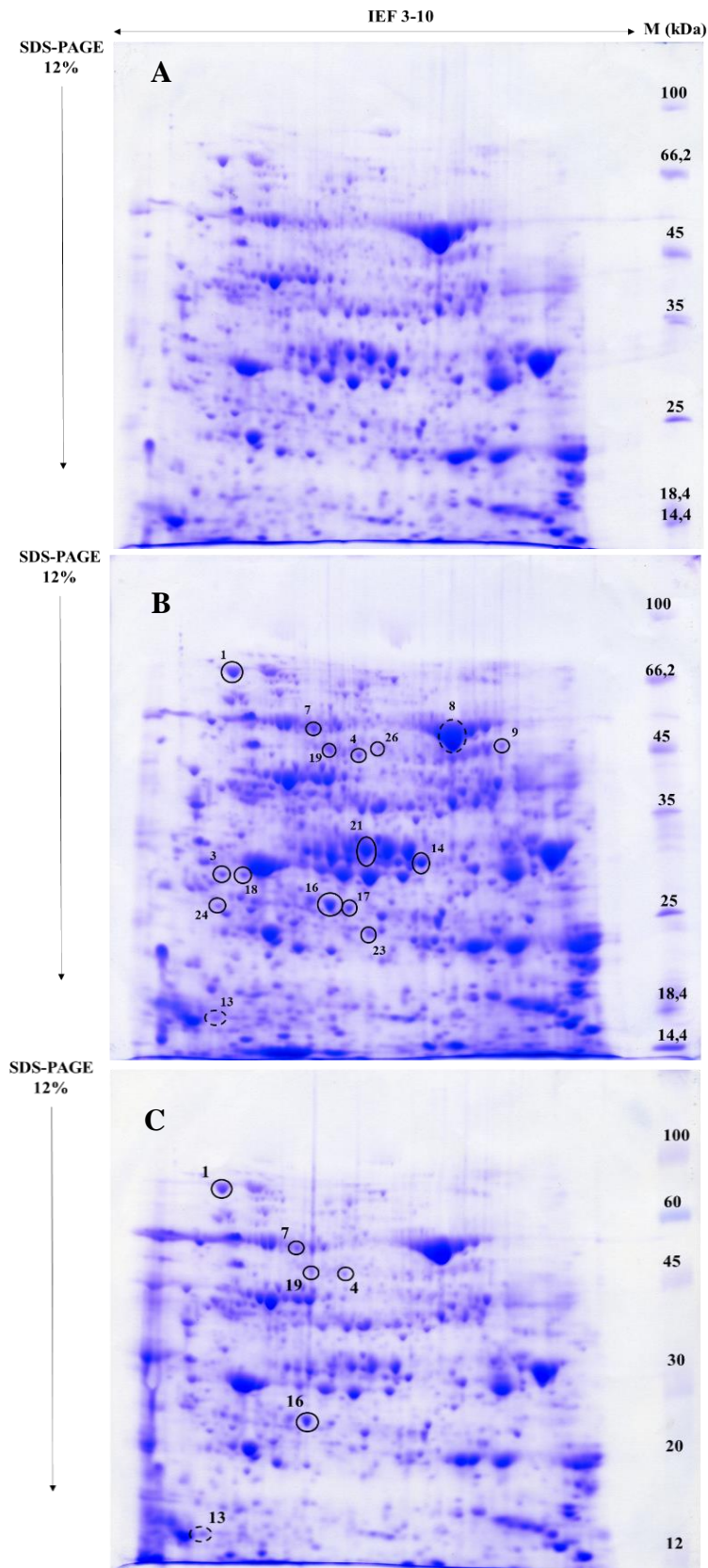
Od ukupnog broja diferencijalno eksprimiranih proteina u klijanima duhana, samo je 8 proteina pokazalo jednak odgovor nakon izlaganja svim tretmanima sa samim srebrom, pri čemu je 7 proteina pokazalo pojačanu, a jedan smanjenu ekspresiju (Tablica 11). Najveće preklapanje u odgovoru pokazali su tretmani s AgNP-CTAB i AgNO₃, koji su izazvali identične promjene u ekspresiji 14 proteina. U tretmanima s dva tipa AgNP detektirano je 11 zajedničkih proteina, dok su tretmani AgNP-PVP i AgNO₃ pokazali istovjetan odgovor za 10 proteina.



Slika 43. Topivi proteini kontrolnih klijanaca duhana (A) te klijanaca tretiranih sa 100 μM AgNP-PVP (B) i kombinacijom 100 μM AgNP-PVP i 500 μM cisteina, razdvojeni dvodimenzionalnom elektroforezom. M – biljezi molekulske mase (kDa), IEF 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove molekulske mase. Proteini čija se ekspresija statistički značajno razlikuje od kontrole ($p \leq 0.05$) označeni su brojevima 1-26. Proteini s povećanom ekspresijom u odnosu na kontrolu označeni su punim (\odot), a oni sa smanjenom ekspresijom isprekidanim kružnicama (\ominus).



Slika 44. Topivi proteini kontrolnih klijanaca duhana (A) te klijanaca tretiranih sa 100 μM AgNP-CTAB (B) i kombinacijom 100 μM AgNP-CTAB i 500 μM cisteina, razdvojeni dvodimenzionalnom elektroforezom. M – biljezi molekularnih masa (kDa), IEF 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove molekulske mase. Proteini čija se ekspresija statistički značajno razlikuje od kontrole ($p \leq 0.05$) označeni su brojevima 1-26. Proteini s povećanom ekspresijom u odnosu na kontrolu označeni su punim (\circ), a oni sa smanjenom ekspresijom isprekidanim kružnicama (\odot).



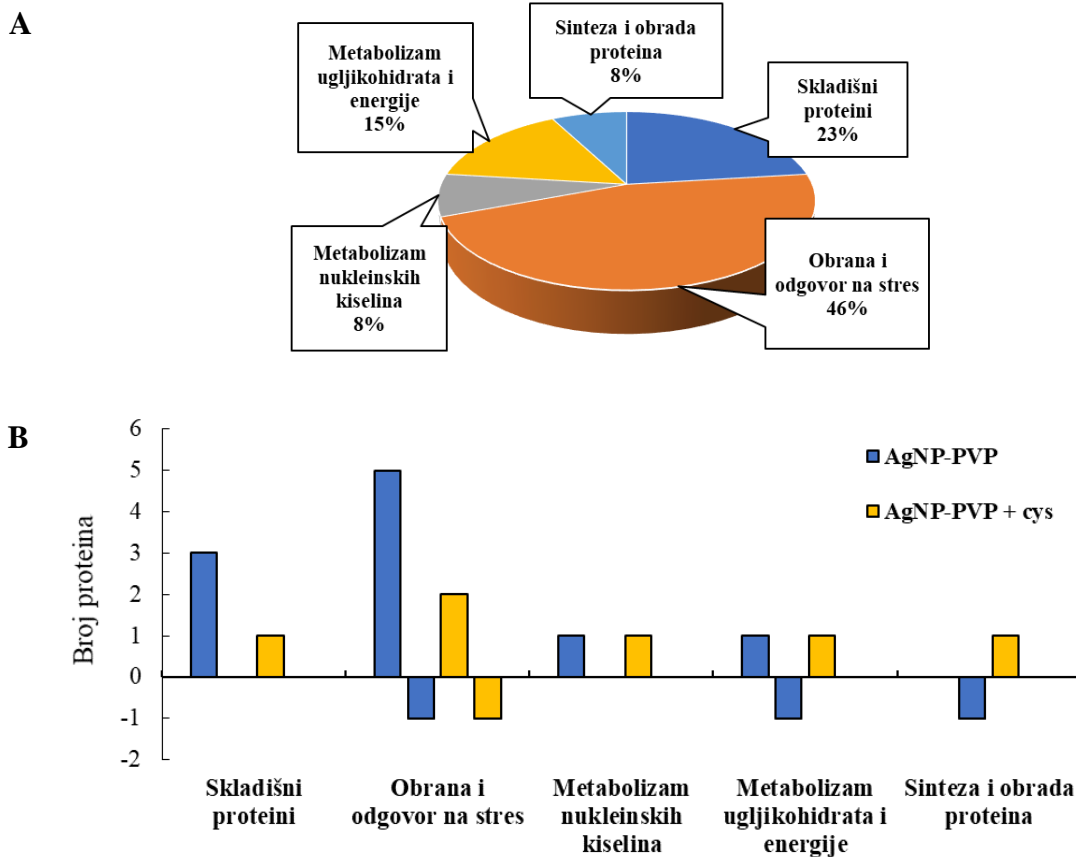
Slika 45. Topivi proteini kontrolnih klijanaca duhana (A) te klijanaca tretiranih sa 100 μM AgNO_3 (B) i kombinacijom 100 μM AgNO_3 i 500 μM cisteina, razdvojeni dvodimenzionalnom elektroforezom. M – biljezi molekulske mase (kDa), IEF 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove molekulske mase. Proteini čija se ekspresija statistički značajno razlikuje od kontrole ($p \leq 0.05$) označeni su brojevima 1-26. Proteini s povećanom ekspresijom u odnosu na kontrolu označeni su punim (\odot), a oni sa smanjenom ekspresijom isprekidanim kružnicama (\ominus).

4.13. Identifikacija i kategorizacija diferencijalno eksprimiranih proteina

Proteine koji su pokazali značajnu razliku u ekspresiji prilikom tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ te njihove kombinacije s cisteinom, nakon identifikacije kategorizirala sam u pet funkcionalnih skupina ovisno o lokalizaciji, molekularnoj funkciji te biološkom procesu u kojem sudjeluju (Tablica 14), pri čemu je bio primjetan specifičan odgovor klijanaca duhana na tretman različitim oblicima srebra.

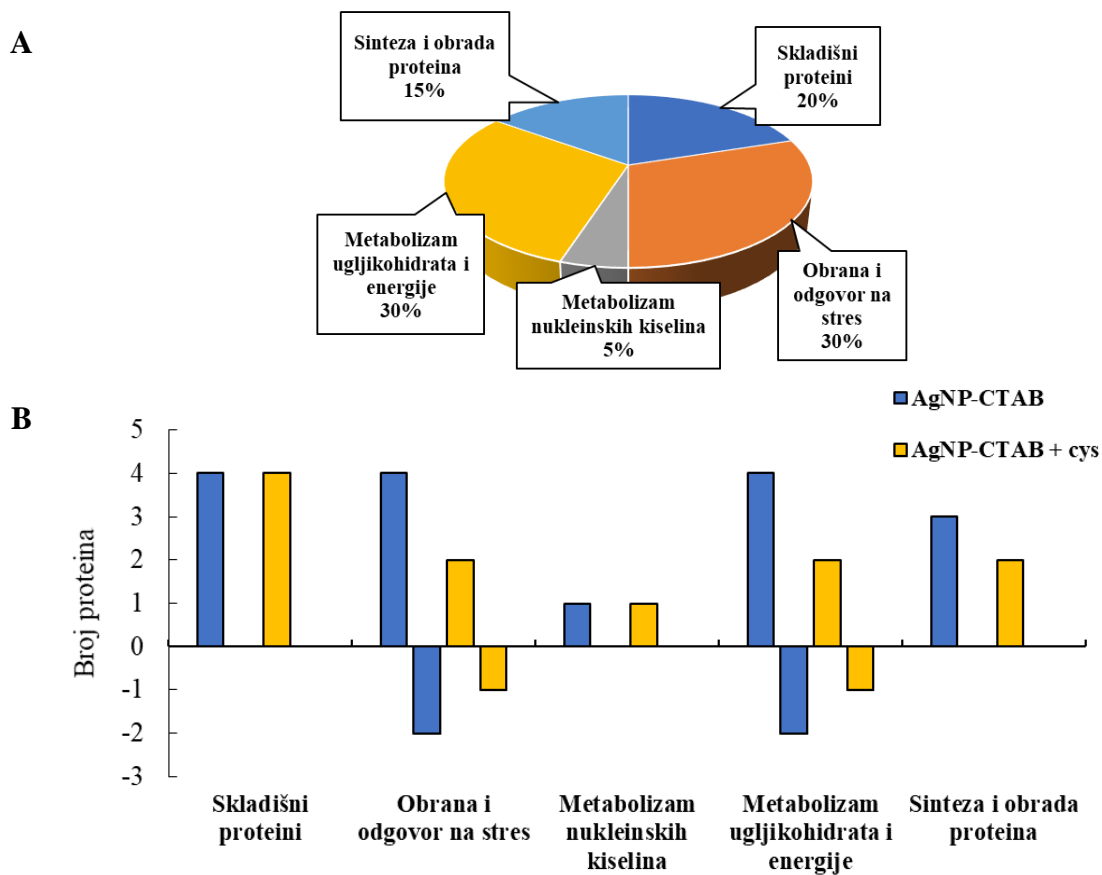
Najveću skupinu proteina uključenih u odgovor na tretman AgNP-PVP činili su proteini uključeni u obranu i odgovor na stres (46%, Slika 46A), gdje je zabilježena pojačana ekspresija pet proteina važnih za obranu biljke i metabolizam glutationa te smanjena ekspresija jednog proteina uključenog u odgovor na patogenezu, dok jedan protein nije bio različito eksprimiran u odnosu na kontrolu (Slika 46B). U kombiniranom tretmanu AgNP-PVP i cisteina pojačana ekspresija zabilježena je za samo dva proteina od pet detektiranih u tretmanu sa samim AgNP-PVP, jedan protein je bio slabije eksprimiran, a za četiri proteina koji su bili razlikovno eksprimirani u tretmanu sa samim AgNP-PVP nije zabilježena promjena u ukupnoj ekspresiji. Prema udjelu zastupljenosti, sljedeću skupinu čine skladišni proteini (23%), čija je glavna funkcija skladištenje hranjivih tvari. Nakon izlaganja samim AgNP-PVP, za tri identificirana proteina zabilježena je pojačana ekspresija, a jedan je bio jednako eksprimiran u odnosu na kontrolu, dok je u kombiniranom tretmanu s cisteinom samo jedan od proteina iz ove skupine pokazao promjenu ekspresije u odnosu na kontrolu. Proteini iz skupine metabolizma ugljikohidrata i energije čine 15% diferencijalno eksprimiranih proteina u tretmanu AgNP-PVP, a riječ je o proteinu uključenom u proces fotosinteze, čija je ekspresija u tretmanu bila značajno smanjena u odnosu na kontrolu, dok je protein uključen u Krebsov ciklus pokazao pojačanu ekspresiju. Ekspresija ostala četiri proteina iz ove skupine nije pokazala promjenu u tretmanu s AgNP-PVP, a sličan odgovor pokazao je i kombinirani tretman s cisteinom, gdje je samo za jedan protein uključen u Krebsov ciklus zabilježena pojačana ekspresija u odnosu na kontrolu. S najmanjim udjelom u proteomskom odgovoru klijanaca na tretman AgNP-PVP sudjelovali su proteini uključeni u metabolizam nukleinskih kiselina (8%), gdje je S-adenozilmetionin sintaza, uključena u metabolizam 1-ugljika, imala povećanu ekspresiju u tretmanu sa samim AgNP-PVP, ali i u kombiniranom tretmanu s cisteinom. S istim udjelom (8%) bili su zastupljeni i proteini odgovorni za sintezu i obradu proteina, gdje je od tri identificirana proteina samo jedan, protein disulfid-izomeraza, pokazao značajno smanjenu ekspresiju u tretmanu s AgNP-PVP u odnosu na kontrolu. Zanimljivo, proteosomalna

podjedinica alfa tipa, koja nije pokazala značajnu promjenu u tretmanu sa samim AgNP-PVP, dodatkom cisteina bila je znatno jače eksprimirana u odnosu na kontrolu.



Slika 46. Zastupljenost funkcionalnih kategorija diferencijalno eksprimiranih proteina u klijancima duhana nakon tretmana sa 100 µM AgNP-PVP u odnosu na kontrolu (A) i funkcionalna kategorizacija nakon tretmana sa 100 µM AgNP-PVP te njihove kombinacije sa 500 µM cisteinom (cys) u odnosu na kontrolu (B). Na pozitivnoj osi ordinate prikazan je broj proteina povećane ekspresije, a na negativnoj osi broj proteina smanjene ekspresije.

U tretmanu s AgNP-CTAB, dvije najveće skupine proteina, obrana i odgovor na stres te metabolizam ugljikohidrata i energije, podjednako su zastupljene sa udjelom od 30% (Slika 47A). Unutar skupine obrane i odgovora na stres, četiri identificirana proteina uključena u odgovor na oksidacijski stres te metabolički put glutationa pokazala su pojačanu ekspresiju u odnosu na kontrolu, dok je ekspresija proteina uključenog u odgovor na patogenezu te molekularnog šaperona uključenog u odgovor na stres bila značajno smanjena (Slika 47B). Kombinirani tretman AgNP-CTAB i cisteina izazvao je pojačanu ekspresiju dva proteina uključena u procese obrane na stres, dok je smanjenje ekspresije, slično kao i nakon tretmana bez cisteina, zabilježeno samo za protein vezan za patogenezu. U skupini metabolizam ugljikohidrata i energije, nakon tretmana s AgNP-CTAB detektirana su četiri pojačano eksprimirana proteina uključena u procese staničnog disanja, fotosinteze i beta-oksidacije masnih kiselina, dok je ekspresija velike podjedinice proteina Rubisco, kao i enzima važnog za njegovu aktivaciju, bila značajno smanjena. U kombiniranom tretmanu s cisteinom zabilježena je promjena u ekspresiji ukupno tri proteina, pri čemu je pojačana ekspresija zabilježena za dva proteina uključena u glikolizu i beta-oksidaciju masnih kiselina, dok je značajno smanjenje ekspresije pokazao protein uključen u aktivaciju enzima Rubisco. U odgovoru klijanaca na tretman s AgNP-CTAB, 20% diferencijalno eksprimiranih proteina činili su skladišni proteini, pri čemu je zabilježena pojačana ekspresija sva četiri identificirana proteina ove skupine u tretmanima sa i bez cisteina. Sljedeću skupinu prema zastupljenosti čini sinteza i obrada proteina (15%), u kojoj je nakon izlaganja tretmanu s AgNP-CTAB zabilježena pojačana ekspresija sva tri identificirana proteina važna za procese smatanja i katabolizma proteina, dok je dodatak cisteina rezultirao povećanom ekspresijom dva proteina iz ove skupine. Najmanju zastupljenost u odgovoru klijanaca duhana na tretman AgNP-CTAB imala je skupina metabolizam nukleinskih kiselina (5%), gdje je ekspresija S-adenozilmetionin sintaze bila pojačana i u tretmanu sa samim AgNP-CTAB i u njegovoj kombinaciji s cisteinom.

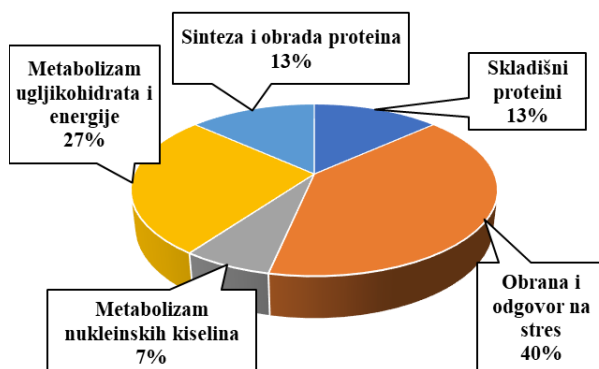


Slika 47. Zastupljenost funkcionalnih kategorija diferencijalno eksprimiranih proteina u klijancima duhana nakon tretmana sa 100 μM AgNP-CTAB u odnosu na kontrolu (A) i funkcionalna kategorizacija nakon tretmana sa 100 μM AgNP-CTAB te njihove kombinacije sa 500 μM cisteinom (cys) u odnosu na kontrolu (B). Na pozitivnoj osi ordinate prikazan je broj proteina povećane ekspresije, a na negativnoj osi broj proteina smanjene ekspresije.

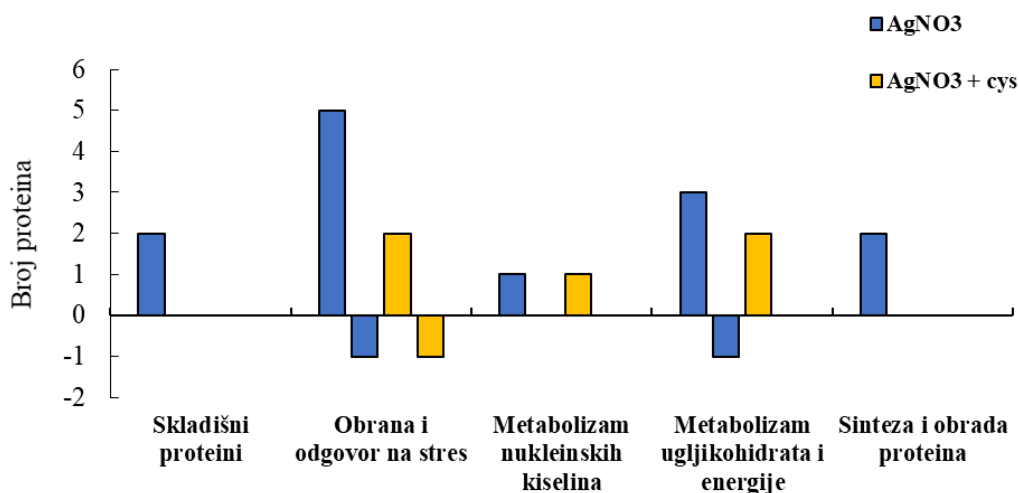
Nakon tretmana s AgNO_3 , 40% diferencijalno eksprimiranih proteina pripadalo je skupini obrana i odgovor na stres (Slika 48A). Ukupno pet identificiranih proteina, uključnih u odgovor na stres ili metabolički put glutationa, pokazalo je pojačanu ekspresiju u tretmanu u odnosu na kontrolu, dok je smanjenje ekspresije zabilježeno samo za protein vezan za patogenezu (Slika 48B). U kombiniranom tretmanu s cisteinom, dva proteina uključena u odgovor na stres bila su pojačano eksprimirana, dok je smanjenje ekspresije, kao i u tretmanu bez cisteina, bilo zabilježeno za protein vezan za patogenezu. Proteini iz skupine metabolizam ugljikohidrata i energije činili su 27% diferencijalno eksprimiranih proteina. Među njima, pojačanu ekspresiju pokazala su tri proteina uključena u procese glikolize, Krebsovog ciklusa te fotosinteze. Slično kao u tretmanu s AgNP-

CTAB, i AgNO_3 je izazvao značajno smanjenje ekspresije proteina Rubisco, dok za dva proteina nisu zabilježene značajne promjene. U kombiniranom tretmanu s cisteinom, značajne promjene zabilježene su samo u povećanoj ekspresiji dva proteina vezana uz proces staničnog disanja. Sljedeća skupina prema zastupljenosti (13%) okuplja proteine važne za sintezu i obradu proteina, a u tretmanu s AgNO_3 zabilježena je pojačana ekspresija dva proteina uključena u smatanje proteina i njihovu kataboličku razgradnju. Kombinirani tretman AgNO_3 i cisteina nije izazvao značajne promjene u ekspresiji proteina ove skupine. Skladišni proteini također čine 13% diferencijalno eksprimiranih proteina u tretmanu s AgNO_3 , gdje je izmjerena pojačana ekspresija dva proteina u odnosu na kontrolu, što nije zabilježeno nakon dodatka cisteina. Najmanje zastupljenu skupinu čine proteini uključeni u metabolizam nukleinskih kiselina (7%), gdje je pojačana ekspresija jednog proteina bila detektirana u tretmanu s AgNO_3 , sa i bez cisteina.

A



B



Slika 48. Zastupljenost funkcionalnih kategorija diferencijalno eksprimiranih proteina u klijancima duhana nakon tretmana sa $100 \mu\text{M}$ AgNO_3 u odnosu na kontrolu (A) i funkcionalna kategorizacija nakon tretmana sa $100 \mu\text{M}$ AgNO_3 te njihove kombinacije sa $500 \mu\text{M}$ cisteinom (cys) u odnosu na kontrolu (B). Na pozitivnoj osi ordinate prikazan je broj proteina povećane ekspresije, a na negativnoj osi broj proteina smanjene ekspresije.

Tablica 11. Diferencijalno eksprimirani proteini, njihove biološke i molekularne funkcije te stanične lokalizacije u klijancima duhana nakon tretmana sa 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ te njihove kombinacije sa 500 μM cisteinom. Za tretmane samim AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ strelica prema gore (\uparrow) označava pojačanu, strelica prema dolje (\downarrow) smanjenu, a znak jednako (=) podjednaku ekspresiju u odnosu na kontrolu, dok za kombinirane tretmane s cisteinom zvjezdica (*) označava smanjenu, a dvostruka zvjezdica (**) pojačanu ekspresiju u odnosu na kontrolu ($p \leq 0,05$) nakon provedene jednosmjerne ANOVA i post-hoc Duncan testa.

Broj proteinske mrlje	Ime proteina	MW (kDa)	pI	Molekularna funkcija	Biološki proces	Lokalizacija	Diferencijalna ekspresija		
							AgNP-PVP	AgNP-CTAB	AgNO ₃
<i>Skladišni proteini</i>									
2, 12, 25	legumin A	53,6	8,35	skladištenje hranjivih tvari	skladišni protein	vakuola	\uparrow	\uparrow^{**}	=
9	antimikrobni peptidi poput vicilina 2-3	94,6	7,05	skladištenje hranjivih tvari	skladišni protein	vakuola	\uparrow^{**}	\uparrow^{**}	\uparrow
14, 21	11S globulin beta podjedinica	56,7	8,27	skladištenje hranjivih tvari	skladišni protein	vakuola	\uparrow	\uparrow^{**}	\uparrow
15, 20, 22	11S globulin 2 skladišni protein sjemenke	55,6	7,58	skladištenje hranjivih tvari	skladišni protein	vakuola	=	\uparrow^{**}	=
<i>Obrana i odgovor na stres</i>									
1	70 kDa protein toplinskog šoka	75,3	5,38	vezanje na proteine u nesmotanom stanju	odgovor na stres, smatanje proteina	kloroplast	\uparrow^{**}	=	\uparrow^{**}
3	glutation S transferaza L3 izoforma X2	27,0	4,91	aktivnost transferaze	metabolički put glutaciona	citoplazma	\uparrow	\uparrow	\uparrow
18	glutation S transferaza L3 izoforma X1	27,3	5,10	aktivnost transferaze	metabolički put glutaciona	citoplazma	\uparrow	\uparrow^{**}	\uparrow
5	Hsp70-Hsp90 organizirajući protein 2	55,5	5,99	šaperon	odgovor na stres	citoplazma, jezgra	\uparrow	\downarrow	=
13	1C protein povezan s patogenezom	20,5	5,68	protein vezan za patogenezu	odgovor na stres	vanstanični prostor	\downarrow^*	\downarrow^*	\downarrow^*
16	citoplazma askorbat peroksidaza	27,4	5,67	peroksidazna aktivnost	odgovor na oksidacijski stres	citoplazma	\uparrow^{**}	\uparrow	\uparrow^{**}
17	L-askorbat peroksidaza	27,5	5,85	peroksidazna aktivnost	odgovor na oksidacijski stres	citoplazma	=	\uparrow^{**}	\uparrow

Tablica 11. – nastavak

<i>Metabolizam nukleinskih kiselina</i>									
4	S-adenozilmetionin sintaza	42,6	6,05	transferazna aktivnost	1-ugljik metabolizam	citoplazma	↑**	↑**	↑**
<i>Metabolizam ugljikohidrata i energije</i>									
7	fosfopiruvat hidrataza	47,8	5,57	lijazna aktivnost	glikoliza	citoplazma	=	↑**	↑**
8	ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza, velika podjedinica	52,9	6,87	oksidoreduktazna aktivnost	fotosinteza, fotorespiracija	kloroplast	=	↓	↓
10	3-ketoacil-CoA tiolaza 2	48,8	7,56	aciltransferazna aktivnost	beta-oksidacija masnih kiselina	peroksisomi	=	↑**	=
11	ribuloza bifosfat karboksilaza/oksidogenaza aktivaza 2	48,3	7,74	ATPazna aktivnost, aktivacija enzima Rubisco	fotosinteza	kloroplast	↓	↓*	=
19	dihidrolipoilzinski-ostatak sukciniltransferaza	51,1	8,70	transferazna aktivnost	Krebsov ciklus	mitohondrij	↑**	↑	↑**
23	klorofil a-b vezajući protein	29,3	8,68	vezanje klorofila	fotosinteza	kloroplast	=	↑	↑
<i>Sinteza i obrada proteina</i>									
6	šaperonin 60, podjedinica beta 2	63,2	5,66	šaperon	smatanje proteina	kloroplast	=	↑**	=
24	proteasomalna podjedinica alfa tipa	26,0	4,82	endopeptidazna aktivnost	katabolički proces proteina	citoplazma	=**	↑**	↑
26	protein disulfid-izomeraza	27,5	8,41	izomerazna aktivnost	smatanje proteina	endoplazmatski retikulum	↓	↑	↑

RASPRAVA

5. RASPRAVA

U ovom radu istražila sam utjecaj AgNP stabiliziranih s dva omotača (PVP i CTAB) na isključavanje i rani rast, pojavu oksidacijskog stresa i promjene u proteomu klijanaca duhana. Kako bih ispitala mehanizam djelovanja AgNP, provodila sam usporednu analizu klijanaca tretiranih s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, a kako bih utvrdila uolikoj mjeri fitotoksičnom učinku AgNP doprinose otpušteni ioni Ag⁺, koristila sam i kombinirane tretmane s cisteinom. Svemu je prethodilo detaljno ispitivanje fizikalno-kemijskih karakteristika AgNP-PVP i AgNP-CTAB te provjera njihove stabilnosti u hranjivoj podlozi za izlaganje biljaka.

5.1. Utjecaj fizikalno-kemijskih karakteristika AgNP-PVP i AgNP-CTAB

Ovisnost utjecaja fizikalno-kemijskih karakteristika AgNP na njihovu stabilnost, unos te biološke interakcije potvrđena je mnogim istraživanjima, pri čemu autori kao odlučujući čimbenik njihove toksičnosti posebno ističu veličinu korištenih AgNP (Cvjetko i sur. 2017, Cvjetko i sur. 2018, Jiang i sur. 2014, Yin i sur. 2012, Rastogi i sur. 2017). Naime, AgNP manjih dimenzija imaju sposobnost prolaska kroz pore stanične stijenke biljaka, što im omogućava direktan unos i olakšava daljnju translokaciju (Tripathi i sur. 2017b). Osim toga, veliki omjer površine i volumena kod malih AgNP efektivno pojačava njihovu reaktivnu površinu, a veći broj atoma u izravnom kontaktu s oksidansima u okolini može uzrokovati i otpuštanje iona Ag⁺, što dodatno doprinosi pojačanju njihove toksičnosti u odnosu na veće AgNP (Zhao i Wang 2012). Ipak, veličina AgNP nije predstavljala glavni parametar toksičnosti AgNP u mom istraživanju. AgNP-CTAB, čiji je promjer iznosio oko 70 nm, pokazale su značajno negativniji utjecaj u odnosu na AgNP-PVP od 40 nm, pri gotovo svim ispitivanim parametrima na klijanima duhana. Razlike u omotaču koji se koristi za stabilizaciju AgNP ovdje su se pokazale kao važniji faktor u procjeni njihove toksičnosti. Naime, upotreba omotača definira oblik i naboj AgNP te značajno utječe na njihovu agregaciju i otapanje (Akter i sur. 2018). Osim toga, primjena kationskih i anionskih omotača koja omogućava kontrolu elektrokinetičkih svojstava AgNP, važnu za njihovu stabilizaciju u suspenziji, također uvjetuje i njihovu interakciju s važnim biomolekulama (Tolaymat i sur. 2010, Matras i sur. 2022). Jak toksični učinak pozitivno nabijenih AgNP-CTAB stoga se može pripisati njihovom vezanju za negativno nabijenu staničnu stijenku. Značajno jači toksični učinak AgNP-CTAB u odnosu na nenabijene AgNP-PVP te negativno nabijene AgNP-citrat zabilježen je i u istraživanjima na luku (Cvjetko i sur. 2017) te odraslim biljkama duhana (Peharec Štefanić i sur. 2021). Uz to, i drugi tipovi AgNP stabilizirani pozitivno nabijenim molekulama, poput AgNP-cistamina

(Barbasz i sur. 2018) i AgNP-DDAB (Barabanov i sur. 2018) također su pokazali jači učinak na biljke u odnosu na AgNP-citrat i AgNP-PVP. Uz veličinu i tip omotača, važan parametar toksičnosti AgNP predstavlja i njihova koncentracija (Yan i Chen 2019). Ovo je istraživanje pokazalo da se negativan utjecaj AgNP-PVP i AgNP-CTAB ispoljava pretežito pri većim koncentracijama tretmana. Slična su zapažanja o postojanju pozitivne korelacije između fitotoksičnosti AgNP i njihove koncentracije zabilježena i u mnogim drugim istraživanjima na biljkama (Mirzajani i sur. 2013, Oukarroum i sur. 2013, Cvjetko i sur. 2017). Međutim, pri tumačenju ove ovisnosti treba imati na umu da koncentracija AgNP prvenstveno uvjetuje njihovo ponašanje u istraživanom sustavu te transformacije u podlozi koja se koristi za tretmane, što svakako komplicira interpretaciju rezultata toksikoloških istraživanja (Metreveli i sur. 2016).

5.2. Stabilnost AgNP-PVP i AgNP-CTAB

AgNP pokazuju najveću stabilnost u medijima niske ionske jakosti i većih pH vrijednosti (De Leersnyder i sur. 2019, Fernando i Zhou, 2019). Međutim, procjena utjecaja AgNP na biljkama često uključuje primjenu dobro definiranih hranjivih podloga čiji je sastav posebno prilagođen vrsti od interesa, a razlike u fizikalno-kemijskim parametrima pojedinih podloga neminovno dovode i do različitih transformacija AgNP nastalih uslijed agregacije i interakcije s anorganskim i organskim komponentama podloge (Seitz i sur. 2015, Metreveli i sur. 2016). Zbog toga se radi točnije interpretacije dobivenih rezultata javlja izrazita potreba za detaljnom karakterizacijom AgNP prije i u tijeku tretmana.

Ovo je istraživanje pokazalo da postoje značajne razlike u stabilnosti AgNP-PVP i AgNP-CTAB u podlozi ½ MS korištenoj za uzgoj i izlaganje klijanaca duhana. Sterička stabilizacija AgNP-PVP pokazala se efikasnijom u odnosu na elektrostatičku stabilizaciju korištenu kod AgNP-CTAB i u krutoj i u tekućoj podlozi. Nakon inicijalne aglomeracije AgNP-PVP u krutoj podlozi, izazvane interakcijom s prisutnim ionima, došlo je do njihove stabilizacije te nisu zabilježene značajne promjene u položaju maksimuma apsorbancije koje bi označile daljnje transformacije AgNP-PVP u tijeku trajanja pokusa. AgNP-PVP su se pokazale relativno stabilne i u tekućoj podlozi ½ MS. Ipak, aglomeracija, koja nije bila značajna u samom početku mjerenja, postupno se pojačavala tijekom 7 dana, a postojanje većih aglomerata dodatno su potvrdila provedena DLS mjerenja. Bolja stabilnost AgNP-PVP u krutoj podlozi u odnosu na tekuću može se pripisati njihovoj dodatnoj stabilizaciji putem Phytagela, prirodnog polimera

koji se koristi za pripremu krutih podloga (Peharec Štefanić i sur. 2018, Biba i sur. 2021b). Sterička stabilizacija AgNP putem nenabijenih polimernih omotača u mnogim se istraživanjima pokazala efikasnom (Moore i sur. 2015, Mogošanu i sur. 2016, Schubert i Chanana 2018). AgNP-PVP pokazale su izrazitu stabilnost u ultra-čistoj vodi tijekom tretmana korjenčića luka (Cvjetko i sur. 2017), ali i u različitim podlogama za uzgoj biljaka, poput 10% Hoaglandove otopine korištene za tretman biljke *S. polyrhiza* (Jiang i sur. 2017) i ½ Hutnerove otopine u kojoj je izlagana biljka *Landoltia punctata* (Stegemeier i sur. 2017). Međutim, zabilježeno je i stvaranje aglomerata u tekućoj podlozi ½ MS korištenoj za tretman odraslih biljaka duhana, koje je ipak bilo manje izraženo u odnosu na AgNP-citrat i AgNP-CTAB istih koncentracija (Peharec Štefanić i sur. 2021), što odgovara mojim rezultatima. Uz to, u istom je istraživanju izmjerena i jača promjena ζ potencijala AgNP-PVP prema negativnim vrijednostima u podlozi, što je također u skladu s mojim rezultatima. Ovakvu promjenu naboja moglo bi uzrokovati stvaranje bio-korone na površini AgNP-PVP (Argentiere i sur. 2016, Barrena i sur. 2009). Naime, interakcija AgNP s biomolekulama prisutnima u hranjivoj podlozi može dovesti do promjene naboja na njihovoj površini te, ovisno o intrinzičnim karakteristikama samih nanočestica, dodatno stabilizirati AgNP ili pospješiti njihovu aglomeraciju (Lv i sur. 2019, Akter i sur. 2018, Moore i sur. 2015), kao što se dogodilo u podlozi ½ MS.

AgNP-CTAB pokazale su različite obrasce ponašanja u krutoj i tekućoj podlozi ½ MS. Iako značajno stabilnije u krutoj podlozi, vjerojatno zbog utjecaja Phytagela, prolaskom vremena zabilježeno je postupno smanjenje veličine AgNP-CTAB izazvano disocijacijom iona Ag^+ s njihove površine. U tekućoj podlozi, s druge strane, došlo je do potpune aglomeracije AgNP-CTAB, koja je u konačnici rezultirala njihovim taloženjem. Stvaranje aglomerata, potvrđeno i DLS analizom, moglo bi biti potaknuto otpuštanjem molekula CTAB s površine AgNP koje je dovelo do njihove destabilizacije. Ovo dodatno potvrđuje promjena ζ potencijala AgNP-CTAB od pozitivnih (+11,4 mV) prema negativnim vrijednostima (-7,0 mV) već od samog dodavanja u podlogu ½ MS. Naime, ovakve vrijednosti površinskog naboja AgNP karakteristične su za nanočestice bez omotača koje u prisutnosti hidroksilnih iona iz otopine poprimaju negativne vrijednosti, dok postojanje iona suprotnih naboja u hranjivoj podlozi smanjuje odbojne sile stvorene među njima te potiče agregaciju (Levard i sur. 2012). Slična su zapažanja dobivena tijekom mjerenja stabilnosti AgNP-CTAB u tekućoj podlozi ½ MS u istraživanju na odraslim biljkama duhana (Peharec Štefanić i sur. 2021), dok su u ultra-čistoj vodi tijekom tretmana korjenčića luka AgNP-CTAB pokazale izrazitu stabilnost (Cvjetko i sur. 2017), pokazujući da

sastav, ionska jakost i pH vrijednost medija imaju snažan utjecaj na transformacije AgNP-CTAB.

Dodatak cisteina uzrokovao je značajan pad stabilnosti oba tipa AgNP. Kod AgNP-PVP to se ponajviše vidjelo u ubrzanom smanjenju veličine uzrokovanom pojačanom disocijacijom iona Ag^+ s njihove površine, što je pokazalo formiranje sekundarnog maksimuma apsorbancije na manjim valnim duljinama i u krutim i u tekućim podlogama $\frac{1}{2}$ MS. Sličan trend zabilježen je i kod AgNP-CTAB u krutim podlogama, dok je u tekućim podlogama pod utjecajem cisteina, uz djelomičnu disocijaciju iona Ag^+ , izraženija bila aglomeracija AgNP-CTAB. Prethodna istraživanja pokazala su da hidrofilni tioli malih molekulskih masa, poput cisteina ili glutationa, umanjuju aglomeraciju i precipitaciju AgNP vezanjem na njihovu površinu i promjenom površinskog naboja, dok istovremeno pospješuju otpuštanje iona Ag^+ s njihove površine (Gondikas i sur. 2010, Gondikas i sur. 2012, Navarro i sur. 2008b), što je u skladu s opažanjima interakcije cisteina i AgNP-PVP u mom istraživanju. Ipak, pokazalo se da u otopinama visoke ionske jakosti prisutnost cisteina može uzrokovati i aglomeraciju AgNP (Gondikas i sur. 2012), što bi moglo objasniti ponašanje AgNP-CTAB u tekućoj podlozi nakon dodatka cisteina. Inicijalna disolucija iona Ag^+ s AgNP-CTAB, praćena otpuštanjem molekula omotača s njihove površine, uzrokuje povećanje ionske jakosti same podloge što rezultira aglomeracijom nanočestica. Osim toga, pH vrijednost podloge $\frac{1}{2}$ MS (5,6) pri kojoj se cistein u otopini nalazi u protoniranom stanju, omogućuje formiranje tiolatne veze između cisteina i izloženih atoma srebra na površini nanočestica što dodatno ubrzava aglomeraciju zbog stvaranja vodikovih veza između karboksilnih i amino skupina obližnjih AgNP-cisteina (Mandal i sur. 2001, Ravindran i sur. 2010).

5.3. Utjecaj na isključavanje i rani rast

Praćenje promjena u isključavanju i ranom rastu biljaka često se koristi za procjenu akutnog utjecaja različitih okolišnih stresora (Wang i sur. 2001, Lin i Xing, 2007). I u ovom istraživanju navedeni parametri pokazali su se kao kvalitetan indikator razlika u toksičnosti i mehanizmu djelovanja različito stabiliziranih AgNP. Tretman s AgNP-CTAB snažno je inhibirao klijanje sjemenki duhana, što je bilo vidljivo u sporijoj dinamici klijanja te smanjenom ukupnom postotku isključanih sjemenki. Uz to, AgNP-CTAB uzrokovale su značajno smanjenje rasta korjenčića i izdanaka, što je rezultiralo smanjenom ukupnom svježom i suhom masom. Mehanizam inhibicije klijanja i biomase biljaka pod utjecajem AgNP još uvijek nije u

potpunosti razjašnjen. Ipak, povećanje sadržaja suhe tvari, izmjereno u tretmanu s AgNP-CTAB, kao i smanjeni sadržaj vode izmjeren u klijancima biljke *Raphanus sativus* nakon tretmana s AgNP (Zuverza-Mena i sur. 2016), mogli bi upućivati na to da razlog leži u smanjenom unosu vode. To potvrđuje i istraživanje na biljci *A. thaliana* koje je pokazalo da AgNP utječu na ravnotežu vode promjenom transkripcije akvaporina (Qian i sur. 2013). AgNP-PVP i AgNO₃ nisu pokazali značajan učinak na parametre isključivanja duhana. Ipak, pri višim koncentracijama tretmana inhibirali su rast korjenčića te negativno utjecali na svježnu masu klijanaca duhana, iako značajno slabije u odnosu na AgNP-CTAB. Fenomen da neke tvari pokazuju inhibitorski učinak na rast biljaka, a pritom ne utječu na isključivanje sjemenki, pripisuje se selektivnoj permeabilnosti sjemenne lupine koja ima važnu ulogu u zaštiti embrija od vanjskih čimbenika (Wierzbička i Obidzinska, 1998, Lin i Xing, 2007). Činjenica da je sjemena lupina zaštitila sjemenke duhana od toksičnog učinka AgNP-PVP i AgNO₃, ali ne i AgNP-CTAB, ukazuje na različit mehanizam njihove toksičnosti. Sličnost u odgovorima na tretmane AgNP-PVP i AgNO₃ navodi na zaključak da je utjecaj AgNP-PVP, barem djelomično, posljedica otpuštanja iona Ag⁺ s njihove površine, što dodatno podupire činjenica da je dodatak cisteina umanjio negativan utjecaj AgNP-PVP i AgNO₃ na rast korjenčića. Tretman s AgNP-PVP također nije pokazao značajan utjecaj na klijanje 11 različitih močvarnih vrsta (Yin i sur. 2012) te sjemenki biljke *Ricinus communis* (Yasur i Rani, 2013), ali je izazvao inhibiciju rasta korijena biljke *Triticum aestivum* u kojemu je nakon tretmana izmjeren i značajan porast sadržaja srebra, iako same AgNP nisu bile detektirane u tkivu nego samo na površini korijena, što također upućuje na jači utjecaj otpuštenih iona Ag⁺ (Vannini i sur. 2014). Neka su istraživanja pokazala da AgNP-PVP mogu imati i pozitivan učinak na rani rast biljaka. Primjerice, AgNP-PVP nisu utjecale na isključivanje sjemenki vrste *E. sativa*, ali su značajno stimulirale rast njihova korjenčića, što je bilo umanjeno dodatkom cisteina (Vannini i sur. 2014). Kod vrste *A. thaliana* pojačani rast korjenčića zabilježen je pri nižoj koncentraciji tretmana, dok je viša koncentracija imala suprotan učinak (Wang i sur. 2020a), slično kao i u mojem istraživanju. Naime, mala povećanja sadržaja ROS u korijenu, koja nastaju tijekom tretmana s AgNP, mogu pospješiti diobu i elongaciju stanica te tako ubrzati rast korjenčića, dok veće koncentracije ROS dovode do oksidacijskih oštećenja koja inhibiraju staničnu diobu i smanjuju njihov rast (Kim i sur. 2014, Wang i sur. 2013b, Wang i sur. 2020a). Ova su opažanja važna radi potencijalne aplikacije AgNP u predstjetvenom tretmanu sjemenki (tzv. *nano-priming*) za poboljšanje njihova prinosa i zaštitu od vanjskih utjecaja (do Espirito Santo Pereira i sur. 2021).

Dodatak cisteina tretmanima s AgNP-CTAB samo je djelomično umanjio njihov inhibitorni učinak na isključavanje sjemenki duhana, a mjerenja duljine korjenčića te promjena u svježoj i suhoj masi pokazala su čak i veću inhibiciju u kombiniranim tretmanima u odnosu na tretman samim AgNP-CTAB, pokazujući da njihova toksičnost samo manjim dijelom potječe od otpuštenih iona Ag⁺. Mjerenja stabilnosti AgNP-CTAB u krutoj podlozi 1/2 MS ukazala su na simultanu disocijaciju i aglomeraciju uslijed otpuštanja omotača CTAB s površine, što se dodatno pojačalo dodatkom cisteina. Toksičnost AgNP-CTAB stoga se može pripisati kombinaciji djelovanja samih nanočestica, otpuštenih iona Ag⁺ te omotača CTAB, što potvrđuje i snažna inhibicija svih mjerenih parametara u tretmanu samim omotačem. Slična su zapažanja dobivena tijekom tretmana sjemenki biljke *Pisum sativum* s AgNP-PVP i AgNP-DDAB; AgNP-PVP nisu imale značajan utjecaj na klijanje i rast korjenčića, dok je snažan inhibitorni učinak izmjeren u tretmanima s AgNP-DDAB i omotačem DDAB, također ukazujući na negativan utjecaj pozitivno nabijenog omotača (Barabanov i sur. 2018). AgNP-CTAB negativno su utjecale i na rast korjenčića *A. cepa*, dok isto nije zabilježeno u tretmanima s AgNP-citrat i AgNP-PVP (Cvjetko i sur. 2017). Pozitivno nabijene AgNP stabilizirane cisteaminom također su izazvale snažniju inhibiciju isključavanja i rasta korijena u usporedbi s negativno nabijenim AgNP stabiliziranim citratom i taninskom kiselinom pri tretmanu vrsta *T. aestivum*, *Sorghum bicolor*, *Lepidium sativum* i *Sinapsis alba*. Inhibicija rasta bila je povezana sa oštećenjem membrana i izljevom elektrolita, što ukazuje da učinak pozitivno nabijenih AgNP proizlazi iz njihove interakcije s negativno nabijenom membranom (Matras i sur. 2022).

5.4. Utjecaj na pojavu oksidacijskog stresa

Mnoga su istraživanja pokazala da izloženost AgNP uzrokuje pojačano stvaranje ROS, koji u interakciji s proteinima, lipidima i molekulama DNA mogu oštetiti biomembrane i izazvati metaboličke poremećaje u stanici te u konačnici dovesti to apoptoze (Yang i sur. 2017, Tkalec i sur. 2019). Glavni mehanizam nastanka ROS u tretmanima s AgNP pripisuje se oksidaciji i otpuštanju iona Ag⁺ s njihove površine (Lubick 2008, Pradas del Real i sur. 2017). To podupiru i rezultati istraživanja na klijancima duhana (Cvjetko i sur. 2018), koji su pokazali veći sadržaj ukupnih ROS nakon tretmana s AgNO₃ u odnosu na tretman s AgNP-citratom. Slično tome, AgNO₃ je uzrokovao značajno povećanje ROS u korijenu *A. cepa* u odnosu na iste koncentracije AgNP-citrata, AgNP-PVP i AgNP-CTAB (Cvjetko i sur. 2017). Također, Li i sur. (2020) pokazali su da je koncentracija H₂O₂ značajno viša u listovima biljke *Lactuca sativa*

nakon tretmana s AgNO_3 u odnosu na AgNP-PVP, neovisno o mjestu apliciranja (korijen ili listovi). Ipak, ne smije se zanemariti ni utjecaj samih nanočestica, koje su u mojem istraživanju pokazale jači potencijal za stvaranje ukupnih ROS u odnosu na iste koncentracije tretmana AgNO_3 . To je u skladu s istraživanjem na biljci *A. thaliana*, gdje je sadržaj H_2O_2 bio značajno veći u tretmanu s AgNP u odnosu na AgNO_3 istih koncentracija (Nair i Chung, 2014a). Osim toga, i Bagherzadeh Homaei i Ehsanpour (2016) su izmjerili snažniju produkciju $\text{O}_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 u biljci *S. tuberosum* nakon tretmana s AgNP u odnosu na tretman s AgNO_3 , koja je dovela do značajnog oštećenja membrana i propuštanja elektrolita. Ovakva nedosljednost rezultata različitih istraživanja može se pripisati razlikama u metodologiji rada koje dovode do promjena u stabilnosti korištenih AgNP te izravno utječu na oblik srebra koji dolazi u kontakt s tretiranom biljkom. Radi boljeg razlučivanja utjecaja AgNP od iona Ag^+ , upotrijebila sam kombinirane tretmane s cisteinom koji su u potpunosti umanjili negativan utjecaj AgNP-PVP i AgNO_3 , sugerirajući da disocijacija iona Ag^+ ima značajan utjecaj na mehanizam stvaranja ROS kod AgNP-PVP. S druge strane, cistein je samo djelomično umanjio utjecaj AgNP-CTAB, pokazujući da ioni Ag^+ imaju samo manju ulogu u njihovoj toksičnosti. Osim toga, značajan porast sadržaja ROS izmjeren je i u tretmanu samim omotačem CTAB, dok isto nije zabilježeno nakon tretmana s omotačem PVP, ukazujući da i način stabilizacije te izbor omotača imaju važnu ulogu u mehanizmu pokretanja oksidacijskog stresa.

Iako nije zabilježena značajna razlika ukupnog sadržaja ROS između tretmana različito stabiliziranih AgNP u mom istraživanju, AgNP-CTAB su izazvale značajan porast koncentracije H_2O_2 koji nije bio izmjeren nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO_3 . Dodatak cisteina umanjio je stvaranje H_2O_2 samo pri nižim koncentracijama kombiniranih tretmana s AgNP-CTAB, a značajno povećanje je izmjereno i nakon tretmana samim omotačem CTAB. Osim toga, samo u tretmanu najvećom koncentracijom AgNP-CTAB te omotačem CTAB izmjereno je i značajno oksidacijsko oštećenje važnih biomolekula, dok isto nije bilo zabilježeno nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO_3 . Oksidacijsko oštećenje lipida, proteina i molekule DNA nastaje kada stvaranje ROS premaši kapacitete antioksidacijskog sustava biljke te nastane stanje oksidacijskog stresa (Tkalec i sur. 2019), a mjerenje sadržaja MDA, važnog produkta lipidne peroksidacije, često se koristi kao prvi pokazatelj takvog stanja. Nair i Chung (2014a) izmjerili su značajno pojačanje lipidne peroksidacije u klijancima *A. thaliana* nakon tretmana s AgNP, ali ne i AgNO_3 , što podupire rezultate koje sam dobila na tretmanu s AgNP-CTAB. S druge strane, istraživanje na vrsti *G. max* pokazalo je da ionski oblik srebra može imati podjednak učinak na sadržaj MDA kao i primijenjene AgNP (Galazzi i sur. 2019), a

zabilježena je i značajno jača razina lipidne peroksidacije u kalusima (Barbasz i sur. 2016) i klijancima vrste *T. aestivum* (Pradas del Real i sur. 2017) te u klijancima duhana (Cvjetko i sur. 2018) nakon tretmana s AgNO₃ u odnosu na tretman AgNP. Ovi rezultati pokazuju da razina oksidacijskog oštećenja lipida u tretmanima s AgNP ovisi o biljnoj vrsti na kojoj se istražuje, a važan utjecaj zasigurno imaju i omotači korišteni za stabilizaciju AgNP. Naime, Cvjetko i sur. (2017) pokazali su značajno povećanje sadržaja MDA na korijenu biljke *A. cepa* nakon tretmana s AgNP-CTAB u odnosu na tretmane AgNP-PVP i AgNP-citrat, koje se ipak nije značajno razlikovalo od tretmana AgNO₃ istih koncentracija. S druge strane, istraživanje na vodenoj biljci *S. polyrhiza* pokazalo je da AgNP-GA (promjera 6 nm) i AgNP-PVP (promjera 20 nm) jednakim intenzitetom izazivaju pojavu lipidne peroksidacije, no kako se u ovom radu primarno istraživala razlika u veličini primijenjenih AgNP, nije moguće donijeti jednoznačne zaključke o samom utjecaju omotača (Jiang i sur. 2014). Ipak, značajno povećanje razine MDA koje sam izmjerila nakon tretmana klijanaca duhana samim omotačem CTAB, ali ne i omotačem PVP, ukazuje na važnu ulogu stabilizacije AgNP.

U ovome sam istraživanju također pokazala značajnu ovisnost sadržaja proteinskih karbonila o apliciranom obliku srebra. Naime, samo je tretman AgNP-CTAB uzrokovao povećanje njihova sadržaja u stanici, što je također bilo zabilježeno i u tretmanu samim omotačem CTAB, dok tretmani AgNP-PVP i AgNO₃ nisu imali isti učinak. Zanimljivo je da je dodatak cisteina tretmanima s AgNP-CTAB značajno umanjio njihov negativan utjecaj na oksidaciju proteina, vjerojatno uslijed smanjene koncentracije ROS u kombiniranim tretmanima, dok povećanje koncentracije karbonila u tretmanu samim omotačem ukazuje na njegovu značajnu ulogu u toksičnosti AgNP-CTAB. Povećana razina proteinskih karbonila izmjerena je i u korijenu vrste *A. cepa* nakon tretmana s AgNP-CTAB, ali i nakon tretmana s AgNP-PVP, AgNP-citrat i AgNO₃ istih koncentracija, pri čemu između navedenih tretmana nisu bile zabilježene značajne razlike (Cvjetko i sur. 2017). Ipak, treba uzeti u obzir da su AgNP-PVP i AgNP-CTAB primijenjene u navedenom istraživanju bile značajno manjih dimenzija (9,4 odnosno 5,6 nm) u odnosu na AgNP korištene u mojem radu, a pokusi provedeni u ultra-čistoj vodi doprinijeli su njihovoj stabilnosti tijekom trajanja tretmana. Peharec Štefanić i sur. (2018) također su izmjerili povećanje koncentracije proteinskih karbonila u klijancima duhana nakon tretmana s AgNP-citratom, dok isti učinak nije bio zabilježen na listovima i korijenju odraslih biljaka duhana (Cvjetko i sur. 2018), pokazujući da toksičnost AgNP značajno ovisi o razvojnom stadiju biljke. Iako karbonilacija proteina predstavlja jednu od najčešćih oksidacijskih modifikacija u stanici, njezina važnost u razjašnjavanju toksičnosti AgNP na biljkama još uvijek nije detaljno

istražena. Slične studije na animalnim modelima pokazale su pojačanu karbonilaciju citoskeletnih proteina poput aktina i tubulina u tretmanima s AgNP-PVP i AgNP-citratom, koje bi mogle utjecati na staničnu mobilnost i transport. Uz to, zabilježena je karbonilacija proteina uključenih u signalne puteve Rho, što bi moglo uzrokovati promjene u adheziji stanica te njihovoj polarnosti, a karbonilacija proteina uključenih u proces glikolize ukazuje na promjene u metabolizmu tijekom tretmana s AgNP (Driessen i sur. 2015).

Poznato je da AgNP mogu izazvati jednolančane i dvolančane lomove molekule DNA pomoću dva mehanizma; direktnom interakcijom molekule DNA s AgNP ili putem oksidacijskih oštećenja nastalih uslijed pojačane produkcije različitih oblika ROS (Flores-López i sur. 2019). U ovome radu pokazala sam da AgNP-CTAB pri najvišoj dozi tretmana uzrokuju značajno povećanje %DNA u repu, indikatora loma molekule DNA, a isto je zabilježeno i u tretmanu samim omotačem CTAB. S obzirom da jednaki učinci nisu zabilježeni u tretmanima s AgNP-PVP i AgNO₃, nameće se zaključak da genotoksičnost AgNP značajno ovisi o načinu njihove stabilizacije. Oštećenje molekule DNA u tretmanu s AgNP-CTAB stoga bi većim dijelom moglo biti posljedica povećane koncentracije ROS, ponajviše H₂O₂, čija je produkcija bila značajno veća u AgNP-CTAB tretmanu u odnosu na AgNP-PVP i AgNO₃. Slično zapažanje dobiveno je i u istraživanju Cvjetko i sur. (2017), gdje je najveća razina oštećenja molekule DNA u korijenu biljke *A. cepa* bila izmjerena u tretmanu s AgNP-CTAB, nešto manje u tretmanu s AgNP-PVP, dok AgNP-citrat nije pokazao genotoksičan učinak. U istraživanju utjecaja AgNP-citrat na odrasle biljke duhana, značajno povećanje %DNA u repu izmjereno je u listovima, ali ne i korijenima izlaganih biljaka (Cvjetko i sur. 2018). Osim toga, AgNP-citrat imale su genotoksičan učinak i na klijance duhana pri većim koncentracijama tretmana, što se može pripisati njihovoj većoj stabilnosti u korištenoj krutoj podlozi MS kao i dugotrajnijem periodu izlaganja (Peharec Štefanić i sur. 2018). Stabilnost AgNP pokazala se bitnom i u istraživanju Ghosh i sur. (2012), gdje je genotoksičan učinak AgNP na vrste *N. tabacum* i *A. cepa* bio negativno koreliran s primijenjenom koncentracijom tretmana, što su autori pripisali snažnijoj aglomeraciji AgNP pri višim koncentracijama. S obzirom da je dodatak cisteina u potpunosti umanjio genotoksični učinak AgNP-CTAB, vidljivo je da važnu ulogu u mehanizmu oštećenja molekule DNA imaju ioni Ag⁺ koji se s njih otpuštaju. Osim toga, još je važnije napomenuti utjecaj samog omotača, s obzirom da je tretman omotačem CTAB uzrokovao značajan porast %DNA u repu. Rajeshwari i sur. (2016) pokazali su snažan utjecaj nanocjevčica zlata (AuNR) stabiliziranih s CTAB na smanjenje mitotskog indeksa u korijenu biljke *A. cepa* koje je bilo 40× jače u odnosu na AuNR-PEG tretman istih koncentracija. Nadalje, tretman

samim omotačem CTAB također je pokazao snažan toksični učinak na stanice vrška korijena, dok isto nije zabilježeno za omotač PEG. Pozitivan naboj CTAB, koji doprinosi stabilizaciji različitih nanomaterijala, može uzrokovati destabilizaciju staničnih membrana interakcijom s fosfolipidnim dvoslojem, što u konačnici može dovesti i do apoptoze (Rajeshwari i sur. 2016).

U borbi protiv oksidacijskog stresa, biljke su razvile mnoge efikasne mehanizme za neutralizaciju ROS i očuvanje integriteta i funkcije stanica (Yan i Chen, 2019). Enzim SOD predstavlja prvu liniju obrane protiv ROS, a njegova funkcija važna je u katalizi pretvorbe radikala $O_2^{\cdot-}$ u H_2O_2 . Svi su tretmani u ovom istraživanju izazvali pojačano stvaranje ukupnih ROS, posebice $O_2^{\cdot-}$ koji je bio izmjeren DHE testom. Iako spektrofotometrijska mjerenja nisu pokazala značajne razlike u aktivnosti SOD ni u jednom od ispitanih tretmana srebrom, razlike u aktivnosti pojedinih izoformi ovog enzima bile su vidljive u gelu nakon provedene elektroforeze u nativnim uvjetima. Najznačajnije promjene zabilježene su u aktivnosti izoforme SOD3, koja je pokazala pojačanu aktivnost u tretmanu s 25 μ M AgNP-PVP, 50 i 100 μ M AgNO₃, svim koncentracijama AgNP-CTAB te u tretmanu samim omotačem CTAB. Dodatak cisteina umanjio je pojačanu aktivnost izoforme SOD3 u kombiniranim tretmanima s AgNP-PVP i AgNO₃, ali ne i s AgNP-CTAB, ukazujući na različit mehanizam djelovanja ovih oblika srebra. Pojačana aktivnost enzima SOD zabilježena je i nakon izlaganja biljaka *S. tuberosum* (Bagherzadeh Homaei i Ehsanpour 2016), *L. esculentum* (Song i sur. 2013), *W. globosa* (Zou i sur. 2016) i *R. communis* (Yasur i Rani 2013) tretmanima s AgNP. Jiang i sur. (2014) izmjerili su značajan porast aktivnosti SOD koji je bio jednako izražen u tretmanima s AgNP-GA i AgNP-PVP. Barbasz i sur. (2018) ukazali su na značajne razlike u odgovoru kalusa vrste *T. aestivum* na tretman različito stabiliziranim AgNP, gdje su pozitivno nabijene AgNP-cistamin uzrokovale jaču aktivaciju enzima SOD u odnosu na AgNP bez omotača i negativno nabijene AgNP-citrat, što podupire rezultate dobivene u ovom istraživanju. Za potpunu zaštitu biljke od ROS potrebna je i aktivnost enzima poput CAT i različitih peroksidaza koje imaju važnu ulogu neutralizacije H_2O_2 , a djeluju putem različitih mehanizama (Sofa i sur. 2015). Tretman klijanaca duhana s AgNP-CTAB u ovom je istraživanju doveo do najvećih promjena u aktivnosti navedenih enzima, što je u skladu s povećanom izmjerenom koncentracijom H_2O_2 . Pri najvećim koncentracijama tretmana, spektrofotometrijskim mjerenjem i detekcijom u gelu zabilježen je značajan porast aktivnosti CAT i APX. S druge strane, ukupna aktivnost PPX bila je inhibirana već od najmanje koncentracije, iako su izoforme PPX1 i PPX2 pokazale značajno povećanje aktivnosti u gelu koje je bilo ovisno o primijenjenoj koncentraciji tretmana. Utjecaj AgNP-PVP i AgNO₃ bio je značajno slabije izražen u odnosu na AgNP-CTAB, iako su i ti

tretmani uzrokovali povećanje aktivnosti CAT te smanjenje aktivnosti APX. Slično kao i kod AgNP-CTAB, spektrofotometrijsko mjerenje aktivnosti PPX u tretmanima s AgNP-PVP i AgNO₃ pokazalo je smanjenu aktivnost, iako je aktivnost izoformi PPX1 i PPX2 u gelu bila pojačana. Dodatak cisteina umanjio je utjecaj AgNP-PVP i AgNO₃, ali ne i AgNP-CTAB, ukazujući na različit mehanizam djelovanja AgNP stabiliziranih različitim omotačima. Osim toga, sam omotač CTAB također je izazvao značajne promjene u aktivnosti istraživanih peroksidaza, dodatno ističući njegovu važnu ulogu u toksičnosti AgNP-CTAB. Značajno povećanje aktivnosti CAT izmjereno je u istraživanju utjecaja AgNP i AgNO₃ na dva genotipa *G. max*, a s obzirom da je u istraživanju zabilježeno i smanjenje aktivnosti SOD, autori su utvrdili da CAT ima glavnu zaštitnu ulogu protiv ROS u tretmanu srebrom (Galazzi i sur. 2019). Povećanje aktivnosti CAT i APX izmjereno je također nakon izlaganja klijanaca vrste *S. tuberosum* tretmanima s AgNP i AgNO₃ (Bagherzadeh Homae i Ehsanpour 2016), dok je u kalusu varijeteta vrste *T. aestivum* osjetljivom na oksidacijski stres važnu ulogu u otklanjanju ROS imao PPX, dok je aktivnost CAT bila značajno inhibirana uslijed prekomjerne koncentracije ROS (Barbasz i sur. 2016). Sličan utjecaj AgNP zabilježen je i u biljci *B. monnieri*, gdje je također izmjerena pojačana aktivnost PPX, a smanjena aktivnost CAT (Krishnaraj i sur. 2012). Peharec Štefanić i sur. (2018) su nakon izlaganja klijanaca vrste *N. tabacum* AgNP-citratu izmjerili povećanje aktivnosti APX i smanjenje aktivnosti PPX, dok CAT nije pokazao značajne promjene u aktivnosti, te su zaključili da APX, sa najvećim afinitetom prema H₂O₂, ima glavnu ulogu u otklanjanju oksidacijskog stresa. Stabilizacija AgNP različitim omotačima pokazala je važan utjecaj na aktivnost enzima u tretiranim biljkama. U tretmanu biljke *S. polyrhiza*, značajan porast aktivnosti izmjeren je za oba tipa ispitivanih AgNP (AgNP-GA i AgNP-PVP), dok je aktivnost CAT porasla samo nakon tretmana s AgNP-GA (Jiang i sur. 2014). Cvjetko i sur. (2017) zabilježili su veće promjene aktivnosti PPX, APX i CAT u tretmanima s AgNP-PVP i AgNP-CTAB u odnosu na AgNP-citrat, pri čemu se PPX istaknuo kao najvažniji enzim za uklanjanje H₂O₂. Ispitivanje utjecaja AgNP-citrat i AgNP-PVP u biljci *Lemna minor* pokazalo je značajnu aktivaciju enzima GPX nakon oba tretmana, iako je utjecaj AgNP-citrat bio jače izražen te je pri najvećoj koncentraciji ovog tretmana izmjereno i povećanje aktivnosti GST. Ipak, niti jedan od tretmana nije doveo do značajnih promjena u aktivnosti CAT (Pereira i sur. 2018).

Osim putem antioksidacijskih enzima, biljke mogu umanjiti štetu izazvanu prekomjernom produkcijom ROS pomoću malih neenzimskih antioksidansa. Tu se posebno ističu prolin i GSH, čija interakcija s različitim fitohormonima, uključenima u obranu biljke, osigurava

uspješnu toleranciju na stres. Sadržaj prolina bio je značajno povećan u tretmanima najvišom koncentracijom AgNP-PVP i AgNP-CTAB, te pri 50 μ M koncentraciji AgNO₃. Dodatak cisteina umanjio je sadržaj prolina u kombiniranim tretmanima s AgNP-PVP i AgNO₃, ali ne i AgNP-CTAB, te je zabilježeno i povećanje sadržaja prolina u tretmanu samim omotačem CTAB, što ukazuje na njegovu važnu ulogu u toksičnosti AgNP-CTAB. Povećanje sadržaja prolina zabilježeno je i nakon izlaganja klijanaca vrste *Lupinus termis* (Al-Huqail i sur. 2018) i *O. sativa* (Nair i Chung 2014b) te biljke *S. polyrhiza* (Jiang i sur. 2012) tretmanima s AgNP. Osim toga, Barbasz i sur. (2018) izmjerili su značajne razlike u sadržaju prolina tijekom izlaganja kalusa *T. aestivum* različito stabiliziranim AgNP, gdje su pozitivno nabijene AgNP-cisteamin značajno povećale sadržaj prolina u odnosu na negativno nabijene AgNP bez omotača te AgNP-citrat, što je u skladu s rezultatima mog istraživanja.

Omjer GSH i GSSG često se koristi kao indikator redoks statusa stanice, a promjene u njihovu omjeru mogu ukazati na postojanje oksidacijskog stresa. U ovome sam istraživanju pokazala da više koncentracije svih tretmana srebrom uzrokuju značajno povećanje omjera GSH/GSSG, što je posebice bilo izraženo u tretmanu s AgNP-PVP, dok kombinirani tretmani s cisteinom, kao ni sami omotači, nisu izazvali značajne promjene. Povećanje omjera GSH/GSSG u korist reduciranog oblika GSH može upućivati na značajnu pojavu oksidacijskog stresa. Naime, u prvoj fazi odgovora na povećanu koncentraciju ROS u stanici, omjer GSH/GSSG pada uslijed porasta koncentracije oksidiranog oblika GSSG. Međutim, tijekom faze aklimatizacije, u kojoj dolazi do pojačane aktivnosti antioksidansa te porasta kapaciteta ciklusa glutation-askorbat, postiže se nova ravnoteža prepoznatljiva po povećanim koncentracijama askorbata i GSH te pojačanoj aktivnosti enzima uključenih u antioksidacijski odgovor, što rezultira obnovljenom ravnotežom omjera GSH/GSSG. Tijekom dugotrajne izloženosti stresu ipak može doći do prekomjerne kompenzacije odgovora, što se ispoljava u povećanju omjera GSH/GSSG u korist reduciranog oblika uslijed jake aktivacije obrambenih mehanizama (Masi i sur. 2002, Tausz i sur. 2004), što je vjerojatno bio slučaj u klijancima duhana nakon izlaganja tretmanima AgNP i AgNO₃ u mom istraživanju. Slično tome, povećani sadržaj GSH zabilježen je u biljci *S. polyrhiza* u tretmanu s AgNP-GA (Jiang i sur. 2014). Nadalje, tretman s AgNP-TA pokazao je isti učinak u kalusima vrste *T. aestivum*, iako su zabilježene značajne razlike u odgovorima kalusa pšenice koji su tolerantni, odnosno osjetljivi na oksidacijski stres. Kod tolerantnog varijeteta značajnije povećanje sadržaja GSH ukazalo je da ovaj neenzimski mehanizam ima glavnu ulogu u uklanjanju ROS u stanici, dok je povećanje sadržaja GSH u osjetljivom varijetetu bilo praćeno aktivacijom enzima SOD i PPX, ukazujući na kombinaciju enzimskog i

neenzimskog odgovora (Barbasz i sur. 2016). Bagherzadeh Homae i Ehsanpour (2016) zabilježili su smanjenje omjera GSH/GSSG tijekom izlaganja biljke *S. tuberosum* tretmanu s AgNP koje je bilo pozitivno korelirano s koncentracijom tretmana, te manje u odnosu na tretman istim koncentracijama AgNO₃. Takav su rezultat pripisali smanjenoj aktivnosti enzima GR te direktnom utrošku GSH u interakciji s nastalim ROS u stanici.

5.5. Utjecaj na proteom

Analize ekspresije gena i proteina omogućavaju detaljan uvid u molekularne mehanizme odgovora biljaka na tretmane s AgNP (Biba i sur. 2021a). Iako postoji više metoda za analizu ekspresije gena, niti jedna ne predstavlja mogućnost istovremene analize cijelog transkriptoma (Teo i sur. 2016). S druge strane, uporaba proteomike uključuje visokoprotodne analize cijelog proteoma te predstavlja poveznicu između ekspresije gena i staničnog metabolizma (Hossain i sur. 2016, 2020). Dosadašnja su proteomska istraživanja ukazala na postojanje određenih razlika u odgovoru biljaka na izlaganje AgNP i ionima Ag⁺ (Vannini i sur. 2013, Peharec Štefanić i sur. 2018, 2019), a zabilježene su i značajne razlike u odgovoru korijena i lista iste biljke (Peharec Štefanić i sur. 2019). Iako je u dosadašnjim proteomskim istraživanjima ispitan utjecaj AgNP bez omotača (Mirzajani i sur. 2014, Mustafa i sur. 2015), AgNP-citrat (Peharec Štefanić i sur. 2018, 2019, Galazzi i sur. 2019) te AgNP-PVP (Vannini i sur. 2013, 2014), do sada nije napravljena komparativna usporedba proteomskog odgovora biljaka tretiranih s različito stabiliziranim AgNP unutar istog istraživanja, pa bi moji rezultati mogli dati bolji uvid u mehanizam djelovanja AgNP ovisan o njihovim intrinzičnim svojstvima. Uz to, odgovor klijanaca u kombiniranim tretmanima s cisteinom pomoći će u razlučivanju utjecaja AgNP i iona Ag⁺.

U ovom istraživanju detektirala sam ukupno 26 proteina čija se ekspresija razlikovala u tretmanima s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ u odnosu na kontrolu, podijeljenih u pet funkcionalnih skupina ovisno o biološkom procesu u kojemu sudjeluju. Najveći broj diferencijalno eksprimiranih proteina zabilježen je u tretmanu s AgNP-CTAB (20), nakon čega slijedi tretman AgNO₃ (15), dok je najmanje promjena izazvao tretman s AgNP-PVP (13). Većina proteina pokazala je pojačanu ekspresiju u svim tretmanima u odnosu na kontrolu, iako je detektirano i nekoliko proteina smanjene ekspresije. Gledajući utjecaj cisteina, najviše promjena u ekspresiji proteina u kombiniranim tretmanima pokazao je ponovno AgNP-CTAB (13), potom AgNP-PVP (7), dok je najmanje promjena zabilježeno u kombiniranom tretmanu

s AgNO₃ (6), ukazujući da je cistein značajno umanjio utjecaj AgNO₃ i AgNP-PVP, a nešto slabije utjecaj AgNP-CTAB.

Najveći broj diferencijalno eksprimiranih proteina u svim tretmanima pokazala je skupina proteina uključenih u obranu i odgovor na stres, pri čemu se posebno ističu proteini uključeni u odgovor na oksidacijski stres. Ekspresija APX, enzima izravno uključenog u uklanjanje H₂O₂, bila je pojačana u svim tretmanima srebrom te također u svim kombiniranim tretmanima srebra i cisteina, što je u skladu s rezultatima dobivenima u tretmanu klijanaca vrste *O. sativa* s AgNP bez omotača (Mirzajani i sur. 2014), *E. sativa* nakon izlaganja AgNP-PVP (Vannini i sur. 2013) te *N. tabacum* u tretmanu s AgNP-citrat (Peharec Štefanić i sur. 2018). Nadalje, u svim sam tretmanima zabilježila i pojačanu ekspresiju dvije detektirane izoforme enzima GST, što je vidljivo i u pojačanom intenzitetu proteinskih vrpce veličina 30 i 35 kDa u gelu nakon provedene SDS-PAG elektroforeze, a u skladu je s rezultatom dobivenim na klijanacima *O. sativa* (Mirzajani i sur. 2014). GST je izravno uključena u metabolički put GSH, a sudjeluje i u mnogim procesima detoksifikacije biljaka (Gong i sur. 2005). Kombinirani tretmani AgNP-PVP i AgNO₃ s cisteinom nisu pokazali promjenu ekspresije ovoga enzima, dok je izoforma X1 u kombiniranom tretmanu AgNP-CTAB i cisteina bila pojačano eksprimirana. Iako ih nisam detektirala na gelovima dobivenima dvodimenzionalnom elektroforezom, imunodetekcija proteina na membrani ukazala je na postojanje značajnih razlika u ekspresiji SOD, CAT i HRP nakon tretmana klijanaca duhana različito stabiliziranim AgNP i AgNO₃, što su pokazala i istraživanja na drugim biljnim vrstama (Mirzajani i sur. 2014, Vannini i sur. 2013, Peharec Štefanić i sur. 2018, 2019). Neka su istraživanja pokazala da proteini uključeni u patogenezu (eng. *pathogenesis related*, PR) također sudjeluju u odgovoru biljaka na tretman AgNP. U svom sam istraživanju detektirala smanjenu ekspresiju 1C proteina povezanog s patogenezom u svim ispitanim tretmanima, sa i bez cisteina, što je bilo vidljivo i na gelu tretiranom s AgNO₃ nakon provedene jednodimenzionalne SDS-PAG elektroforeze u vidu smanjenog intenziteta vrpce na 20 kDa. Slično tome, u tretmanima s AgNP-PVP (Vannini i sur. 2014) i AgNP-citratom (Peharec Štefanić i sur. 2018, 2019) zabilježena je promijenjena ekspresija β-1,3-glukonaze i hitinaze iz skupine PR proteina, koji su primarno uključeni u odgovor na ranjavanje ili infekciju, ali sudjeluju i u odgovoru na stres uzrokovan teškim metalima (Wu i sur. 2001, Beata i Ildiko, 2011). Tretmani s AgNP-PVP i AgNO₃, sa i bez cisteina, u mojem su istraživanju izazvali pojačanu ekspresiju 70 kDa proteina toplinskog šoka (eng. *heat shock protein*, Hsp), dok je u tretmanu s AgNP-PVP zabilježena i pojačana ekspresija šaperona Hsp70-Hsp90 organizirajućeg proteina 2. Skupinu Hsp čini veliki broj proteina uključenih u očuvanje native

konformacije proteina čija ekspresija ovisi o mnogim stresnim stanjima, uključujući toplinski stres, sušu, povišeni salinitet ili infekciju patogenima (Breiman 2014). Osim toga, pojačana ekspresija proteina Hsp 70, 17.4 kDa Hsp i 20 kDa šaperonina nalik kloroplastnom zabilježena je i u drugim biljkama izloženim tretmanima s AgNP (Vannini i sur. 2013, Peharec Štefanić i sur. 2018).

Drugu veliku skupinu proteina uključenih u odgovor na tretman AgNP čine proteini iz skupine metabolizam ugljikohidrata i energije, a utjecaj različito stabiliziranih AgNP bio je posebno vezan za ekspresiju proteina uključenih u proces fotosinteze, najvažniji fiziološki proces biljaka (Perdomo i sur. 2017). Tretmani AgNP-CTAB i AgNO₃ izazvali su značajno smanjenje ekspresije velike podjedinice enzima Rubisco, što je bilo vidljivo i u smanjenju intenziteta vrpce od oko 50 kDa u gelu nakon SDS-PAG elektroforeze i vizualizacije proteina bojom CBB i AgNO₃. AgNP-CTAB dodatno je umanjio i ekspresiju enzima Rubisco aktivaza 2 važne za njegovu aktivaciju, dok isto nije bilo zabilježeno u tretmanu AgNP-PVP. Enzim Rubisco ključan je enzim za vezanje atmosferskog CO₂ na ribuloza-1,5-bifosfat (eng. *ribulose-1,5-biphosphate*, RuBP) u prvom koraku Calvinova ciklusa. Inhibicija fotosinteze potaknuta stresnim uvjetima uzrokuje smanjenje sinteze ATP-a, što posljedično smanjuje brzinu transporta elektrona te onemogućava pravilnu regeneraciju RuBP, čime se limitira fiksacija CO₂ (Singh i sur. 2014, Galmés i sur. 2007, Perdomo i sur., 2017). Smanjena ekspresija velike podjedinice enzima Rubisco zabilježena je i nakon izlaganja listova duhana AgNP-citratu (Peharec Štefanić i sur. (2019). Uz to, AgNP-citrat su u istraživanju Galazzi i sur. (2019) također izazvale smanjenje ekspresije male i velike podjedinice ovog enzima u biljci *G. max*, ukazujući na značajnu degradaciju enzima Rubisco. Iako su neka istraživanja ukazala na pojačanu ekspresiju proteina uključenih u fotosintezu u tretmanima biljaka s AgNP i AgNO₃, što se objasnilo pojačanom potrebom za osiguravanjem energije i preživljavanjem stresnih uvjeta (Peharec Štefanić i sur. 2018, Vannini i sur. 2013), rezultati dobiveni u mom istraživanju pokazuju da u stanju izrazitog stresa ipak dolazi do značajnih oštećenja fotosintetskog aparata, čime se onemogućava njegova pravilna funkcija. U tretmanima s AgNP-CTAB i AgNO₃ zabilježila sam pojačanu ekspresiju klorofil a-b vezajućeg proteina (eng. *light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins*, LHCB), integralnog dijela PSII koji vezanjem za klorofil i ksantofil stvara kompleks za hvatanje svjetlosti (Jansson 1994, Liu i sur. 2013), a čija se ekspresija pokazala ovisnom o oksidacijskom stresu (Nott i sur. 2006, Staneloni i sur. 2008). Istraživanje utjecaja AgNP na biljkama pokazalo je značajno smanjenje ekspresije proteina OEE2 (eng. *oxygen-evolving enhancer protein 2*) (Galazzi i sur. 2019) i HCF136 (eng.

Photosystem II stability/assembly factor) (Vannini i sur. 2014), također važnih za funkciju PSII. Još jedan važan proces na koji utječu AgNP je glikoliza. U svom sam radu nakon tretmana klijanaca duhana s AgNP-CTAB i AgNO₃ detektirala pojačanu ekspresiju proteina fosfopiruvat hidrataze, enzima koji katalizira pretvorbu 2-fosfoglicerata u fosfoenolpiruvat, glavni prekursor piruvata. Pojačana ekspresija glikolitičkih proteina važna je za održavanje procesa glikolize i osiguravanje dostatne energije za biljku tijekom stanja oksidacijskog stresa (Peharec Štefanić i sur. 2018). Istraživanja ekspresije glikolitičkih proteina uključenih u odgovor biljaka na tretman AgNP nisu ujednačena. Naime, iako je tretman klijanaca duhana s AgNP-citratom pokazao povećanje ekspresije plastidne aldolaze, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaze (GAPDH) i triozafosfat izomeraze (Peharec Štefanić i sur. 2018), u listovima odraslih biljaka duhana isti je tretman uzrokovao njihovu smanjenu ekspresiju (Peharec Štefanić i sur. 2019). S obzirom da su klijanici duhana u istraživanju Peharec Štefanić i sur. (2018) isključivani i rasli na podlogama s AgNP i AgNO₃, moguće je da su razvili efikasnije mehanizme obrane od stresa koji uključuju navedene glikolitičke enzime, dok akutni tretman primijenjen na odraslim biljkama duhana nije polučio isti rezultat (Peharec Štefanić i sur. 2019). Ekspresija GAPDH također je bila smanjena i u klijanima vrsta *O. sativa* (Mirzajani i sur. 2014) i *T. aestivum* (Jhanzab i sur. 2019) nakon tretmana s AgNP, ukazujući na diferencijalan odgovor različitih biljnih vrsta i njihovih razvojnih stadija. U svom sam istraživanju nakon tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ detektirala i pojačanu ekspresiju dihidrolipoilinski-ostatak sukciniltransferaze, enzima uključenog u ciklus limunske kiseline (eng. *tricarboxylic acid cycle*, TCA) koji povezuje glikolizu i mitohondrijski lanac transporta elektrona, što je također važno za stvaranje energije u biljci. Povećanje ekspresije enzima uključenih u TCA ciklus zabilježeno je i u korijenju *T. aestivum* (Vannini i sur. 2014) te klijanima duhana (Peharec Štefanić i sur. 2018) nakon tretmana s AgNP, a slično kao i enzimi uključeni u glikolizu, enzimi TCA ciklusa bili su slabije eksprimirani u korijenju tretiranih odraslih biljaka duhana (Peharec Štefanić i sur. 2019). Na kraju, tretman s AgNP-CTAB te kombinirani tretman AgNP-CTAB i cisteina u ovom je istraživanju uzrokovao povećanje ekspresije enzima 3-ketoacil-CoA tiolaza 2, važnog za proces beta-oksidacije masnih kiselina. Navedeni rezultati ukazuju na stvaranje pojačane potrebe za energijom u stanju oksidacijskog stresa uzrokovanog tretmanima srebrom.

Značajne promjene ekspresije zabilježila sam i kod skladišnih proteina. Svi su tretmani značajno pojačali ekspresiju antimikrobnih peptida poput vicilina 2-3 te 11S globulina, a pojačana ekspresija legumina A bila je zabilježena samo u tretmanima s AgNP-PVP i AgNP-CTAB. Kombinirani tretmani AgNP-PVP i AgNO₃ s cisteinom nisu izazvali značajne promjene

u ekspresiji skladišnih proteina, dok su svi proteini ove skupine bili pojačano eksprimirani u kombiniranom tretmanu cisteina s AgNP-CTAB, ukazujući na različit mehanizam njihova djelovanja. Skladišni proteini imaju važnu ulogu kao rezervoari hranjivih tvari, čija je funkcija posebice važna tijekom klijanja sjemenke, iako su lokalizirani i u ostalim razvojnim stadijima biljaka, poput plodova, parenhima stabala, te u korijenu i gomolju (Müntz i sur. 1998). Služe za pohranu proteina te mogu biti mobilizirani tijekom rasta i razvoja biljaka te u slučaju indukcije stresa (de Souza Candido i sur. 2011). Poznata je njihova uloga u obrani od virusa (de Souza Candido i sur. 2011, Chen i sur. 2013), ali do sada nije zabilježena njihova funkcija u oksidacijskom stresu. Iako su neka istraživanja pokazala smanjenje sadržaja skladišnih proteina uslijed njihove razgradnje u periodu pojačane potrebe za energijom u stresnim uvjetima (Vítámvás i sur. 2012, Kosová i sur. 2013, 2014), rezultati mog istraživanja pokazuju da i njihova akumulacija može doprinijeti borbi protiv stresa u tretmanima s AgNP i AgNO₃.

Kao što je bilo pokazano u prethodnim poglavljima, AgNP mogu izazvati značajna oštećenja proteina. U održavanju funkcije stanice zato važnu ulogu imaju proteini uključeni u skupinu sinteza i obrada proteina. Pojačana ekspresija proteina disulfid izomeraze, važne za pravilno smatanje proteina, zabilježena je u klijanjima duhana nakon tretmana s AgNP-CTAB i AgNO₃, ali ne i AgNP-PVP. Osim toga, AgNP-CTAB, same i u kombinaciji s cisteinom, uzrokovale su i pojačanu ekspresiju beta 2 podjedinice šaperonina 60, koji u stanici ima istu funkciju. Pojačana ekspresija proteina ove skupine, zabilježena u mnogim dosadašnjim istraživanjima utjecaja AgNP na biljke (Vannini i sur. 2014, Mirzajani i sur. 2014, Peharec Štefanić i sur. 2018, Jhazab i sur. 2019), ukazuje na njihovu važnost u održavanju homeostaze stanice. U tretmanima AgNP-CTAB i AgNO₃ sam također izmjerila pojačanu ekspresiju proteosomalne podjedinice alfa tipa, čija je endopeptidazna aktivnost uključena u katabolizam proteina. I druga su istraživanja zabilježila pojačanu ekspresiju proteina uključenih u degradacijske procese uslijed nastajanja nepovratnih oštećenja proteina uzrokovanih stresnim uvjetima (Jhazab i sur. 2019, Hashimoto i sur. 2020).

U skupinu proteina uključenih u metabolizam nukleinskih kiselina pripada protein S-adenozil metionin (SAM) sintaza, enzim uključen u sintezu SAM iz metionina i ATP-a, čija je ekspresija u klijanjima duhana bila pojačana nakon tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, sa i bez cisteina. SAM sudjeluje u epigenetičkoj regulaciji kao glavni donor metilne skupine u mnogim organizmima, uključujući biljke. Metilacija DNA, RNA, proteina, lignina i flavonoida igra važnu ulogu u regulaciji biljnog razvitka te odgovoru na biotički i abiotički stres (Xu i sur. 2006, Köllner i sur. 2010, Ezaki i sur. 2016), što ukazuje na važnu ulogu SAM sintaze u

odgovoru na oksidacijski stres potaknut izlaganjem AgNP. I drugi proteini iz ove skupine pokazali su pojačanu ekspresiju u tretmanima s AgNP i AgNO₃. Peharec Štefanić i sur. (2018) su u klijancima duhana nakon izlaganja AgNP-citratu i AgNO₃ zabilježili pojačanu ekspresiju glutamin sintetaza, enzima uključenih u metabolizam amonijaka, što ukazuje na važnost ravnoteže ugljika i dušika tijekom adaptacije na stres uzrokovan srebrom. Uz to, aminometil transferaza, uključena u metabolizam glicina, pokazala je pojačanu ekspresiju u tretmanu s AgNO₃, ali ne i s AgNP-citratom u listovima odraslih biljaka duhana (Peharec Štefanić i sur. 2019). S obzirom da je glicin nužan za sintezu glicin betaina, važnog osmolita biljaka, ova promjena ukazuje na važnu regulaciju mehanizma tolerancije abiotičkog stresa (Ashraf i Foolad 2007, Chen i Murata 2008).

ZAKLJUČAK

6. ZAKLJUČAK

Utjecaj AgNP na biljke je kompleksan i ovisi o mnogo parametara koje treba uzeti u obzir tijekom njihove implementacije u svakodnevnom životu. Na temelju rezultata ovog istraživanja, moguće je zaključiti sljedeće:

- Fizikalno-kemijske karakteristike AgNP uvjetuju mehanizam njihova djelovanja te snažno utječu na njihovu fitotoksičnost, pri čemu važnu ulogu ima odabir omotača za stabilizaciju; pozitivno nabijene AgNP-CTAB pokazale su jači utjecaj pri svim ispitivanim parametrima u odnosu na AgNP-PVP s blagim negativnim nabojem.
- Stabilnost AgNP u podlozi za izlaganje ovisi o sastavu podloge; oba tipa AgNP pokazala su veću stabilnost u krutoj podlozi u odnosu na tekuću. Osim toga, stabilnost uvjetuje i izbor omotača; promjene AgNP-PVP su bile značajno manje i sporije u odnosu na AgNP-CTAB.
- Tretman s AgNP-CTAB negativno je utjecao na brzinu i postotak isključivanja sjemenki duhana te je zabilježena i snažna inhibicija parametara ranog rasta pri svim ispitanim koncentracijama. Tretmani s AgNP-PVP i AgNO₃ nisu izazvali promjene u isključivanju, ali su imali inhibitorni učinak na rani rast duhana pri povišenim koncentracijama tretmana.
- Svi tretmani uzrokovali su pojačano stvaranje ukupnih ROS u stanici, ali je to bilo značajno jače nakon izlaganja AgNP-PVP i AgNP-CTAB u odnosu na AgNO₃, što potvrđuje da je oksidacijski stres glavni mehanizam toksičnosti AgNP. U tretmanu s AgNP-CTAB zabilježena je i povećana koncentracija H₂O₂, što pokazuje da mehanizam nastanka oksidacijskog stresa ne ovisi isključivo o ionima Ag⁺ koji se otpuštaju s AgNP.
- Oksidacijsko oštećenje lipida, proteina i molekule DNA bilo je zabilježeno samo u tretmanu s najvećom koncentracijom AgNP-CTAB, što ukazuje na to da je proizvodnja ROS premašila kapacitete antioksidacijskog sustava te je nastupilo stanje oksidacijskog stresa.
- U obrani protiv oksidacijskog stresa aktivirali su se enzimski i neenzimski antioksidansi; u tretmanu s AgNP-CTAB jače je bila izražena aktivacija antioksidacijskih enzima, posebice CAT i APX, dok su u obrani tijekom tretmana s AgNP-PVP i AgNO₃ veći značaj pokazali prolin i GSH.
- Tretman s AgNP-CTAB izazvao je veće promjene u proteomu klijanaca duhana u odnosu na tretmane s AgNP-PVP i AgNO₃, pri čemu je većina identificiranih proteina pokazala povećanu ekspresiju u tretmanima u odnosu na kontrolu.

- Najviše diferencijalno eksprimiranih proteina pripadalo je skupinama obrana i odgovor na stres, metabolizam ugljikohidrata i energije te skladišni proteini, što potvrđuje pojavu oksidacijskog stresa i ukazuje na pojačanu potrebu za energijom u borbi protiv stresa uzrokovanog tretmanima s AgNP i AgNO₃.
- Dodatak cisteina umanjio je utjecaj AgNP-PVP i AgNO₃ za većinu ispitanih parametara, ali nije imao veliki značaj na tretman s AgNP-CTAB, što ukazuje na to da je toksičan učinak AgNP-PVP većim dijelom posljedica otpuštanja iona Ag⁺, dok toksičnost AgNP-CTAB proizlazi iz intrinzičnih svojstava samih nanočestica.
- Omotač CTAB također je negativno utjecao na sve ispitane parametre u kljancima duhana, što pokazuje da i sam omotač doprinosi toksičnosti AgNP-CTAB.

POPIS LITERATURE

7. POPIS LITERATURE

- Abdel-Azeem EA, Elsayed BA (2013) Phytotoxicity of silver nanoparticles on *Vicia faba* seedlings. *N Y Sci J* 6:148–156.
- Adams NWH, Kramer JR (1998) Reactivity of Ag⁺ ion with thiol ligands in the presence of iron sulfide. *Environ Toxicol Chem* 17:625–629.
- Aebersold R, Mann M (2003) Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422:198–207.
- Aebi H (1984) [13] Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105:121–126.
- Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Sci* 196:67–76.
- Akter M, Sikder MT, Rahman MM, Ullah AKMA, Hossain KFB, Banik S, Hosokawa T, Saito T, Kurasaki M (2018) A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *J Adv Res* 9:1–16.
- Alabdallah NM, Hasan MM, Salih AM, Roushdi SS, Al-Shammari AS, Alsanie SI, El-Zaidy M (2021) Silver nanoparticles improve growth and protect against oxidative damage in eggplant seedlings under drought stress. *Plant, Soil Environ* 2021:617–624.
- Albalawi F, Hussein MZ, Fakurazi S, Masarudin MJ (2021) Engineered nanomaterials: The challenges and opportunities for nanomedicines. *Int J Nanomedicine* 16:161–184.
- Alexieva V, Sergiev I, Mapelli S, Karanov E (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell Environ* 24(12):1337–1344.
- Al-Huqail AA, Hatata MM, AL-Huqail AA, Ibrahim MM (2018) Preparation, characterization of silver phyto nanoparticles and their impact on growth potential of *Lupinus termis* L. seedlings. *Saudi J Biol Sci* 25:313–319.
- Ali S, Mehmood A, Khan N (2021) Uptake, translocation, and consequences of nanomaterials on plant growth and stress adaptation. *J Nanomater* 2021: 6677616.
- Almutairi Z, Alharbi A (2015) Effect of silver nanoparticles on seed germination of crop plants. *J Adv Agric* 4(1), 280-285.
- Alscher RG, Erturk N, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot* 53:1331–1341.
- Ameen KB, Rajasekar K, Rajasekharan T (2007) Silver nanoparticles in mesoporous aerogel exhibiting selective catalytic oxidation of benzene in CO₂ free air. *Catal Letters* 119:289–295.
- Amooaghaie R, Tabatabaei F, Ahadi AM (2015) Role of hematin and sodium nitroprusside in regulating *Brassica nigra* seed germination under nanosilver and silver nitrate stresses. *Ecotoxicol Environ Saf* 113:259–270.

- An J, Zhang M, Wang S, Tang J (2008) Physical, chemical and microbiological changes in stored green asparagus spears as affected by coating of silver nanoparticles-PVP. *LWT - Food Sci Technol* 41:1100–1107.
- Anjum NA, Sharma P, Gill SS, Hasanuzzaman M, Khan EA, Kachhap K, Mohamed AA, Thangavel P, Devmanjuri Devi G, Vasudhevan P, Sofo A, Khan Nafees, Misra AN, Lukatkin AS, Singh HP, Pereira E, Tuteja N (2016) Catalase and ascorbate peroxidase-representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. *Environ Sci Pollut Res* 23:19002–19029.
- Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55:373–399.
- Argentiere S, Cella C, Cesaria M, Milani P, Lenardi C (2016) Silver nanoparticles in complex biological media: assessment of colloidal stability and protein corona formation. *J Nanoparticle Res* 18:253.
- Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Curr Sci* 82:1227–1238.
- Ashraf M, Foolad MR (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ Exp Bot* 59:206–216.
- Aslani F, Bagheri S, Muhd Julkapli N, Juraimi AS, Golestan Hashemi FS, Baghdadi A (2014) Effects of engineered nanomaterials on plants growth: An overview. *Sci World J* 2014:641759.
- Avkin S, Livneh Z (2002) Efficiency, specificity and DNA polymerase-dependence of translesion replication across the oxidative DNA lesion 8-oxoguanine in human cells. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 510:81–90.
- Axson JL, Stark DI, Bondy AL, Capracotta SS, Maynard AD, Philbert MA, Bergin I, Ault AP (2015) Rapid kinetics of size and pH-dependent dissolution and aggregation of silver nanoparticles in simulated gastric fluid. *J Phys Chem C* 119:20632–20641.
- Bae S, Hwang YS, Lee, YJ, Lee SK (2013) Effects of water chemistry on aggregation and soil adsorption of silver nanoparticles. *Environ Health Toxicol* 28:e2013006.
- Bagherzadeh Homae M, Ehsanpour AA (2016) Silver nanoparticles and silver ions: Oxidative stress responses and toxicity in potato (*Solanum tuberosum* L) grown *in vitro*. *Hortic Environ Biotechnol* 57:544–553.
- Baig N, Kammakam I, Falath W, Kammakam I (2021) Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Mater Adv* 2:1821–1871.
- Bailly C (2019) The signalling role of ROS in the regulation of seed germination and dormancy. *Biochem J* 476:3019–3032.
- Balen B, Pavoković D, Peharec Štefanić P, Krsnik-Rasol M (2011) Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. Sveučilišni priručnik, Zagreb: Hrvatska sveučilišna naknada

- Barabanov PV, Gerasimov AV, Blinov AV, Kravtsov AA, Kravtsov VA (2018) Influence of nanosilver on the efficiency of *Pisum sativum* crops germination. *Ecotoxicol Environ Saf* 147:715–719.
- Barbasz A, Barbara K, Ocwieja M (2018) How the surface properties affect the nanocytotoxicity of silver? Study of the influence of three types of nanosilver on two wheat varieties. *Acta Physiol Plant* 40:31.
- 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 Physiol Plant* 38:1–11.
- Barhoum A, García-Betancourt ML, Jeevanandam J, Hussein EA, Mekkawy SA, Mostafa M, Omran MM, Abdalla MS, Bechelany M (2022) Review on natural, incidental, bioinspired, and engineered nanomaterials: history, definitions, classifications, synthesis, properties, market, toxicities, risks, and regulations. *Nanomaterials* 12(2):177.
- Barrena R, Casals E, Colon J, Font X, Sanchez A, Puntès V (2009) Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere* 75:850–857.
- Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39:205–207.
- Beata P, Ildiko M, Awaad AS, Kaushik G, Govil JN (2011) Plant defense against heavy metals: The involvement of pathogenesis-related (PR) proteins. U: Awaad AS, Kaushik G, Govil JN, (ed.) *Recent progress in medicinal plants. Vol. 31: Mechanism and action of phytoconstituents*. Studium Press, India 179–205.
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem* 44:276–287.
- Bedlovicová Z, Strapác I, Baláž M, Salayová A (2020) A brief overview on antioxidant activity determination of silver nanoparticles. *Molecules* 25(14), 3191.
- Bélteky P, Rónavári A, Igaz N, Szerencses B, Toth IY, Pfeiffer I, Kiricsi M, Konya Z (2019) Silver nanoparticles: aggregation behavior in biorelevant conditions and its impact on biological activity. *Int J Nanomedicine* 14:667–687.
- Berne BJ, Pecora R (2000) *Dynamic light scattering: with applications to chemistry, biology, and physics*. Courier Corporation; New York, USA.
- Biba R, Košpić K, Komazec B, Markulin D, Cvjetko P, Pavoković D, Peharec Štefanić P, Tkalec M, Balen B (2022) Surface coating-modulated phytotoxic responses of silver nanoparticles in plants and freshwater green algae. *Nanomaterials* 12(1):24.
- Biba R, Matić D, Lyons DM, Peharec Štefanić P, Cvjetko P, Tkalec M, Pavoković D, Letofsky-Papst I, Balen B (2020) Coating-dependent effects of silver nanoparticles on tobacco seed germination and early growth. *Int J Mol Sci* 21(10):3441.
- Biba R, Peharec Štefanić P, Cvjetko P, Tkalec M, Balen B (2021a) Chapter 14 – Silver nanoparticles phytotoxicity mechanisms. U: Abd-Elsalam KA (ed), *Silver nanomaterials*

- for agri-food applications nanobiotechnology for plant protection. Elsevier, Amsterdam 317-356.
- Biba R, Tkalec M, Cvjetko P, Peharec Štefanić P, Šikić S, Pavoković D, Balen B (2021b) Silver nanoparticles affect germination and photosynthesis in tobacco seedlings. *Acta Bot Croat* 80:1–11.
- Biswas MS, Terada R, Mano J (2020) Erratum: Inactivation of carbonyl-detoxifying enzymes by H₂O₂ is a trigger to increase carbonyl load for initiating programmed cell death in plants *Antioxidants*, 9:141.
- Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93–99.
- Bottero JY, Auffan M, Rose J, Mouneyrac C, Botta C, Labille J, Masion A, Thill A, Chaneac C (2011) Manufactured metal and metal-oxide nanoparticles: properties and perturbing mechanisms of their biological activity in ecosystems. *Comptes Rendus - Geosci* 343:168–176.
- Boverhof DR, Bramante CM, Butala JH, Clancy SF, Lafranconi M, West J, Gordon SC (2015) Comparative assessment of nanomaterial definitions and safety evaluation considerations. *Regul Toxicol Pharmacol* 73:137–150.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Breiman A (2014) Plant Hsp90 and its co-chaperones. *Curr Protein Pept Sci* 15:232–244
- Budhani S, Egboluche NP, Arslan Z, Yu H, Deng H (2019) Phytotoxic effect of silver nanoparticles on seed germination and growth of terrestrial plants. *J Environ Sci Heal - Part C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 37:330–355.
- Bundschuh M, Filser J, Lüderwald S, McKee MS, Metreveli G, Schaumann GE, Schulz R, Wagner S (2018) Nanoparticles in the environment: where do we come from, where do we go to? *Environ Sci Eur* 30:6.
- Buzea C, Pacheco II, Robbie K (2007) Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases* 2:MR17–MR71.
- Carlson C, Hussein SM, Schrand AM, Braydich-Stolle LK, Hess KL, Jones RL, Schlager JJ (2008) Unique cellular interaction of silver nanoparticles: Size-dependent generation of reactive oxygen species. *J Phys Chem B* 112:13608–13619.
- Carocho M, Ferreira ICFR (2013) A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* 51:15–25.

- Caverzan A, Passaia G, Rosa SB, Ribeiro CW, Lazzarotto F, Margis-Pinheiro M (2012) Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genet Mol Biol* 35:1011–1019.
- Çekiç FÖ, Ekinçi S, İnal M, Ünal D (2017) Silver nanoparticles induced genotoxicity and oxidative stress in tomato plants. *Turkish J Biol* 41:700–707.
- Chen CE, Yeh KC, Wu SH, Wang HI, Yeh HH (2013) A vicilin-like seed storage protein, PAP85, is involved in tobacco mosaic virus replication. *J Virol* 87:6888–6900.
- Chen THH, Murata N (2008) Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends Plant Sci* 13:499–505.
- Chen X, Schluesener HJ (2008) Nanosilver: A nanoproduct in medical application. *Toxicol Lett* 176:1–12.
- Choudhary A, Kumar A, Kaur N (2020) ROS and oxidative burst: Roots in plant development. *Plant Divers* 42:33–43.
- Colombo G, Clerici M, Garavaglia ME, Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I (2016) A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 1019:178–190.
- Covian R, Chess D, Balaban RS (2012) Continuous monitoring of enzymatic activity within native electrophoresis gels: application to mitochondrial oxidative phosphorylation complexes. *Anal Biochem* 431:30–39.
- Culotta VC, Yang M, O'Halloran TV (2006) Activation of superoxide dismutases: putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta* 1763:747–758.
- Cvjetko P, Milošić A, Domijan AM, Vinković Vrček I, Tolić S, Peharec Štefanić P, Letofsky-Papst I, Tkalec M, Balen B (2017) Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicol Environ Saf* 137:18–28.
- Cvjetko P, Zovko M, Balen B (2014) Proteomics of heavy metal toxicity in plants. *Arh Hig Rada Toksikol* 65:1–18.
- Cvjetko P, Zovko M, Peharec Štefanić P, Biba R, Tkalec M, Domijan AM, Vinković Vrček I, Letofsky-Papst I, Šikić S, Balen B (2018) Phytotoxic effects of silver nanoparticles in tobacco plants. *Environ Sci Pollut Res* 25:5590–5602.
- Das R, Nath SS, Chakdar D, Gope G, Bhattacharjee R (2010) Synthesis of silver nanoparticles and their optical properties. *J Exp Nanosci* 5:357–362.
- De La Torre-Roche R, Hawthorne J, Musante C, Xing B, Newman LA, Ma X, White JC (2013) Impact of Ag nanoparticle exposure on p,p'-DDE bioaccumulation by *Cucurbita pepo* (zucchini) and *Glycine max* (soybean). *Environ Sci Technol* 47:718–725.
- De Leersnyder I, De Gelder L, Van Driessche I, Vermeir P (2019) Revealing the importance of aging, environment, size and stabilization mechanisms on the stability of metal

- nanoparticles: A case study for silver nanoparticles in a minimally defined and complex undefined bacterial growth medium. *Nanomaterials* 9:1684.
- De Pinto MC, De Gara L (2004) Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *J Exp Bot* 55:2559–2569.
- de Souza Cândido E, Pinto MFS, Pelegrini PB, Lima TB, Silva ON, Pogue R, Grossi-da-Sa MF, Franco OL (2011) Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. *FASEB J* 25:3290–3305.
- Del Río L, Corpas F, Lopez-Huertas E, Palma J (2018) Plant superoxide dismutases: function under abiotic stress conditions. U: Gupta D, Palma J (eds) *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants*. Springer, Cham 1–26.
- Dietz KJ, Herth S (2011) Plant nanotoxicology. *Trends Plant Sci* 16:582–589.
- Dimkpa CO, McLean JE, Martineau N, Britt DW, Haverkamp R, Anderson AJ (2013) Silver nanoparticles disrupt wheat (*Triticum aestivum* L.) growth in a sand matrix. *Environ Sci Technol* 47:1082–1090.
- Dmitrieva VA, Tyutereva EV, Voitsekhovskaja OV (2020) Singlet oxygen in plants: Generation, detection, and signaling roles. *Int J Mol Sci* 21:3237.
- do Espirito Santo Pereira A, Caixeta Oliveira H, Fernandes Fraceto L, Santaella C (2021) Nanotechnology potential in seed priming for sustainable agriculture. *Nanomaterials* 11:3390.
- Driessen MD, Mues S, Vennemann A, Hellack B, Bannuscher A, Vimalakanthan V, Riebeling C, Ossig R, Wiemann M, Schekenburger J, Kuhlbusch TAJ, Renard B, Luch A, Hasse A (2015) Proteomic analysis of protein carbonylation: a useful tool to unravel nanoparticle toxicity mechanisms. *Part Fibre Toxicol* 12:36.
- Du W, Sun Y, Ji R, Zhu J, Wu J, Guo H (2011) TiO₂ and ZnO nanoparticles negatively affect wheat growth and soil enzyme activities in agricultural soil. *J Environ Monit* 13:822–828.
- Dubas ST, Pimpan V (2008) Humic acid assisted synthesis of silver nanoparticles and its application to herbicide detection. *Mater Lett* 62:2661–2663.
- Durán N, Silveira CP, Durán M, Martínez DST (2015) Silver nanoparticle protein corona and toxicity: A mini-review. *J Nanobiotechnology* 13:1–17.
- El Badawy AM, Scheckel KG, Suidan M, Tolaymat T (2012) The impact of stabilization mechanism on the aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Sci Total Environ* 429:325–331.
- El-Beltagi HS, Mohamed HI (2013) Reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidative defense mechanism. *Not Bot Horti Agrobot* 41:44–57.

- Ezaki B, Higashi A, Nanba N, Nishiuchi T (2016) An S-adenosyl methionine synthetase (SAMS) gene from *Andropogon virginicus* L. confers aluminum stress tolerance and facilitates epigenetic gene regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci* 7:1627.
- Fang F, Li M, Zhang J, Lee CS (2020) Different strategies for organic nanoparticle preparation in biomedicine. *ACS Mater Lett* 2:531–549.
- Farmer EE, Mueller MJ (2013) ROS-mediated lipid peroxidation and RES-activated signaling. *Annu Rev Plant Biol* 64:429–450.
- Farooq M, Basra S, Ahmad N, Hafeez K (2005) Thermal hardening: A new seed vigor enhancement tool in rice. *J Integr Plant Biol* 47(2): 187-193.
- Farooqui A, Tabassum H, Ahmad A, Mabood A, Ahmad A, Ahmad Z, Zareen I (2016) Role of nanoparticles in growth and development of plants: A review. *Int J Pharma Bio Sci* 7:22–37.
- Faurobert M, Pelpoir E, Chaib J (2007) Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. *Methods Mol Biol* 355:9–14.
- Fedorova M (2017) Diversity of protein carbonylation pathways: direct oxidation, glycooxidation and modifications by lipid peroxidation products. U: Ros J (ed) protein carbonylation: principles, analysis, and biological implications. John Wiley & Sons, New Jersey 48-84.
- Fernando I, Zhou Y (2019) Impact of pH on the stability, dissolution and aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Chemosphere* 216:297–305.
- Fischer BB, Hideg É, Krieger-Liszky A (2013) Production, detection, and signaling of singlet oxygen in photosynthetic organisms. *Antioxid Redox Signal* 18:2145–2162.
- Fiskesjo G (1979) Mercury and selenium in a modified *Allium* test. *Hereditas* 91:169–178.
- Fissan H, Ristig S, Kaminski H, Asbach C, Epple M (2014) Comparison of different characterization methods for nanoparticle dispersions before and after aerosolization. *Anal Methods* 6:7324–7334.
- Flores-López LZ, Espinoza-Gómez H, Somanathan R (2019) Silver nanoparticles: Electron transfer, reactive oxygen species, oxidative stress, beneficial and toxicological effects. Mini review. *J Appl Toxicol* 39:16–26.
- Forlani G, Funck D (2020) A specific and sensitive enzymatic assay for the quantitation of L-proline. *Front Plant Sci* 11:1–12.
- Fouad AS, Hafez RM (2018) The effects of silver ions and silver nanoparticles on cell division and expression of *cdc2* gene in *Allium cepa* root tips. *Biol Plant* 62:166–172.
- Foyer CH, Noctor G (2003) Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol Plant* 119:355–364.

- Galazzi RM, Lopes Júnior CA, de Lima TB, Gozzo FC, Zezzi Arruda MA (2019) Evaluation of some effects on plant metabolism through proteins and enzymes in transgenic and non-transgenic soybeans after cultivation with silver nanoparticles. *J Proteomics* 191:88–106.
- Galmés J, Medrano H, Flexas J (2007) Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. *New Phytol* 175:81–93.
- Geisler-Lee J, Wang Q, Yao Y, Zhang W, Geisler M, Li K, Huang Y, Chen Y, Kolmakov A, Ma X (2013) Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. *Nanotoxicology* 7:323–337.
- Gherasim O, Puiu RA, Bîrca AC, Burdusel AC, Grumezescu AM (2020) An updated review on silver nanoparticles in biomedicine. *Nanomaterials* 10:2318.
- Ghosh M, J M, Sinha S, Chakraborty A, Mallick SK, Bandyopadhyay M, Mukherjee A (2012) *In vitro* and *in vivo* genotoxicity of silver nanoparticles. *Mutat Res* 749:60–69.
- Gichner T, Patková Z, Kim JK (2003) DNA damage measured by the Comet assay in eight agronomic plants. *Biol Plant* 47:185–188.
- Gichner T, Patková Z, Száková J, Demnerová K (2004) Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 559:49–57.
- Gill SS, Anjum NA, Gill R, Yadav S, Hasanuzzaman M, Fujita M, Mishra P, Sabat SC, Tuteja N (2015) Superoxide dismutase-mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. *Environ Sci Pollut Res* 22:10375–10394.
- Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem* 48:909–930.
- Girilal M, Mohammed Fayaz A, Elumalai LK, Satiyaseelan A, Gandhiappan J, Kalaichelvan PT (2018) Comparative stress physiology analysis of biologically and chemically synthesized silver nanoparticles on *Solanum lycopersicum* L. *Colloid Interface Sci Commun* 24:1–6.
- Gondikas AP, Jang EK, Hsu-Kim H (2010) Influence of amino acids cysteine and serine on aggregation kinetics of zinc and mercury sulfide colloids. *J Colloid Interface Sci* 347:167–171.
- Gondikas AP, Morris A, Reinsch BC, Marinakos SM, Lowry GV, Hsu-Kim H (2012) Cysteine-induced modifications of zero-valent silver nanomaterials: Implications for particle surface chemistry, aggregation, dissolution, and silver speciation. *Environ Sci Technol* 46:7037–7045.
- Gong H, Jiao Y, Hu W, Pua E (2005) Expression of glutathione-S-transferase and its role in plant growth and development *in vivo* and shoot morphogenesis *in vitro*. *Plant Mol Biol* 57:53–66.

- Gottschalk F, Nowack B (2011) The release of engineered nanomaterials to the environment. *J Environ Monit* 13:1145–1155.
- Gregorich ZR, Chang YH, Ge Y (2014) Proteomics in heart failure: Top-down or bottom-up? *Pflügers Arch Eur J Physiol* 466:1199–1209.
- Gubbins EJ, Batty LC, Lead JR (2011) Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. *Environ Pollut* 159:1551–1559.
- Guerrini L, Alvarez-Puebla R, Pazos-Perez N (2018) Surface modifications of nanoparticles for stability in biological fluids. *Materials* 11:1154.
- Gugulothu D, Barhoum A, Afzal SM, Venkateshwarlu B, Uludag H (2019) Structural multifunctional nanofibers and their emerging applications. U: Barhoum A, Bechelany M, Makhoulouf A (eds) *Handbook of nanofibers*. Springer, Cham 693-732.
- Güzel R, Erdal G (2018) Synthesis of silver nanoparticles. U: Maaz K (ed), *Silver nanoparticles - fabrication, characterization and applications*. IntechOpen, London.
- Han C, Yang P (2015) Studies on the molecular mechanisms of seed germination. *Proteomics* 15:1671–1679.
- Hasanuzzaman M, Bhuyan MHMB, Zulfiqar F, Raza A, Mohsin SM, Mahmud JA, Fujita M, Fotopoulos V (2020) Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*. 2020; 9(8):681.
- Hasanuzzaman M, Nahar K, Anee TI, Fujita M (2017) Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiol Mol Biol Plants* 23:249–268.
- Hashemi S (2019) Effect of nanoparticles on lipid peroxidation in plants. U: Baez, RV (ed) *Advances in lipid metabolism*. IntechOpen, London.
- Hashimoto T, Mustafa G, Nishiuchi T, Komatsu S (2020) Comparative analysis of the effect of inorganic and organic chemicals with silver nanoparticles on soybean under flooding stress. *Int J Mol Sci* 21:1300.
- Hatami M (2017) Stimulatory and inhibitory effects of nanoparticulates on seed germination and seedling vigor indices. U: Ghorbanpour M, Manika K, Varma A (eds) *Nanoscience and plant–soil systems*. *Soil Biology* 48, Springer, Cham 357-385.
- He W, Zhou YT, Wamer WG, Boudreau MD, Yin JJ (2012) Mechanisms of the pH dependent generation of hydroxyl radicals and oxygen induced by Ag nanoparticles. *Biomaterials* 33:7547–7555.
- Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 125:189–198.
- Hossain Z, Mustafa G, Sakata K, Komatsu S (2016) Insights into the proteomic response of soybean towards Al₂O₃, ZnO, and Ag nanoparticles stress. *J Hazard Mater* 304:291–305.

- Hossain Z, Yasmeen F, Komatsu S (2020) Nanoparticles: Synthesis, morphophysiological effects, and proteomic responses of crop plants. *Int J Mol Sci* 21:3056.
- Huang H, Ullah F, Zhou DX, Yi M, Zhao Y (2019) Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses. *Front Plant Sci* 10:800.
- Hwang ET, Lee JH, Chae YJ, Kim YS, Kim BC, Sang BI, Gu MB (2008) Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria. *Small* 4:746–750.
- Isaacson T, Damasceno CMB, Saravanan RS, He Y, Catala C, Saladie M, Rose JKC (2006) Sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of plant tissues. *Nat Protoc* 1:769–774.
- Jacob JA, Mahal HS, Biswas N, Mukherjee T, Kapoor S (2008) Role of phenol derivatives in the formation of silver nanoparticles. *Langmuir* 24:528–533.
- Jambunathan N (2010) Determination and detection of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, and electrolyte leakage in plants. *Methods Mol Biol* 639:292–298.
- Jansson S (1994) The light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins. *Biochim Biophys Acta* 1184:1–19.
- Jeevanandam J, Barhoum A, Chan YS, Dufresne A, Danquah MK (2018) Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. *Beilstein J Nanotechnol* 9:1050–1074.
- Jeevanandam J, Sundaramurthy A, Sharma V, Murugan C, Pal K, Abdel Kodous MH, Danquah MK (2019) Sustainability of one-dimensional nanostructures: Fabrication and industrial applications. *U: Sustainable Nanoscale Engineering*. Elsevier, Amsterdam 83–113.
- Jellouli N, Salem A Ben, Ghorbel A, Jouira H Ben (2010) Evaluation of protein extraction methods for *Vitis vinifera* leaf and root proteome analysis by two-dimensional electrophoresis. *J Integr Plant Biol* 52:933–940.
- Jena NR (2012) DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J Biosci* 37:503–517.
- Jhanzab HM, Razzaq A, Bibi Y, Yasmeen F, Yamaguchi H, Hitachi K, Tsuchida K, Komatsu S (2019) Proteomic analysis of the effect of inorganic and organic chemicals on silver nanoparticles in wheat. *Int J Mol Sci* 20:825.
- Jiang HS, Qiu XN, Li GB, Li W, Yin LY (2014) Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *Spirodela polyrhiza*. *Environ Toxicol Chem* 33:1398–1405.
- Jiang W, Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW (2008) Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nat Nanotechnol* 3:145–150.

- Jin H, Guo C, Liu X, Liu J, Vasileff A, Jiao Y, Zheng Y, Qiao SZ (2018) Emerging two-dimensional nanomaterials for electrocatalysis. *Chem Rev* 118:6337–6408.
- Joshi M, Bhattacharyya A, Ali SW (2008) Characterization techniques for nanotechnology applications in textiles. *Indian J Fibre Text Res* 33:304–317.
- Kamencic H, Lyon A, Paterson PG, Juurlink BHJ (2000) Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione. *Anal Biochem* 286:35–37.
- Karimi J, Mohsenzadeh S (2017) Physiological effects of silver nanoparticles and silver nitrate toxicity in *Triticum aestivum*. *Iran J Sci Technol Trans A Sci* 41:111–120.
- Kaveh R, Li Y-S, Ranjbar S, Tehrani R, Brueck CL, Van Aken B (2013) Changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions. *Environ Sci Technol* 47:10637–10644.
- Ke M, Qu Q, Peijnenburg WJGM, Li X, Zhang M, Zhang Z, Lu T, Pan X, Qian H (2018) Phytotoxic effects of silver nanoparticles and silver ions to *Arabidopsis thaliana* as revealed by analysis of molecular responses and of metabolic pathways. *Sci Total Environ* 644:1070–1079.
- Khan I, Saeed K, Khan I (2019) Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arab J Chem* 12:908–931.
- Kim JH, Lee Y, Kim EJ, Gu S, Sohn EJ, Seo YS, An HJ, Chang YS (2014) Exposure of iron nanoparticles to *Arabidopsis thaliana* enhances root elongation by triggering cell wall loosening. *Environ Sci Technol* 48:3477–3485.
- Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim JH, Park SJ, Lee HJ, Kim SH, Park YK, Park YH, Hwang CY, Kim YK, Lee YS, Jeong DH, Cho MH (2007) Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: NBM* 3:95–101.
- Koczur K, Mourdikoudis S, Lakshminarayana P, Skrabalak S (2015) Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. *Dalt Trans* 44:17883-17905.
- Kolahalam LA, Kasi Viswanath I V., Diwakar BS, Govindh B, Reddy V, Murthy YLN (2019) Review on nanomaterials: Synthesis and applications. *Mater Today Proc* 18:2182–2190.
- Köllner TG, Lenk C, Zhao N, Seidl-Adams I, Gerhenzon J, Chen F, Degenhardt J (2010) Herbivore-induced SABATH methyltransferases of maize that methylate anthranilic acid using S-adenosyl-L-methionine. *Plant Physiol* 153:1795–1807.
- Kosová K, Vítámvás P, Planchon S, Renaut J, Vankova R, Prašil IT (2013) Proteome analysis of cold response in spring and winter wheat (*Triticum aestivum*) crowns reveals similarities in stress adaptation and differences in regulatory processes between the growth habits. *J Proteome Res* 12:4830–4845.
- Kosová K, Vítámvás P, Prašil IT (2014) Proteomics of stress responses in wheat and barley – search for potential protein markers of stress tolerance. *Front Plant Sci* 5:711.

- Krishnaraj C, Jagan EG, Ramachandran R, Abirami SM, Mohan N, Kalaichelevan PT (2012) Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. *Process Biochem* 47:651–658.
- Kucera B, Cohn M, Leubner G (2005) Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci Res* 15:281–397.
- Kumari M, Mukherjee A, Chandrasekaran N (2009) Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Sci Total Environ* 407:5243–5246.
- Lange H (1995) Comparative test of methods to determine particle size and particle size distribution in the submicron range. *Part Part Syst Charact* 12:148–157.
- Larue C, Castillo-Michel H, Sobanska S, Cecillon L, Bureau S, Barthes V, Ouerdane L, Carriere M, Sarret G (2014) Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: Evidence for internalization and changes in Ag speciation. *J Hazard Mater* 264:98–106.
- Lee WM, Kwak J Il, An YJ (2012) Effect of silver nanoparticles in crop plants *Phaseolus radiatus* and *Sorghum bicolor*: Media effect on phytotoxicity. *Chemosphere* 86:491–499.
- Levard C, Hotze EM, Colman BP, Dale AL, Troung L, Yang X, Bone A, Brown GE, Tanguay RL, Di Giulio RT, Bernhardt E, Meyer J, Wiesner MR, Lowry GW (2013) Sulfidation of silver nanoparticles: Natural antidote to their toxicity. *Environ Sci Technol* 47:13440–13448.
- Levard C, Hotze EM, Lowry G V, Brown GEJ (2012) Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environ Sci Technol* 46:6900–6914.
- Levine AS, Sun L, Tan R, Gao Y, Yang L, Chen H, Teng Y, Lan L (2017) The oxidative DNA damage response: A review of research undertaken with Tsinghua and Xiangya students at the University of Pittsburgh. *Sci China Life Sci* 60:1077–1080.
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233:346–357.
- Li CC, Chang SJ, Su FJ, Lin SW, Chou YC (2013) Effects of capping agents on the dispersion of silver nanoparticles. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 419:209–215.
- Li W-Q, Qing T, Li C-C, Li F, Ge F, Fei JJ, Peijnenburg WJGM (2020) Integration of subcellular partitioning and chemical forms to understand silver nanoparticles toxicity to lettuce (*Lactuca sativa* L.) under different exposure pathways. *Chemosphere* 258:127349.
- Li X, Ke M, Zhang M, Peijnenburg WJGM, Fan X, Xu J, Zhang Z, Lu T, Fu Z, Qian H (2018) The interactive effects of diclofop-methyl and silver nanoparticles on *Arabidopsis thaliana*: Growth, photosynthesis and antioxidant system. *Environ Pollut* 232:212–219.
- Li Y, Qin T, Ingle T, Yan Y, He W, Yin JJ, Chen T (2017) Differential genotoxicity mechanisms of silver nanoparticles and silver ions. *Arch Toxicol* 91:509–519.

- Liang L, Tang H, Deng Z, Liu Y, Chen X, Wang H (2018) Ag nanoparticles inhibit the growth of the bryophyte, *Physcomitrella patens*. *Ecotoxicol Environ Saf* 164:739–748.
- Liang X, Zhang L, Natarajan SK, Becker DF (2013) Proline mechanisms of stress survival. *Antioxid Redox Signal* 19:998–1011.
- Lin D, Xing B (2007) Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environ Pollut* 150:243–250.
- Lin D, Xing B (2008) Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environ Sci Technol* 42:5580–5585.
- Lin PC, Lin S, Wang PC, Sridhar R (2014) Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnol Adv* 32:711–726.
- Lis D, Cecchet F (2014) Localized surface plasmon resonances in nanostructures to enhance nonlinear vibrational spectroscopies: Towards an astonishing molecular sensitivity. *Beilstein J Nanotechnol* 5:2275–2292.
- Liu J, Sonshine DA, Shervani S, Hurt RH (2010) Controlled release of biologically active silver from nanosilver surfaces. *ACS Nano* 4:6903–6913.
- Liu JF, Yu SJ, Yin YG, Chao JB (2012) Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles. *Trends Anal Chem* 33:95–106.
- Liu JH, Wang AQ, Chi YS, Lin HP, Mou CY (2005) Synergistic effect in an Au-Ag alloy nanocatalyst: CO oxidation. *J Phys Chem B* 109:40–43.
- Liu R, Xu YH, Jiang SC, Lu K, Lu YF, Feng XJ, Wu Z, Liang S, Yu YT, Wang XF, Zhang DP (2013) Light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins, positively involved in abscisic acid signalling, require a transcription repressor, WRKY40, to balance their function. *J Exp Bot* 64:5443–5456.
- Locato V, Cimini S, De Gara L (2013) Strategies to increase vitamin C in plants: From plant defense perspective to food biofortification. *Front Plant Sci* 4:1–12.
- Lubick N (2008) Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles – or both? *Environ Sci Technol* 42:8617.
- Luoma S (2008) Silver nanotechnologies and the environment: Old problems and new challenges, Project on emerging nanotechnologies, Washington.
- Lv J, Christie P, Zhang S (2019) Uptake, translocation, and transformation of metal-based nanoparticles in plants: recent advances and methodological challenges. *Environ Sci Nano* 6:41–59.
- Ma C, White JC, Dhankher OP, Xing B (2015) Metal-based nanotoxicity and detoxification pathways in higher plants. *Environ Sci Technol* 49:7109–7122.

- Ma R, Levard C, Judy JD, Unrine JM, Durenkamp M, Martin B, Jefferson B, Lowry GV (2014) Fate of zinc oxide and silver nanoparticles in a pilot wastewater treatment plant and in processed biosolids. *Environ Sci Technol* 48:104–112.
- Ma X, Geiser-Lee J, Deng Y, Kolmakov A (2010) Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Sci Total Environ* 408:3053–3061.
- MacCuspie RI, Rogers K, Patra M, Suo Z, Allen AJ, Martin MN, Hackley VA (2011) Challenges for physical characterization of silver nanoparticles under pristine and environmentally relevant conditions. *J Environ Monit* 13:1212–1226.
- Maehly AC, Chance B (1954) The assay of catalase and peroxidases. *Methods Biochem Anal* 1:358–423.
- Mahmood Q, Ahmad R, Kwak SS, Rashid A, Anjum NA (2010) Ascorbate and glutathione: protectors of plants in oxidative stress. U: Mahmood Q, Ahmad R, Kwak SS, Rashid A, Anjum NA (eds) *Ascorbate-glutathione pathway and stress tolerance in plants*. Springer Berlin, 209–229.
- Majumdar S, Keller AA (2021) Omics to address the opportunities and challenges of nanotechnology in agriculture. *Crit Rev Environ Sci Technol* 51:2595–2636.
- Majumdar S, Pagano L, Wohlschlegel JA, Villani M, Zappettini A, White J, Keller AA (2019) Proteomic, gene and metabolite characterization reveal the uptake and toxicity mechanisms of cadmium sulfide quantum dots in soybean plants. *Environ Sci Nano* 6:3010–3026.
- 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.
- Marchioni M, Jouneau PH, Chevallet M, Michaud-Soret I, Deniaud A (2018) Silver nanoparticle fate in mammals: Bridging *in vitro* and *in vivo* studies. *Coord Chem Rev* 364:118–136.
- Marí M, Colell A, Morales A, von Montfort C, Garcia-Ruiz C, Fernandez.Checa JC (2010) Redox control of liver function in health and disease. *Antioxid Redox Signal* 12:1295–1331.
- Masi A, Ghisi R, Ferretti M (2002) Measuring low-molecular-weight thiols by detecting the fluorescence of their SBD-derivatives: application to studies of diurnal and UV-B induced changes in *Zea mays* L. *J Plant Physiol* 159:499–507.
- Matras E, Gorczyca A, Pocięcha E, Przemieniecki SW, Ocwieja M (2022) Phytotoxicity of silver nanoparticles with different surface properties on monocots and dicots model plants. *J Soil Sci Plant Nutr* 2022.

- McGillicuddy E, Murray I, Kavanagh S, Morrison L, Fogarty A, Cormican M, Dockery P, Prendergast M, Rowan N, Morris D (2017) Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. *Sci Total Environ* 575:231–246.
- Metreveli G, Frombold B, Seitz F, Grun A, Philippe A, Rosenfeldt RR, Bundschuh M, Schulz R, Manz W, Schaumann GE (2016) Impact of chemical composition of ecotoxicological test media on the stability and aggregation status of silver nanoparticles. *Environ Sci Nano* 3:418–433.
- Mirzajani F, Askari H, Hamzelou S, Farzaneh M, Ghassempour (2013) Effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa* L. and its rhizosphere bacteria. *Ecotoxicol Environ Saf* 88:48–54.
- Mirzajani F, Askari H, Hamzelou S, Schober Y, Rompp A, Ghassempour A, Spengler B (2014) Proteomics study of silver nanoparticles toxicity on *Oryza sativa* L. *Ecotoxicol Environ Saf* 108:335–339.
- Mittler R (2017) ROS are good. *Trends Plant Sci* 22:11–19.
- Mittler R, Zilinskas BA (1993) Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Anal Biochem* 212:540–546.
- Mogoşanu GD, Grumezescu AM, Bejenaru C, Bejenaru LE (2016) Polymeric protective agents for nanoparticles in drug delivery and targeting. *Int J Pharm* 510:419–429.
- Molassiotis A, Fotopoulos V (2011) Oxidative and nitrosative signaling in plants: Two branches in the same tree? *Plant Signal Behav* 6:210–214.
- Møller IM, Jensen PE, Hansson A (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annu Rev Plant Biol* 58:459–481.
- Monopoli MP, Åberg C, Salvati A, Dawson KA (2012) Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nat Nanotechnol* 7:779–786.
- Moore TL, Rodriguez-Lorenzo L, Hirsch V, Balog S, Urban D, Jud C, Rothen-Rutishauser B, Lattuada M, Petri-Fink A (2015) Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. *Chem Soc Rev* 44:6287–6305.
- Müntz K (1998) Deposition of storage proteins. *Plant Mol Biol* 38:77–99.
- Muraleetharan V, Mantaj J, Swedrowska M, Vllasaliu D (2019) Nanoparticle modification in biological media: Implications for oral nanomedicines. *RSC Adv* 9:40487–40497.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497.
- Musante C, White JC (2012) Toxicity of silver and copper to *Cucurbita pepo*: differential effects of nano and bulk-size particles. *Environ Toxicol* 27:510–517.

- Mustafa G, Sakata K, Hossain Z, Komatsu S (2015) Proteomic study on the effects of silver nanoparticles on soybean under flooding stress. *J Proteomics* 122:100–118.
- Nair PMG, Chung IM (2014a) Assessment of silver nanoparticle-induced physiological and molecular changes in *Arabidopsis thaliana*. *Environ Sci Pollut Res* 21:8858–8869.
- Nair PMG, Chung IM (2014b) Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere* 112:105–113.
- Nair R, Varghese SH, Nair BG, et al (2010) Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Sci* 179:154–163.
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol* 22:867–880.
- Navarro E, Baun A, Behra R, Hartmann NB, Filser J, Miao AJ, Quigg A, Santschi PH, Sigg L (2008a) Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17:372–386.
- Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, Marconi F, Kaegi R, Odzak N, Sigg L, Behra R (2008b) Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ Sci Technol* 42:8959–8964.
- Navarro E, Wagner B, Odzak N, Sigg L, Behra R (2015) Effects of differently coated silver nanoparticles on the photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ Sci Technol* 49:8041–8047.
- Neeley WL, Essigmann JM (2006) Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. *Chem Res Toxicol* 19:491–505.
- Nel A, Xia T, Mädler L, Li N (2006) Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311:622–627.
- Niu L, Zhang H, Wu Z, Wang Y, Liu H, Wu X, Wang W (2018) Modified TCA/acetone precipitation of plant proteins for proteomic analysis. *PLoS One* 13: e0202238.
- Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Biol* 49:249–279.
- Noginov MA, Zhu G, Bahoura M, Adegoke J, Small C, Ritzo BA, Drachev VP, Shalaev VM (2007) The effect of gain and absorption on surface plasmons in metal nanoparticles. *Appl Phys B Lasers Opt* 86:455–460.
- Nott A, Jung H-S, Koussevitzky S, Chory J (2006) Plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Annu Rev Plant Biol* 57:739–759.
- Oracz K, Karpiński S (2016) Phytohormones signaling pathways and ROS involvement in seed germination. *Front Plant Sci* 7:1–6.

- Ortega-Villasante C, Burén S, Barón-Sola Á, Martínez F, Hernández LE (2016) In vivo ROS and redox potential fluorescent detection in plants: Present approaches and future perspectives. *Methods* 109:92–104.
- Oschatz M, Borchardt L, Hippauf F, Nickel W, Kaskel S, Brunner E (2016) Chapter four - Interactions between electrolytes and carbon-based materials – NMR studies on electrical double-layer capacitors, lithium-ion batteries, and fuel cells. *Annu Rep NMR Spectrosc* 237-318.
- Oukarroum A, Barhoumi L, Pirastru L, Dewez D (2013) Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemna gibba*. *Environ Toxicol Chem* 32:902–907.
- Pallavi, Mehta CM, Srivastava R, Arora S, Sharma AK (2016) Impact assessment of silver nanoparticles on plant growth and soil bacterial diversity. *3 Biotech* 6:254.
- Pan SM, Yau YY (1992) Characterization of superoxide dismutase in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 37:58–65.
- Paramelle D, Sadovoy A, Gorelik S, Free P, Hobley J, Fernig DG (2014) A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. *Analyst* 139:4855–4861.
- Patlolla AK, Berry A, May L, Tchounwou PB (2012) Genotoxicity of silver nanoparticles in *Vicia faba*: a pilot study on the environmental monitoring of nanoparticles. *Int J Environ Res Public Health* 9:1649–1662.
- Pavoković D, Križnik B, Krsnik-Rasol M (2012) Evaluation of protein extraction methods for proteomic analysis of non-model recalcitrant plant tissues. *Croat Chem Acta* 85:177–183.
- Pavoković D, Šola I, Hagège D, Krsnik-Rasol M (2007) Sugar-induced changes in cellular and extracellular protein and glycoprotein patterns of sugarbeet cell lines. *Acta Bot Croat* 66:127–134.
- Peharec Štefanić P, Cvjetko P, Biba R, Domijan AM, Letofsky-Papst I, Tkalec M, Šikić S, Cindrić M, Balen B (2018) Physiological, ultrastructural and proteomic responses of tobacco seedlings exposed to silver nanoparticles and silver nitrate. *Chemosphere* 209:640–653.
- 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. *Environ Sci Pollut Res* 26:22529–22550.
- Peharec Štefanić P, Košpić K, Lyons DM, Jurković L, Balen B, Tkalec M (2021) Phytotoxicity of silver nanoparticles on tobacco plants: Evaluation of coating effects on photosynthetic performance and chloroplast ultrastructure. *Nanomaterials* 11:744.
- Pem B, Čurlin M, Jurašin DD, Vrčec V, Barbir R, Micek V, Fratila RM, de la Fuente J, Vinković Vrčec I (2021) Fate and transformation of silver nanoparticles in different biological conditions. *Beilstein J Nanotechnol* 12:665–679.

- Perdomo JA, Capó-Bauçà S, Carmo-Silva E, Galmés J (2017) Rubisco and Rubisco activase play an important role in the biochemical limitations of photosynthesis in rice, wheat, and maize under high temperature and water deficit. *Front Plant Sci* 8:490.
- Pereira SPP, Jesus F, Aguiar S, de Oliveira R, Fernandes M, Ranville J, Nogueira AJA (2018) Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor*: Surface coating and exposure period-related effects. *Sci Total Environ* 618:1389–1399.
- Pérez-de-Luque A (2017) Interaction of nanomaterials with plants: What do we need for real applications in agriculture? *Front Environ Sci* 5:1–7.
- Pokhrel LR, Dubey B (2013) Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles. *Sci Total Environ* 452–453:321–332.
- Pokropivny VV, Skorokhod VV (2007) Classification of nanostructures by dimensionality and concept of surface forms engineering in nanomaterial science. *Mater Sci Eng C* 27:990–993.
- Pradas del Real AE, Vidal V, Carrière M, Castillo-Michel H, Levard C, Chaurand P, Sarret G (2017) Silver nanoparticles and wheat roots: A complex interplay. *Environ Sci Technol* 51:5774–5782.
- Pražak R, Świąciło A, Krzepińko A, Michalek S, Arczewska M (2020) Impact of Ag nanoparticles on seed germination and seedling growth of green beans in normal and chill temperatures. *Agric* 10:1–16.
- 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*. *J Environ Sci* 25:1947–1955.
- Quanbeck SM, Brachova L, Campbell AA, Guan X, Perera A, He K, Rhee SY, Bais P, Dickerson JA, Dixon P, Wohlgemuth G, Fiehn O, Barkan L, Lange I, Lange BM, Lee I, Cortes D, Salazar C, Shuman J, Shulaev V, Huhman DV, Sumner LW, Roth MR, Welti R, Ilarslan H, Wurtele ES and Nikolau BJ (2012) Metabolomics as a hypothesis-generating functional genomics tool for the annotation of *Arabidopsis thaliana* genes of “unknown function.” *Front Plant Sci* 3:1–12.
- Radchuk V, Borisjuk L (2014) Physical, metabolic and developmental functions of the seed coat. *Front Plant Sci* 5:1–17.
- Rahman I, Kode A, Biswas SK (2007) Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc* 1:3159–3165.
- Rai PK, Kumar V, Lee SS, Raza N, Kim KH, Ok YS, Tsang DCW (2018) Nanoparticle-plant interaction: Implications in energy, environment, and agriculture. *Environ Int* 119:1–19.
- Raja V, Majeed U, Kang H, Andrabi KI, John R (2017) Abiotic stress: Interplay between ROS, hormones and MAPKs. *Environ Exp Bot* 137:142–157.

- Rajeshwari A, Roy B, Chandrasekaran N, Mukherjee A (2016) Cytogenetic evaluation of gold nanorods using *Allium cepa* test. *Plant Physiol Biochem* 109:209–219.
- Rajput VD, Harish, Singh RK, Verma KK, Sharma L, Quiroz-Figueroa FR, Meena M, Gour VS, Minkina T, Sushkova S, Mandzhieva S (2021) Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. *Biology* 10:267.
- Rastogi A, Zivcak M, Sytar O, Kalaji HM, He X, Mbarki S and Brestic M (2017) Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant: A critical review. *Front Chem* 5:78.
- Ravindran A, Dhas SP, Chandrasekaran N, Mukherjee A (2013) Differential interaction of silver nanoparticles with cysteine. *J Exp Nanosci* 8:589–595.
- Repetto M, Semprine J, Boveris A (2012) Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. U: Catala A (ed) *Lipid peroxidation*. IntechOpen, London.
- Ribeiro CW, Korbes AP, Garighan JA, Jardim-Messeder D, Carvalho FEL, Sousa RHV, Carvezan A, Teixeira FK, Silveira JAG (2017) Rice peroxisomal ascorbate peroxidase knockdown affects ROS signaling and triggers early leaf senescence. *Plant Sci* 263:55–65.
- Rico CM, Majumdar S, Duarte-Gardea M, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL (2011) Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *J Agric Food Chem*. 59:3485-3498.
- Ruttkay-Nedecky B, Krystofova O, Nejdil L, Adam V (2017) Nanoparticles based on essential metals and their phytotoxicity. *J Nanobiotechnology* 15:1–20.
- Sachdeva M, Karan M, Singh T, Dhingra S, Highway UB, Fleurs C (2014) Oxidants and antioxidants in complementary and alternative medicine: a review. *Spatula DD* 4(1):1.
- Saeb ATM, Alshammari AS, Al-Brahim H, Al-Rubeaan KA (2014) Production of silver nanoparticles with strong and stable antimicrobial activity against highly pathogenic and multidrug resistant bacteria. *Sci World J* 2014:704708.
- Salbitani G, Bottone C, Carfagna S (2017) Determination of reduced and total glutathione content in extremophilic microalga *Galdieria phlegrea*. *Bio-protocol* 7:e2372.
- Saleeb N, Gooneratne R, Cavanagh JA, Bunt C, Mofasser Hossain AKM, Gaw S, Robinson B (2019) The mobility of silver nanoparticles and silver ions in the soil-plant system. *J Environ Qual* 48:1835-1841.
- Sannomiya T, Hafner C, Voros J (2008) *In situ* sensing of single binding events by localized surface plasmon resonance. *Nano Lett* 8:3450–3455.
- Schubert J, Chanana M (2018) Coating matters: review on colloidal stability of nanoparticles with biocompatible coatings in biological media, living cells and organisms. *Curr Med Chem* 25:4553–4586.

- Seitz F, Lüderwald S, Rosenfeldt RR, Schulz R, Bundschuh M (2015) Aging of TiO₂ nanoparticles transiently increases their toxicity to the pelagic microcrustacean *Daphnia magna*. PLoS One 10:e0126021–e0126021.
- Shaikhaldein HO, Al-Qurainy F, Nadeem M, Khan S, Tarroum M, Salih AM (2020) Biosynthesis and characterization of silver nanoparticles using *Ochradenus arabicus* and their physiological effect on *Maerua oblongifolia* raised *in vitro*. Sci Rep 10:17569.
- Shalan AE, Barhoum A, Elseman AM, Rashad MM, Lira-Cantu M (2018) Nanofibers as promising materials for new generations of solar cells. U: Barhoum A, Bechelany M, Makhlof A (eds) Handbook of nanofibers. Springer, Cham 1-33.
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. J Bot 2012:217037.
- Sharma VK, Siskova KM, Zboril R, Gardea-Torresdey JL (2014) Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: fate, stability and toxicity. Adv Colloid Interface Sci 204:15–34.
- Singh J, Pandey P, James D, Chandrasekhar K, Murali Achary VM, Kaul T, Tripathy BC, Reddy MK (2014) Enhancing C3 photosynthesis: an outlook on feasible interventions for crop improvement. Plant Biotechnol J 12:1217–1230.
- Sirpiö S, Suorsa M, Paakkarinen V, Aro EM (2011). Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: novel super- and megacomplexes. Biochem 439 (2):207-214.
- Siuti N, Kelleher NL (2007) Decoding protein modifications using top-down mass spectrometry. Nat Methods 4:817–821.
- Sofa A, Scopa A, Nuzzaci M, Vitti A (2015) Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. Int J Mol Sci 16:13561–13578.
- Song U, Jun H, Waldman B, Roh J, Kim Y, Yi J, Lee EJ (2013) Functional analyses of nanoparticle toxicity: A comparative study of the effects of TiO₂ and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). Ecotoxicol Environ Saf 93:60–67.
- Špoljarević M, Agić D, Lisjak M, Gumze A, Wilson ID, Hancock JT, Teklić T (2011) The relationship of proline content and metabolism on the productivity of maize plants. Plant Signal Behav 6:251–257.
- Stadtman ER (1990) Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: Biochemical mechanism and biological consequences. Free Radic Biol Med 9:315–325.
- Staneloni RJ, Rodriguez-Batiller MJ, Casal JJ (2008) Abscisic acid, high-light, and oxidative stress down-regulate a photosynthetic gene via a promoter motif not involved in phytochrome-mediated transcriptional regulation. Mol Plant 1:75–83.

- Steen H, Mann M (2004) The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:699–711.
- Stegemeier JP, Colman BP, Schwab F, Wiesner MR, Lowry GV (2017) Uptake and distribution of silver in the aquatic plant *Landoltia punctata* (Duckweed) exposed to silver and silver sulfide nanoparticles. *Environ Sci Technol* 51:4936–4943.
- Stensberg MC, Wei Q, McLamore ES, Porterfield DM, Wei A, Sepulveda MS (2011) Toxicological studies on silver nanoparticles: Challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging. *Nanomedicine* 6:879–898.
- Stephenie S, Chang YP, Gnanasekaran A, Stephanie S, Chang YP, Gnanasekaran A, Norhaizan ME, Gnanaraj C (2020) An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. *J Funct Foods* 68:103917.
- Sudha PN, Sangeetha K, Vijayalakshmi K, Barhoum A (2018) Chapter 12 Nanomaterials history, classification, unique properties, production and market. U: Maklouf ASH, Barhoum A (eds) *Emerging applications of nanoparticles and architectural nanostructures, Current prospects and future trends*. Elsevier, Amsterdam 341–384.
- Sun J, Wang L, Li S, Yin L, Huang J, Chen C (2017) Toxicity of silver nanoparticles to *Arabidopsis*: Inhibition of root gravitropism by interfering with auxin pathway. *Environ Toxicol Chem* 36:2773–2780.
- Suresh AK, Pelletier DA, Wang W, Moon JW, Gu B, Mortensen NP, Allison DP, Joy DC, Phelps TJ, Doktycz MJ (2010) Silver nanocrystallites: biofabrication using *Shewanella oneidensis*, and an evaluation of their comparative toxicity on Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Environ Sci Technol* 44:5210–5215.
- Suzuki N, Koussevitzky S, Mittler R, Miller G (2012) ROS and redox signaling in the response of plants to abiotic stress. *Plant, Cell Environ* 35:259–270.
- Syu Y, Hung JH, Chen JC, Chuang H (2014) Impacts of size and shape of silver nanoparticles on *Arabidopsis* plant growth and gene expression. *Plant Physiol Biochem* 83:57–64.
- Szöllősi R, Molnár Á, Kondak S, Kolbert Z (2020) Dual effect of nanomaterials on germination and seedling growth: Stimulation vs. phytotoxicity. *Plants* 9:1745.
- Tadros T (2010) General principles of colloid stability and the role of surface forces. U: Tadros TF (ed) *Colloid stability: The role of surface forces, Part I*. Wiley-VCH, Weinheim, 11–22.
- Tausz M, Šircelj H, Grill D (2004) The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *J Exp Bot* 55:1955–1962.
- Tejamaya M, Römer I, Merrifield RC, Lead JR (2012) Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Environ Sci Technol* 46:7011–7017.
- Teo Z, Savas P, Loi S (2016) Gene expression analysis: current Methods. U: Lakhani, SR, Fox, SB (eds) *Molecular pathology in cancer research*. Springer, New York 107–136.

- Thiruvengadam M, Gurunathan S, Chung IM (2015) Physiological, metabolic, and transcriptional effects of biologically-synthesized silver nanoparticles in turnip (*Brassica rapa* ssp. *rapa* L.). *Protoplasma* 252:1031–1046.
- Thuesombat P, Hannongbua S, Akasit S, Chadchawan S (2014) Effect of silver nanoparticles on rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) seed germination and seedling growth. *Ecotoxicol Environ Saf* 104:302–309.
- Tkalec M, Peharec Štefanić P, Balen B (2019) Phytotoxicity of silver nanoparticles and defence mechanisms. U: Verma SK, Das AK (eds) *Analysis, fate, and toxicity of engineered nanomaterials in plants - Comprehensive Analytical Chemistry*. Elsevier, Amsterdam, 145-198.
- Tola AJ, Jaballi A, Missihoun TD (2021) Protein carbonylation: Emerging roles in plant redox biology and future prospects. *Plants* 10:71451.
- Tolaymat TM, El Badawy AM, Genaidy A, Scheckel KG, Luxton TP, Suidan M (2010) An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: A systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Sci Total Environ* 408:999–1006.
- Tran QH, Nguyen VQ, Le A (2013) Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv Nat Sci: Nanosci Nanotechnol* 4:033001.
- Tripathi DK, Singh S, Singh VP, Prasad SM, Dubey NK, Chauhan DK (2017a) Silicon nanoparticles more effectively alleviated UV-B stress than silicon in wheat (*Triticum aestivum*) seedlings. *Plant Physiol Biochem* 110:70–81.
- Tripathi DK, Tripathi A, Shweta, Singh S, Singh Y, Vishwakarma K, Yadav G, Sharma S, Singh VK, Mishra RK, Upadhyay RG, Dubey NK, Lee Y and Chauhan DK (2017b) Uptake, accumulation and toxicity of silver nanoparticle in autotrophic plants, and heterotrophic microbes: A concentric review. *Front Microbiol* 8:7.
- Vance ME, Kuiken T, Vejerano EP, McGinnis P., Hochella MF, Rejeski D, Hull MS (2015) Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J Nanotechnol* 6:1769-1780.
- Vanderschuren H, Lentz E, Zainuddin I, Gruissem W (2013) Proteomics of model and crop plant species: Status, current limitations and strategic advances for crop improvement. *J Proteomics* 93:5–19.
- 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. *J Plant Physiol* 171:1142–1148.
- Vannini C, Domingo G, Onelli E, Prinsi B, Marsoni M, Espen L, Bracale M (2013) Morphological and proteomic responses of *Eruca sativa* exposed to silver nanoparticles or silver nitrate. *PLoS One* 8:e68752.

- Vega-Baudrit J, Gamboa SM, Rojas ER, Martinez VV (2019) Synthesis and characterization of silver nanoparticles and their application as an antibacterial agent. *Int J Biosen Bioelectron* 5:166-173.
- Vítámvás P, Prášil IT, Kosová K, Planchon S, Renaut J (2012) Analysis of proteome and frost tolerance in chromosome 5A and 5B reciprocal substitution lines between two winter wheats during long-term cold acclimation. *Proteomics* 12:68–85.
- Wahid I, Kumari S, Ahmad R, Hussain SJ, Alamri S, Siddiqui MH, Khan MIR (2020) Silver nanoparticle regulates salt tolerance in wheat through changes in ABA concentration, ion homeostasis, and defense systems. *Biomolecules* 10:1506.
- Walczyk D, Bombelli FB, Monopoli MP, Lynch I, Dawson KA (2010) What the cell “sees” in bionanoscience. *J Am Chem Soc* 132:5761–5768.
- Wang B, Yin JJ, Zhou X, Kurash I, Chai Z, Zhao Y, Feng W (2013a) Physicochemical origin for free radical generation of iron oxide nanoparticles in biomicroenvironment: Catalytic activities mediated by surface chemical states. *J Phys Chem C* 117:383–392.
- Wang G, Jin W, Qasim AM, Gao A, Peng X, Li W, Feng H, Chu PK (2017) Antibacterial effects of titanium embedded with silver nanoparticles based on electron-transfer-induced reactive oxygen species. *Biomaterials* 124:25–34.
- Wang J, Koo Y, Alexander A, Yang Y, Westerhof S, Zheng Q, Schnoor J, Colvin VL, Braam J, Alvarez PJJ (2013b) Phytostimulation of poplars and Arabidopsis exposed to silver nanoparticles and Ag⁺ at sublethal concentrations. *Environ Sci Technol* 47:5442–5449.
- Wang L, Sun J, Lin L, Fu Y, Alenius H, Lindsey K, Chen C (2020a) Silver nanoparticles regulate Arabidopsis root growth by concentration-dependent modification of reactive oxygen species accumulation and cell division. *Ecotoxicol Environ Saf* 190:110072.
- Wang P, Lombi E, Zhao FJ, Kopittke PM (2016) Nanotechnology: a new opportunity in plant sciences. *Trends Plant Sci* 21:699–712.
- Wang X, Sun C, Gao S, Wang L, Shuokui H (2001) Validation of germination rate and root elongation as indicator to assess phytotoxicity with *Cucumis sativus*. *Chemosphere* 44:1711–1721.
- Wang Z, Hu T, Liang R, Wei M (2020b) Application of zero-dimensional nanomaterials in biosensing. *Front Chem* 8:320.
- Weber D, Davies MJ, Grune T (2015) Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions. *Redox Biol* 5:367–380.
- Weydert CJ, Cullen JJ (2010) Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nat Protoc* 5:51–66.
- Wierzbicka MS, Obidzińska J (1998) The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species. *Plant Sci* 137:155–171.

- Wiley BJ, Chen Y, Mcllellan JM, Xiong Y, Li ZY, Ginger D, Xia Y (2007) Synthesis and optical properties of silver nanobars and nanorice. *Nano Lett* 7(4):1032-1036.
- Winter G, Todd CD, Trovato M, Forlani G and Funck D (2015) Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Front Plant Sci* 6:534.
- Wojcieszek J, Jiménez-Lamana J, Ruzik L, Szpunar J, Jarosz M (2020) To-do and not-to-do in model studies of the uptake, fate and metabolism of metal-containing nanoparticles in plants. *Nanomaterials* 10:1480.
- Woodbury W, Spencer AK, Stahman MA (1971) An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal Biochem* 44:301-305.
- Wu CT, Leubner-Metzger G, Meins F, Bradford KJ (2001) Class I beta-1,3-glucanase and chitinase are expressed in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. *Plant Physiol* 126:1299-313.
- Wudick MM, Li X, Valentini V, Geldner N, Chory J, Lin J, Maurel C, Luu DT (2015) Subcellular redistribution of root aquaporins induced by hydrogen peroxide. *Mol Plant* 8:1103-1114.
- Xiong Y, Uys JD, Tew KD, Townsend DM (2011) S-Glutathionylation: From molecular mechanisms to health outcomes. *Antioxid Redox Signal* 15:233-270.
- Xu F, Xu Q, Dong X, et al (2011) Top-down high-resolution electron capture dissociation mass spectrometry for comprehensive characterization of post-translational modifications in Rhesus monkey cardiac troponin I. *Int J Mass Spectrom* 305:95-102.
- Xu R, Song F, Zheng Z (2006) OsBISAMT1, a gene encoding S-adenosyl-L-methionine: salicylic acid carboxyl methyltransferase, is differentially expressed in rice defense responses. *Mol Biol Rep* 33:223-231.
- Xu XHN, Brownlow WJ, Kyriacou SV, Wan Q, Viola JJ (2004) Real-time probing of membrane transport in living microbial cells using single nanoparticle optics and living cell imaging. *Biochemistry* 43:10400-10413.
- Yan A, Chen Z (2019) Impacts of silver nanoparticles on plants: A focus on the phytotoxicity and underlying mechanism. *Int J Mol Sci* 20:23-25.
- Yang J, Cao W, Rui Y (2017) Interactions between nanoparticles and plants: phytotoxicity and defense mechanisms. *J Plant Interact* 12:158-169.
- Yasur J, Rani PU (2013) Environmental effects of nanosilver: impact on castor seed germination, seedling growth, and plant physiology. *Environ Sci Pollut Res Int* 20:8636-8648.
- Yates JR, Ruse CI, Nakorchevsky A (2009) Proteomics by mass spectrometry: Approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng* 11:49-79.

- Yin H, Xu L, Porter NA (2011a) Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chem Rev* 111:5944–5972.
- Yin L, Cheng Y, Espinasse B, Colman BP, Auffman M, Wiesner M, Rose J, Liu J, Bernhardt ES (2011b) More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environ Sci Technol* 45:2360–2367.
- Yin L, Colman BP, McGill BM, Wright JP, Bernhardt ES (2012) Effects of silver nanoparticle exposure on germination and early growth of eleven wetland plants. *PLoS One* 7:e47674.
- Yu W, Xie H (2012) A Review on nanofluids: Preparation, stability mechanisms, and applications. *J Nanomater* 2012:435873.
- Yu Z, Li Q, Wang J, Yu Y, Wang Y, Zhou Q, Li P (2020) Reactive oxygen species-related nanoparticle toxicity in the biomedical field. *Nanoscale Res Lett* 15:115.
- Zafar S, Ashraf M, Niaz M, Zafar S, Ashraf MY, Niaz M, Kausar A, Hussain J (2015) Evaluation of wheat genotypes for salinity tolerance using physiological indices as screening tool. *Pakistan J Bot* 47:397–405.
- Zeng J, Dong Z, Wu H, Tian Z, Zhao Z (2017) Redox regulation of plant stem cell fate. *EMBO J* 36:2844–2855.
- Zhang H, Ge Y (2011) Comprehensive analysis of protein modifications by top-down mass spectrometry. *Circ Cardiovasc Genet* 4:711.
- Zhang W, Liu X, Bao S, Xiao B, Fang T (2016a) Evaluation of nano-specific toxicity of zinc oxide, copper oxide, and silver nanoparticles through toxic ratio. *J Nanoparticle Res* 18:12.
- Zhang W, Xiao B, Fang T (2018) Chemical transformation of silver nanoparticles in aquatic environments: Mechanism, morphology and toxicity. *Chemosphere* 191:324–334.
- Zhang X-F, Liu Z-G, Shen W, Gurunathan S (2016b) Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *Int J Mol Sci* 17:1534.
- Zhao CM, Wang W-X (2012) Size-dependent uptake of silver nanoparticles in *Daphnia magna*. *Environ Sci Technol* 46:11345–11351.
- Zhao H, Lei Y (2020) 3D nanostructures for the next generation of high-performance nanodevices for electrochemical energy conversion and storage. *Adv Energy Mater* 10:225781167.
- Zou X, Li P, Huang Q, Zhang H (2016) The different response mechanisms of *Wolffia globosa*: Light-induced silver nanoparticle toxicity. *Aquat Toxicol* 176:97–105.
- Zuverza-Mena N, Armendariz R, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL (2016) Effects of silver nanoparticles on radish sprouts: root growth reduction and modifications in the nutritional value. *Front Plant Sci* 7:90.

8. ŽIVOTOPIS

Renata Biba rođena je 23. travnja 1990. u Zagrebu, gdje je završila osnovnu i srednju školu. 2009. godine upisala je integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu, gdje je diplomirala 2016. godine s temom „Utjecaj nanočestica srebra na pojavu oksidacijskog stresa i ekspresiju proteina u klijancima duhana (*Nicotiana tabacum*)“, pod mentorstvom prof. dr. sc. Biljane Balen. Od prosinca 2016. godine radi kao asistent na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka PMF-a u Zagrebu, a 2017. godine upisala je doktorski studij Biologije.

Tijekom trajanja studija bila je suradnica na dva znanstvena projekta: *Fitotoksičnost nanosrebra: mehanizmi akcije i interakcije u stanicama duhana* (NanoPhytoTox) prof. dr. sc. Biljane Balen te *Impact of silver nanoparticles on model plants – Focus on AgNP localization and ultrastructural changes of cells and organelles* (NANO-LUCCO) izv. prof. dr. sc. Petre Peharec Štefanić. Koautorica je 6 znanstvenih radova i jednog poglavlja u znanstvenoj knjizi. Znanstveno se usavršavala na nekoliko radionica i ljetnih škola, u Hrvatskoj i inozemstvu, a sudjelovala je i na mnogobrojnim domaćim i međunarodnim znanstvenim skupovima. Dobitnica je stipendije za akademsku mobilnost Sveučilišta u Zagrebu u 2019. godini za sudjelovanje na *55th Congress of the European Societies of Toxicology*, stipendije za sudjelovanje na FEBS 2021 kongresu te nagrade *Young Scientist Award* za sudjelovanje na *6th Croatian Congress of Toxicology*.

Kao asistentica drži praktikume iz kolegija Stanična i molekularna biologija, Biologija stanice, Metode istraživanja proteina i Uvod u proteomiku. Osim toga, neposredni je voditelj jednog diplomskog rada te je vodila studente na stručnoj laboratorijskoj praksi koja je rezultirala Rektorovom nagradom u akademskoj godini 2019/2020. Sudjelovala je u organizaciji Noći biologije i Smotre Sveučilišta u Zagrebu.