

Utjecaj mikroplastike na pojavu oksidacijskog stresa i aktivnost antioksidacijskih enzima u korjenčićima luka (*Allium cepa* L.)

Jakopčić, Mihaela

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:245056>

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

Mihaela Jakopčić

**UTJECAJ MIKROPLASTIKE NA POJAVU OKSIDACIJSKOG
STRESA I AKTIVNOST ANTIOKSIDACIJSKIH ENZIMA U
KORJENČICIMA LUKA (*Allium cepa* L.)**

Diplomski rad

Zagreb, 2024.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Mihaela Jakopčić

**THE EFFECT OF MICROPLASTICS ON OXIDATIVE STRESS
APPEARANCE AND ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES
IN ONION (*Allium cepa* L.) ROOTS**

Master thesis

Zagreb, 2024.

Ovaj rad je izrađen u Laboratoriju za biljnu proteomiku na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Biljane Balen, te komentorstvom dr. sc. Renate Bibe. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra struke znanosti o okolišu.

Ovo istraživanje provedeno je u okviru projekta
Interaktivni učinci mikroplastike i nanosrebra na kopnene i vodene biljke i alge (MINION)
(HRZZ IP-2022-10-3824)



Najprije, želim zahvaliti svojoj mentorici, prof. dr. sc. Biljani Balen na utrošenom vremenu, pomoći i podršci, kao i na svim konstruktivnim savjetima i stručnom vodstvu u svrhu realizacije ovog rada. Vaša predanost i pristup radu velika su motivacija.

Također, veliko hvala i mojoj komentorici, dr.sc. Renati Bibi na pomoći, savjetima i suradnji kako tijekom cijelog procesa eksperimentalnog dijela, tako i tijekom pisanja rada. Uz Vašu podršku rad je bio jednostavniji.

Zahvaljujem i dr. sc. Petri Cvjetko na stručnoj pomoći oko provođenja dijela istraživanja koje je upotpunilo ovaj rad. Zahvaljujem se i svim kolegama i djelatnicima Zavoda za ugodno vrijeme provedeno u laboratoriju.

Posebna zahvala ide mojoj obitelji i prijateljima, na nesebičnoj ljubavi, podršci, strpljenju i vjeri.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

UTJECAJ MIKROPLASTIKE NA POJAVU OKSIDACIJSKOG STRESA I AKTIVNOST ANTIOKSIDACIJSKIH ENZIMA U KORJENČICIMA LUKA (*Allium cepa* L.)

Mihaela Jakopčić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sve učestalija proizvodnja i upotreba različitih plastičnih proizvoda u širokom spektru ljudskih djelatnosti kao i neadekvatno zbrinjavanje dovelo je do nakupljanja plastike u okolišu. Različitim procesima plastika se razgrađuje na sitnije čestice poput mikroplastike (MPs) koje zbog male veličine imaju tendenciju nakupljanja i bioakumulacije u tkivima biljaka, životinja i ljudi. U ovom radu ispitan je utjecaj 0,01, 0,1 i 1 g L⁻¹ MPs od dva različita tipa polimera, polistirena (PS-MPs) i polimetil metakrilata (PMMA-MPs) na pojavu oksidacijskog stresa u korjenčićima luka (*Allium cepa*). Određena je stabilnost čestica, pri čemu je zabilježena manja stabilnost PS-MPs u odnosu na PMMA-MPs. Mjerenjem duljine korjenčića nije zabilježen toksični učinak na rast izuzev tretmana s PS-MPs kod najmanje ispitane koncentracije. Izmjereni sadržaj reaktivnih oblika kisika (ROS) ukazao je na izostanak oksidacijskog stresa, što je potvrđeno mjerenjem oštećenja lipida, proteina i molekule DNA gdje su također izostale statistički značajne promjene u odnosu na kontrolu, uz nešto više vrijednosti tretmana PS-MPs u odnosu na PMMA-MPs. Povećana aktivnost antioksidacijskih enzima superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), askorbat (APX) i pirogalol peroksidaze (PPX) zabilježena je kod svih tretmana, pri čemu je najveća aktivnost zabilježena kod najveće ispitane koncentracije. Rezultati su pokazali da PS-MPs ima jači toksični utjecaj od PMMA-MPs.

Ključne riječi: polistiren, polimetil metakrilat, lipidna peroksidacija, proteinski karbonili, oštećenje DNA

(48 stranica, 11 slika, 2 tablice, 72 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski jezik)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof.dr.sc. Biljana Balen

Komentor: dr. sc. Renata Biba

Ocjenitelji:

prof. dr. sc. Biljana Balen

prof. dr. sc. Jasna Lajtner

izv. prof. dr. sc. Kristina Pikelj

doc. dr. sc. Mladen Maradin

zamjena prof. dr.sc. Blanka Cvetko Tešović

Rad prihvaćen: 04. srpnja 2024.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master thesis

THE EFFECT OF MICROPLASTICS ON OXIDATIVE STRESS APPEARANCE AND ACTIVITY OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN ONION (*Allium cepa* L.) ROOTS

Mihaela Jakopčić

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The increasing production and use of various plastic products in a wide range of human activities, as well as inappropriate disposal has led to the accumulation of plastic in the environment. Plastic decomposes into smaller particles such as microplastics (MPs) through various processes, which tend to accumulate and bioaccumulate in plants, animals and human. In this study, the effects of 0,01, 0,1 i 1 g L⁻¹ MPs from two different types of polymers, polystyrene (PS-MPs) and polymethyl methacrylate (PMMA-MPs), on the occurrence of oxidative stress in onion (*Allium cepa*) roots were examined. The stability of the particles was determined with PS-MPs stability being lower compared to PMMA-MPs. No toxic effect on growth was observed by measurement of root length, except for the treatment with PS-MPs at the lowest tested concentration. The content of reactive oxygen species (ROS) indicated the absence of oxidative stress, which was proven by measuring lipid, protein and DNA damage, which showed no significant changes compared to control, with slightly higher values of PS-MPs treatment compared to PMMA-MPs. Activity of the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate (APX) and pyrogallol peroxidase (PPX) was increased in all treatments, with the highest activity at the highest tested concentration. The results indicate that PS-MPs are more toxic than PMMA-MPs.

Keywords: polystyrene, polymethyl methacrylate, lipid peroxidation, protein carbonyls, DNA damage

(48 pages, 11 figures, 2 tables, 72 references, original in: Croatian language)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. Biljana Balen, PhD

Co-mentor: Renata Biba, PhD

Reviewers:

Prof. Biljana Balen, PhD

Prof. Jasna Lajtner, PhD

Assoc. Prof. Kristina Pikelj, PhD

Asst. Prof. Mladen Maradin, PhD

(substitute) Blanka Cvetko Tešović, PhD

Thesis accepted: 4th of July 2024

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Plastika.....	1
1.1.1. Općenito o mikroplastici.....	1
1.1.2. Utjecaj mikroplastike na biljke	2
1.2. Oksidacijski stres.....	4
1.2.1. Oksidacija lipida.....	5
1.2.2. Oksidacija proteina	6
1.2.3. Oksidacija molekule DNA.....	6
1.2.4. Antioksidacijski sustav	7
1.2.4.1. Superoksid dismutaza.....	8
1.2.4.2. Katalaza	8
1.2.4.3. Peroksidaze	9
1.3. Modelni organizam.....	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	12
3. MATERIJALI I METODE.....	13
3.1. Materijal.....	13
3.1.1. Polistiren i polimetil metakrilat.....	13
3.1.2. Biljni materijal.....	13
3.2. Metode	14
3.2.1. Određivanje stabilnosti metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti	14
3.2.2. Morfometrijsko mjerenje duljine korjenčića.....	14
3.2.3. Ekstrakcija proteina	14
3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina	15
3.2.5. Određivanje količine ROS	15
3.2.6. Određivanje sadržaja malondialdehida.....	16
3.2.7. Određivanje sadržaja proteinskih karbonila.....	16
3.2.8. Komet test	17
3.2.9. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima	18
3.2.9.1. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti superoksid dismutaze.....	18

3.2.9.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze	19
3.2.9.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze	20
3.2.9.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti pirogallol peroksidaze.....	20
3.2.10. Statistička obrada podatka	21
4. REZULTATI	22
4.1. Stabilnost MPs.....	22
4.1.1. Promjena hidrodinamičkog promjera PS-MPs.....	22
4.1.2. Promjena hidrodinamičkog promjera PMMA-MPs	23
4.2. Učinak na rast korjenčića	24
4.3. Učinak na stvaranje ROS	25
4.3.1. Sadržaj O_2^-	25
4.3.2. Sadržaj H_2O_2	26
4.4. Oštećenje lipida	27
4.5. Oštećenje proteina	28
4.6. Oštećenje molekule DNA	29
4.7. Učinak na aktivnost antioksidacijskih enzima	30
4.7.1. Aktivnost enzima SOD	30
4.7.2. Aktivnost enzima CAT	31
4.7.3. Aktivnost enzima APX	32
4.7.4. Aktivnost enzima PPX.....	33
5. RASPRAVA	34
6. ZAKLJUČAK.....	40
7. LITERATURA	41

POPIS KRATICA

ANOVA – analiza varijance

APX – askorbat peroksidaza

AsA – askorbinska kiselina

CAT – katalaza

CBB – *Comassie Brilliant Blue*

DHA – dehidroaskorbinska kiselinu

DHE – dihidroetidij

DLS – dinamičko raspršenje svjetlosti

DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazin

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

GSH – glutation

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

HNE – 4-hidroksi-2-nonenal

MDA – malondialdehid

MDHA – monodehidroaskorbinska kiselina

MPs – mikroplastika

NBT – nitroplavi tetrazolij

NPs - nanoplastika

PMMA – polimetil metakrilat

PPX – pirogalol peroksidaza

PS – polistiren

PUFA – višestruko nezasićena masna kiselina

ROS – reaktivni oblici kisika

SOD – superoksid dismutaza

TBA – tiobarbituratna kiselina

TCA – trikloroetena kiselina

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

1. UVOD

1.1. Plastika

U posljednjih sedamdeset godina proizvodnja plastike kontinuirano raste te je ljudska svakodnevnica postala nezamisliva bez upotrebe ovog materijala. Zahvaljujući nizu pogodnosti počevši od niske cijene izrade, visoke čvrstoće i elastičnosti, dugotrajnosti te mogućnosti dodavanja različitih aditiva tijekom proizvodnje, pronalazi primjenu u širokom spektru industrija. Plastika je sintetski materijal sastavljen od polimernih lanaca na bazi ugljikovodika u kombinaciji s aditivima poput stabilizatora, boja, punila i plastifikatora (Cavaliere i sur. 2020). Prema posljednjim podacima iz 2022. godine, svjetska proizvodnja plastike iznosila je oko 400 milijuna tona. Najveća zastupljenost prevladava u industriji pakiranja, građevinarstvu i zdravstvu (Plastics Europe 2024).

Rastuća proizvodnja plastike predstavlja veliko opterećenje za okoliš zbog nastanka iznimno velike količine plastičnog otpada proizašlog iz neučinkovitih mjera gospodarenja. U razdoblju od 1950. do 2015. godine proizvedeno je 6300 milijuna tona otpada od kojeg je samo 9% reciklirano, dok je čak 80% akumulirano na odlagalištima (Geyer i sur. 2017). Proizvodi jednokratne namjene, koji imaju kratak ciklus upotrebe, povećavaju zadržavanje plastike u okolišu (Nayanathara Thathsarani Pilapitiya i Ratnayake 2024). Iako se plastika svrstava u materijale koji nisu biorazgradivi, djelovanjem različitih procesa dolazi do usitnjavanja većih komada koji ulaze u tlo, vodena tijela i atmosferu. Polietilen (PE), polivinil klorid (PVC), polipropilen (PP), polietilen tereftalat (PET), poliamid (PA), poliester (PES) i polistiren (PS) najčešći su polimeri plastike pronađeni u okolišu (Giorgetti i sur. 2020). Čestice plastike možemo podijeliti prema veličini na mega- (>100 μm), makro- (25 μm – 100 μm), mezo- (5 μm – 25 μm), mikro- (1 μm – 5 μm), submikro- (100 nm – 1 μm) i nanoplastiku (<100 nm) (Thushari i Senevirathna 2020; Caldwell i sur. 2022).

1.1.1. Općenito o mikroplastici

Mikroplastiku (eng. *Microplastics*, MPs), s česticama veličine između 5 mm i 1 μm koje dolaze iz raznih izvora, prema podrijetlu možemo podijeliti na primarnu i sekundarnu. Primarna MPs obuhvaća sve plastične fragmente koji su namjerno proizvedeni u veličini manjoj od 5 mm

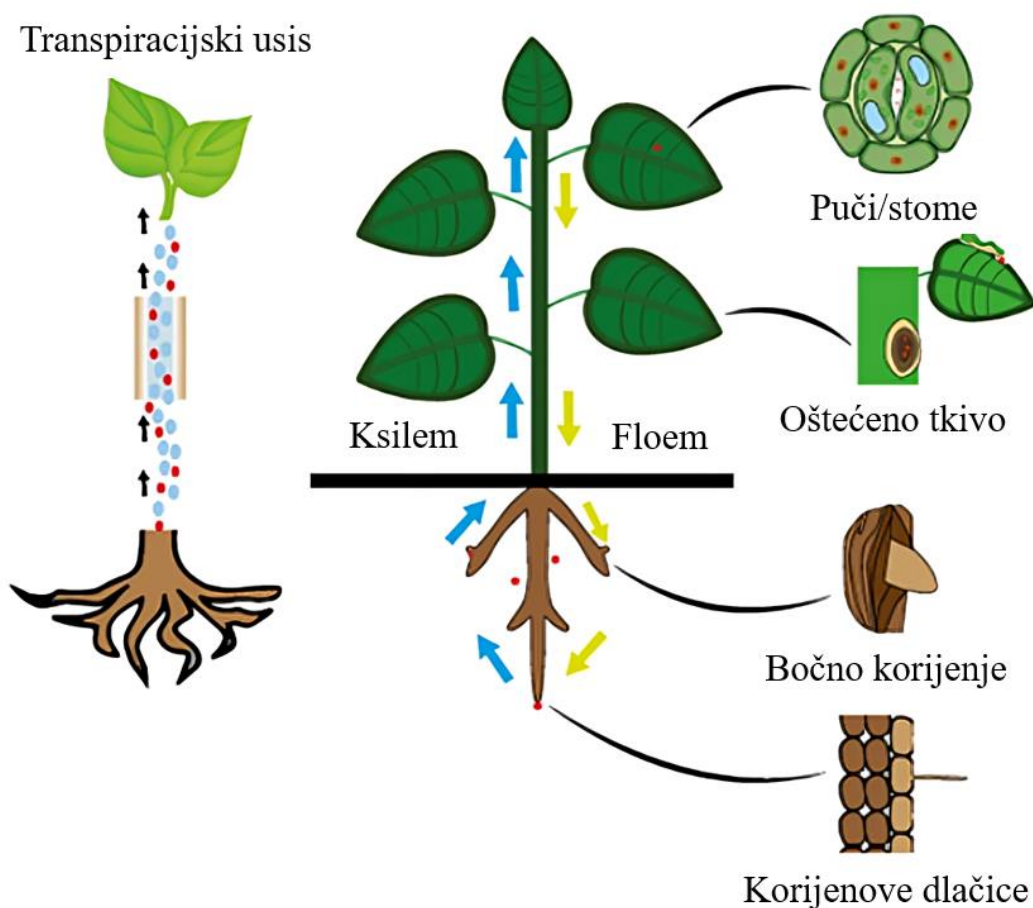
poput mikrokuglica, mikrovlakana i plastičnih granula koje se koriste u farmaceutskoj industriji. Djelovanjem vanjskih procesa, uključujući Sunčevu svjetlost, vjetar i vodu te djelovanjem bioloških, mehaničkih i kemijskih čimbenika dolazi do usitnjavanja većih plastičnih masa čime nastaje sekundarna MPs (Kumari i sur. 2022). Zahvaljujući potencijalnoj mogućnosti prolaska kroz biološke membrane te bioakumulaciji putem prehrambenog lanca, MPs postaje sve veći ekološki, ali i zdravstveni problem. Uz to, visok omjer površine i volumena čini ju pogodnim adsorbensom za razne otrovne kemikalije poput teških metala (Wojnowska-Baryła i sur. 2022; Kadac-Czapska i sur. 2024).

Čestice MPs možemo pronaći u svim sastavnicama okoliša. Dosadašnja ekotoksikološka istraživanja uglavnom su temeljena na morskim i slatkovodnim ekosustavima te njihovom direktnom utjecaju i prijenosu na druge trofičke razine, dok je manje pažnje posvećeno kopnenim ekosustavima (Kumari i sur. 2022). Najznačajniji izvori MPs na kopnu potječu od odlaganja plastičnog otpada, komunalnog mulja i otpadnih voda, plastičnog malčiranja te atmosferskog taloženja (Roy i sur. 2022). Posebno su osjetljiva poljoprivredna zemljišta na kojima se primjenjuju gnojiva dobivena iz kanalizacijskog mulja i navodnjavanje otpadnim vodama (Igalavithana i sur. 2022).

1.1.2. Utjecaj mikroplastike na biljke

Mnoge poljoprivredne kulture i vodene biljke pokazale su se osjetljivima na MPs. Djelovanje na različite biljne vrste ovisi o brojnim čimbenicima poput tipa, oblika i veličine polimera, koncentraciji i mediju izlaganja, vezanim adsorbensima, naboju čestica te samoj vrsti biljke i njenim karakteristikama (razvojni stadij, veličina, tip supstrata) (Roy i sur. 2022). Promjene u svojstvima tla uzrokovane nakupljanjem MPs mogu neizravno utjecati na biljke mijenjanjem gustoće, poroznosti i pH vrijednosti tla te promjenom mikrobne aktivnosti i prijenosa hranjivih tvari (Roy i sur. 2022; Yang i Gao 2022). Izravni utjecaji uključuju promjene u morfologiji i/ili fiziologiji biljaka, te nakon izlaganja MPs građenoj od određenog tipa polimera možemo uočiti različite odgovore koji variraju od neutralne do značajne fitotoksičnosti, iako ponekad čak mogu imati i pozitivan učinak, poput stimulacije rasta korjenčića i izdanaka (Colzi i sur. 2022).

Primarni načini na koje MPs djeluje toksično na rast biljaka obuhvaćaju negativan učinak na proces fotosinteze, izazivanje oksidacijskog stresa te citogenetičke promjene (Dong i sur. 2022). Korjenčić i lisna površina predstavljaju dva glavna puta za nakupljanje MPs u biljkama (Slika 1.). Iako MPs za razliku od nanoplastike (eng. *Nanoplastics*, NPs), zbog svoje veličine ne može proći kroz fizičke prepreke netaknutog biljnog tkiva, lako se apsorbira na površini korjenčića i sjemenki. Također, ne može prodrijeti kroz staničnu stjenku, no može začepiti pore i veze između stanica (Roy i sur. 2022).



Slika 1. Put unosa i translokacije MPs/NPs (crvene točke) u biljke kroz korjenčić. Preuzeto i prilagođeno iz Roy i sur. (2022).

1.2. Oksidacijski stres

Biljke su kao i svi živi organizmi izloženi djelovanju niza biotičkih i abiotičkih čimbenika, poput suše, visokog saliniteta, temperaturnih ekstrema, onečišćenja zraka, teških metala, UV-zračenja, manjka nutrijenata, raznih patogena i parazita (Arora i sur. 2002; Demidchik 2014; Rajput i sur. 2021). Djelovanjem navedenih čimbenika dolazi do pojave oksidacijskog stresa, odnosno složene fizikalno-kemijske reakcije prekomjerne proizvodnje i nakupljanja reaktivnih oblika kisika (eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS) (Demidchik 2014). ROS obuhvaća skupinu molekula koje nastaju iz molekularnog kisika (O_2) redoks reakcijama ili elektronskom ekscitacijom, a dijele se na slobodne radikale i neradikalne derivate. Slobodni radikali su radikali s jednim ili više nesparenih elektrona, a obuhvaćaju superoksidni ($O_2^{\cdot-}$), hidroksilni ($\cdot OH$), peroksilni ($ROO\cdot$) i alkoksilni ($RO\cdot$) radikal, dok neradikalni (dvoelektronski) obuhvaćaju vodikov peroksid (H_2O_2) i singletni molekularni kisik (1O_2) (Sies i Jones 2020).

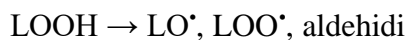
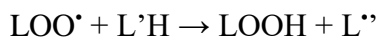
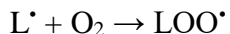
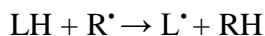
Rastuća razina O_2 od početka proizvodnje prije 2,7 milijardi godina usmjerila je razvoj biljaka omogućujući korištenje ROS u svrhu signalizacije u stanici (Demidchik 2014). Kad je prisutna normalna razina, ROS tada obavljaju ulogu glasnika u raznim reakcijama kao što su zatvaranje puči/stoma i gravitropizam. Održavanje fiziološke razine ROS-a ključno je za sve aerobne organizme jer stanje neravnoteže uzrokuje oštećenja biomolekula i staničnih struktura te dugoročno i samu smrt stanice. Aktivacija ROS ovisna je o energiji i zahtjeva otpuštanje elektrona iz transportnog sustava elektrona mnogih staničnih organela (kloroplasta, mitohondrija, endoplazmatskog retikuluma, staničnih membrana, stanične stijenke). U prisustvu svjetlosti glavni proizvođači ROS-a su kloroplasti i peroksisomi, dok su mitohondriji glavni proizvođači u uvjetima bez svjetlosti (Xie i sur. 2019).

U biljnim stanicama, antioksidacijski obrambeni sustav i akumulacija ROS održavaju ravnotežu u stabilnom stanju. Održavanje optimalne razine ROS-a u stanici omogućuje pravilne redoks biološke reakcije i regulaciju brojnih procesa važnih za biljke, kao što su rast i razvoj (Hasanuzzaman i sur. 2020).

1.2.1. Oksidacija lipida

Lančana oksidacija organskih molekula slobodnim radikalima poznata je kao autooksidacija. Kada se ovaj proces odvija u lipidima ili drugim biološki značajnim molekulama, poput proteina, ugljikohidrata i nukleinskih kiselina, nazivamo ga peroksidacijom (Yin i sur. 2011). Lipidi su najosjetljivija vrsta biomolekula podložna napadu slobodnih radikala. Stanične membrane sadrže velike količine višestruko nezasićenih masnih kiselina (eng. *PolyUnsaturated Fatty Acids*, PUFA) te kolesterol, koji su posebno podložni peroksidaciji zbog velikog broja dvostrukih veza te posljedično lakog uklanjanja atoma vodika (Yin i sur. 2011; Anjum i sur. 2014).

Lipidna peroksidacija obuhvaća niz uzastopnih lančanih reakcija podijeljenih u faze inicijacije, propagacije i terminacije. U fazi inicijacije dolazi do stvaranja alkilnih radikala odvajanjem vodikova atoma od metilenske skupine unutar molekule lipida. Zatim u fazi propagacije dolazi do nastajanja slobodnih radikala. Zbog stabilizacije nesporenog elektrona ugljika molekularnom pregradnjom dvostruke veze formira se konjugirani dien koji potom reagira s O₂ te nastaje peroksilni radikal (LOO·). U posljednjoj fazi dolazi do stvaranja neradikalnih produkata tako što LOO· reagiraju s molekulama masnih kiselina te eliminacijom atoma vodika (H·) nastaju lipidni hidroperoksidi (LOOH) (Anjum i sur. 2014). LOOH se u prisutnosti željeza disocira na LO· i LOO· što uzrokuje ponovnu inicijalizaciju peroksidacije (Štefan i sur. 2007). Nastajanje lipidnih peroksida možemo izraziti sljedećim reakcijama (Tuteja i sur. 2009):



Reakciju peroksidacije mogu pokrenuti radikali ·OH, ROO· i RO·, a koji će produkt nastati ovisi o jačini same oksidacije te o vrsti lipida i oksidansa. Krajnji produkt su ketoni, aldehidi i ugljikovodici, primjerice malondialdehid (MDA), 4-hidroksi-2-nonenal (HNE), 2-hidroksi-2-heksenal (HHE) i akrolein. Njihov sadržaj može se izmjeriti tehnikom spektrofotometrije, a najčešće se za procjenu razine oštećenja lipida mjeri sadržaj MDA korištenjem tiobarbiturne

kiseline (eng. *ThioBarbituric Acid*, TBA) pri čemu nastaju tiobarbiturne reaktivne supstance (eng. *ThioBarbituric Acid Reactive Substances*, TBARS) (Anjum i sur. 2014; Demidchik 2014).

Produkti nastali peroksidacijom koriste se kao pokazatelj oksidacijskog oštećenja stanica budući da dovode do funkcionalnog i strukturnog oštećenja staničnih membrana kroz promjenu permeabilnosti, fluidnosti i integriteta (Tuteja i sur. 2009).

1.2.2. Oksidacija proteina

Oksidacija proteina obuhvaća kovalentnu modifikaciju aminokiselina djelovanjem ROS molekula i sekundarnih produkata peroksidacije biomolekula, kao što su primjerice MDA ili HNE. Većina oksidacijskih oštećenja je ireverzibilna te se odvija na bočnim lancima aminokiselina (Demidchik 2014). Sve aminokiseline podložne su oksidaciji, no posebno su osjetljive one koji sadrže sumpor (cistein i metionin), amine (arginin, lizin i histidin) te one s velikim bočnim lancima (triptofan, leucin i fenilalanin) (Xiong i Guo 2020). Posljedice izazvane oksidacijom mogu biti gubitak specifične metaboličke, strukturne, transportne i regulatorne aktivnosti proteina (Demidchik 2014). Među prvim i najčešćim metaboličkim reakcijama biljaka su proteinska disfunkcija i inhibicija sinteze proteina (Anjum i sur. 2014).

Postoje različite modifikacije proteina – nitracija tirozinskih ostataka, glikoksidacija adukata, karboksilacija aminokiselinskih ostataka, glutationilacija, nastanak disulfidnih poprečnih veza i dr. Karbonilacija je jedna od najčešćih modifikacija tijekom koje dolazi do umetanja karbonilne skupine izravnom oksidacijom bočnih lanaca aminokiselina, cijepanjem peptidne veze ili adukcijom neproteinskih karbonilnih jedinica pri čemu nastaju reaktivni aldehidi i ketoni. Karbonili se smatraju pouzdanim markerom za procjenu stupnja oksidacijske modifikacije proteina obzirom da se karbonilacija događa u gotovo svim oksidiranim proteinima. Sastav karbonila određuje se spektrofotometrijski, reakcijom karbonilnih skupina s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) pri čemu nastaje hidrazon (Anjum i sur. 2014; Xiong i Guo 2020).

1.2.3. Oksidacija molekule DNA

Glavna oštećenja molekula DNA uzrokovana su ROS molekulama, a mogu uzrokovati oštećenja jezgrine, kloroplastne i mitohondrijske DNA. Radikali $\cdot\text{OH}$ su primarni uzročnici

oštećenja nukleinskih kiselina pri čemu su svi dijelovi nukleotida podložni oksidaciji. Oštećenja baza nukleotida obično uključuje dodavanje $\cdot\text{OH}$ na dvostruke veze, dok je oštećenje šećera najčešće potaknuto oduzimanjem vodikovih iona (H^+) iz deoksiriboze (Sharma i sur. 2012). Navedena oštećenja mogu uzrokovati modifikaciju i gubitak baza, lomljenje lanaca, nastanak unakrsnih veza između primjerice DNA i proteina te nastanak pirimidinskih dimera. Nakon nastanka oštećenja, putovi prijenosa signala brzo se aktiviraju, što utječe na bitne procese poput održavanja staničnog ciklusa i transkripcije gena (Tuteja i sur. 2009).

Komet test ili tehnika jednostanične gel elektroforeze (eng. *Single Cell Gel Electrophoresis assay*, SCGE) učinkovita je metoda mjerenja oštećenja molekule DNA na principu migracije denaturirane DNA kroz električno polje agaroznog matriksa. Molekula DNA koja sadrži lomove migrira u smjeru anode čija putanja nalikuje kometu. Rezultati se mogu analizirati mjerenjem nekoliko parametara kao što su duljina repa i postotak DNA u repu (Tuteja i sur. 2009).

1.2.4. Antioksidacijski sustav

Sposobnost biljaka za uklanjanjem toksičnih učinaka ROS-a jedan je od najvažnijih segmenata obrane biljaka od stresa. Antioksidacijski sustav služi za održavanja homeostaze biljnog organizma kao prva linija obrane protiv negativnog djelovanja slobodnih radikala (Rajput i sur. 2021).

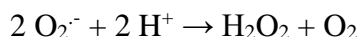
Antioksidansi su molekule koje inhibiraju oksidaciju drugih molekula različitim mehanizmima poput neutralizacije nastalih slobodnih radikala ili njihovim uklanjanjem te sprječavanjem njihova nastanka (Štefan i sur. 2007).

Zbog sesilnog načina života biljke su evolucijski razvile niz prilagodbi koje uključuje endogeni obrambeni mehanizam kroz aktivaciju antioksidacijskog sustava sastavljenog od kombinacije enzimskih i neenzimskih antioksidansa. Enzimski sustav antioksidansa sudjeluje u sprječavanju Haber-Weissove reakcije i askorbat-glutationskog ciklusa (AsA-GSH) kako bi se smanjila količina H_2O_2 i iskoristio redukcijski potencijal nikotinamid adenin dinukleotid fosfata (NADPH). Sastoji se od superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), peroksidaza (POX), polifenol oksidaza (PPO), glutation reduktaza (GR) i drugih enzima. Neenzimske antioksidanse

čine askorbat (AsA), glutation (GSH), tokoferoli, karotenoidi, flavonoidi, alkaloidi i neproteinske aminokiseline (Hasanuzzaman i sur. 2020; Rajput i sur. 2021). Ova dva sustava međusobno su povezana zahvaljujući enzimu APX koji služi kao ključna molekula u očuvanju redoks ravnoteže (Pandey i sur. 2017).

1.2.4.1. Superoksid dismutaza

SOD je prvi enzim u procesu detoksikacije čija je uloga uklanjanje O_2^- te nastanak H_2O_2 kao važne signalne molekule u daljnjim reakcijama (Del Rio i sur. 2018). Građen je od podjedinica koje se sastoje od dvije domene sastavljene od α -spirala ili kombinacije α -spirala i β -listova (Stephenie i sur. 2020). Enzim katalizira reakciju disproporcioniranja O_2^- pri čemu nastaje O_2 i H_2O_2 prema sljedećoj reakciji:

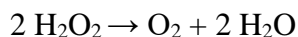


Nastali H_2O_2 se u daljnjim reakcijama s enzimima CAT, APX, GPX ili katalizacijom u ciklusu AsA-GSH razlaže na H_2O (Hasanuzzaman i sur. 2020).

SOD pripada metaloenzimima koji se, ovisno o tome koji metal vežu na aktivno mjesto, dijele na izoforme SOD bakar/cink (Cu/Zn-SOD), SOD mangan (Mn-SOD) i SOD željezo (Fe-SOD). Različite izoforme nalaze se u različitim staničnim dijelovima: Cu/Zn-SOD nalazi se u kloroplastima, citoplazmi, peroksisomima i apoplastu, Mn-SOD nalazi se u mitohondrijima i peroksisomima dok je Fe-SOD prisutan u kloroplastima, peroksisomima i mitohondrijima (Del Rio i sur. 2018). Metal se veže između dvije domene, a varijacije različitih izoformi služe za maksimalnu katalitičku aktivnost enzima (Stephenie i sur. 2020).

1.2.4.2. Katalaza

CAT je tetramerni enzim s molekulom hema u svakoj od četiri podjedinice. Enzim katalizira dismutaciju H_2O_2 u peroksisomima na O_2 i H_2O prema sljedećoj jednadžbi (El-Beltagi i Mohamed 2013):

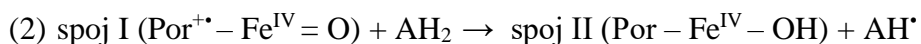
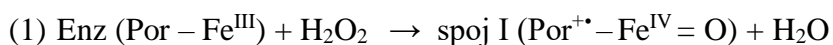


CAT se pretežno nalazi u peroksisomima listova, kotiledona i korjenčića, no dokazana je prisutnost i u mitohondrijima nekih biljaka. Aktivan je pri relativno visokim koncentracijama H₂O₂ (Anjum i sur. 2016). Postoje tri različite forme CAT enzima podijeljene po klasama. Klasa I služi za uklanjanje H₂O₂ tijekom fotorespiracije i zastupljena je u fotosintetskim tkivima, klasa II uključena je procese starenja i lignifikacije te je zastupljena u vaskularnim tkivima dok je klasa III uključena u razgradnju masnih kiselina tijekom glioksilatnog ciklusa te je prisutna u sjemenkama i reproduktivnim tkivima (Sharma i sur. 2012).

1.2.4.3. Peroksidaze

POX su enzimi skupine oksidoreduktaza koji kataliziraju reakciju H₂O₂ te sudjeluju u uklanjanju fenolnih i nefenolnih spojeva (De Oliveira i sur. 2021). Jedina su skupina biljnih enzima koji imaju mogućnost uklanjanja H₂O₂ u izvanstaničnom prostoru. Uz navedenu funkciju, POX su uključene u procese rasta i razvoja tijekom životnog ciklusa biljaka, umrežavanja i metabolizma stanične stijenke, metabolizma auksina, lignifikaciju i suberizaciju, rast i sazrijevanje plodova te obranu od patogena. Sintetiziraju se u Golgijevu aparatu kao i u endoplazmatskom retikulumu, a zastupljeni su u izvanstaničnom prostoru i vakuoli (Pandey i sur. 2017; Rajput i sur. 2021).

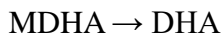
Biljne POX se dijele u tri klase. Peroksidaze klase I sastoje se od eukariotskih i prokariotskih peroksidaza koje uključuju APX, peroksidaze klase II važne su u biorazgradnji lignina kao što su mangan peroksidaza (MnP) i lignin peroksidaza (LiP), dok peroksidaze klase III uključuju pirogalol peroksidazu (PPX) (Pandey i sur. 2017). Oksidacija spojeva koju ovi enzimi kataliziraju odvija se u tri koraka prema sljedećim reakcijama:



U prvom koraku dolazi do nastanka polustabilnog međuprodukta (spoj I) koji u drugom koraku reagira sa supstratom, donorom elektrona, dajući slobodni radikal i spoj II. Novonastali

spoj II u sljedećem koraku reagira s jednim elektronom iz druge molekule supstrata stvarajući drugi radikal i vraćajući enzim u početno stanje (Yuzugullu Karakus i sur. 2017).

APX je hem peroksidaza klase I koja sudjeluju u detoksikaciji H_2O_2 koristeći AsA kao specifični donor elektrona. Enzim APX je nestabilan u odsutnosti AsA te brzo gubi aktivnost kad koncentracija padne ispod razine od $20 \mu\text{M}$. APX ima veći afinitet za H_2O_2 od CAT te uklanja i njegove vrlo male količine (Anjum i sur. 2016). Reakciju kataliziranu ovim enzimom možemo prikazati na sljedeći način:



Tijekom reakcije nastaje monodehidroaskorbinska kiselina (MDHA) koja je nestabilna te se spontano pretvara u dehidroaskorbinsku kiselinu (DHA) (Rajput i sur. 2021). Postoji nekoliko različitih izoformi APX enzima ovisno o tome gdje se nalaze u stanici: citosolne izoforme (cAPX), mitohondrijske izoforme (mitAPX), peroksisomalne i glioksisomalne izoforme (mAPX) te kloroplastne izoforme (chAPX) (Hasanuzzaman i sur. 2020).

PPX je peroksidaza klase III, koju čine glikoproteini molekulske mase između 28 i 60 kDa (Yuzugullu Karakus i sur. 2017). Pirogalol služi kao specifični donor elektrona pri detoksikaciji H_2O_2 prema sljedećoj jednadžbi:



Tijekom reakcije nastaje narančasti produkt purporogalin (Maehly i Chance 1954).

1.3. Modelni organizam

Istraživanje sam provodila na korjenčićima luka (*Allium cepa* L.), koji pripada porodici Amaryllidaceae. Ova vrsta danas je široko rasprostranjena, a poznata je po brojnim nutritivnim i ljekovitim svojstvima. Originalno potječe iz središnje Azije. Dvogodišnja je zeljasta biljka koja posjeduje vlaknaste, plitke i čupave korjenčiće te podzemnu stabljiku lukovicu na koju se nastavlja vanjski dio stabljike. Lukovice se sastoje od mesnatih listova (ljusaka) čiji unutarnji dijelovi razvitkom postaju sve mesnatiji, a vanjski postaju sve ljuskaviji gubeći vlažnost.

Lukovice su najčešće zaobljenog oblika u kombinaciji crveno-smeđe, bijele i žute boje (Pareek i sur. 2017).

Vrsta *A. cepa* je čest modelni organizam zbog relativno jednostavnog uzgoja, niske cijene, brzog rasta i mogućnosti usporedbe s drugim vrstama. Vrstu *A. cepa* u biološkim istraživanjima prvi je upotrijebio znanstvenik Levan (1938) proučavajući promjene u mitozu primjenom kolhicina. Naime, ova vrsta je pogodna za istraživanje citotoksičnosti i genotoksičnosti zbog malog broja ($2n = 16$) dugačkih kromosoma koji se lako mogu analizirati svjetlosnim mikroskopom. Također, u korjenčićima *A. cepa* pri neposrednom kontaktu s ispitivanom tvari mogu se zabilježiti učinci čak i pri niskim koncentracijama navedene tvari te je stoga razvijen „Allium test“, jednostavan biotest pogodan za određivanje ukupne toksičnosti, citotoksičnosti i genotoksičnosti u laboratorijskim uvjetima (Bonciu i sur. 2018; Iqbal i sur. 2019) te je do sada korišten za ispitivanje citotoksičnih i genotoksičnih učinaka npr. nanočestica srebra (Yekeen i sur. 2017), kanalizacijskog mulja (Corrêa Martins i sur. 2016), otpadnih voda (Dutta i sur. 2018) i teških metala (Liu i Kottke 2003).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Zbog sve veće prisutnosti i zadržavanja MPs u kopnenom okolišu važno je istražiti potencijalan utjecaj ovih čestica na poljoprivredne kulture. Svrha istraživanja bila je proširiti saznanja o utjecaju dva različita tipa MPs na korjenčiće *A. cepa*, a ciljevi su bili:

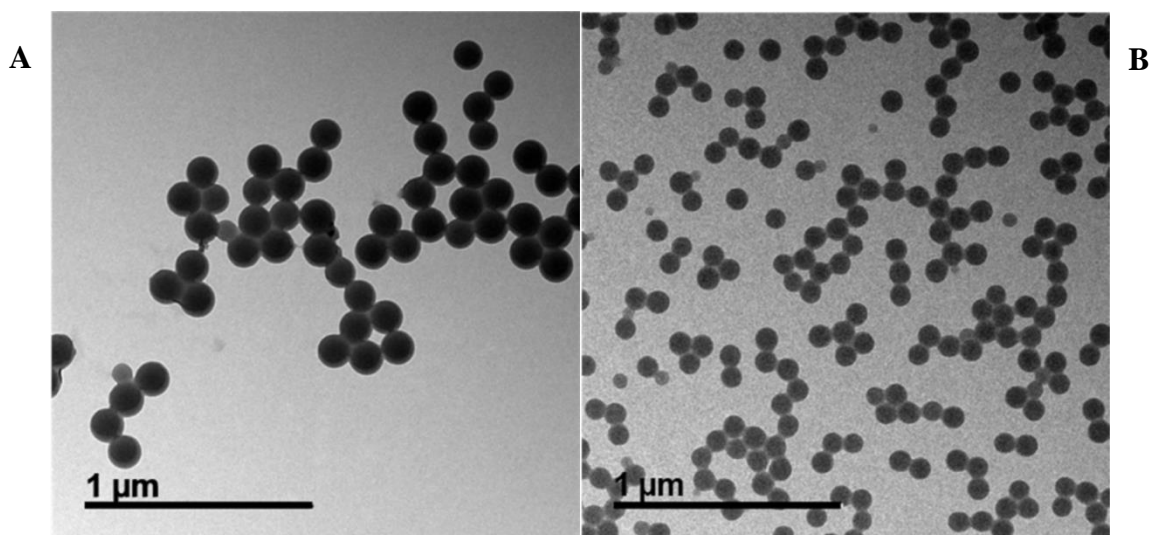
1. Ispitati stabilnosti dva tipa MPs, polistirena (PS-MPs) i polimetil metakrilata (PMMA-MPs) pri različitim koncentracijama.
2. Istražiti uzrokuju li ispitivane koncentracije PS-MPs i PMMA-MPs u korjenčićima *A. cepa* pojavu oksidacijskog stresa i oštećenje biološki važnih molekula praćenjem morfometrijske promjene duljine korjenčića, određivanjem sadržaja ROS, karbonila i MDA, Komet testom te mjerenjem aktivnosti antioksidacijskih enzima.
3. Usporediti utjecaj ispitivanih koncentracija PS-MPs i PMMA-MPs za sve prethodno navedene parametre.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Polistiren i polimetil metakrilat

Čestice MPs polistirena (PS-MPs), srednjeg promjera od 0,147 μm , i polimetil metakrilata (PMMA-MPs), srednjeg promjera od 0,105 μm , kupljene su kao 5% (w/v) vodene suspenzije (Microplastics GmbH, Njemačka).



Slika 2. Matične suspenzije čestica A) PS-MPs i B) PMMA-MPs u ultračistoj vodi snimljene transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM). Preuzeto i prilagođeno iz Biba i sur. (2023).

3.1.2. Biljni materijal

Lukovice *A. cepa*, kupljene u Sjemenarna d.o.o. (Hrvatska), koje sam prethodno očistila od viška ljuske, postavila sam na staklene epruvete koje su u cijelosti bile ispunjene ultračistom vodom (Millipore, $18.2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$) i ostavila 48 h u komori za biljke, u tami na temperaturi od 25 $^{\circ}\text{C}$, kako bi izrasli korjenčići. Lukovice koje su imale korjenčiće podjednake dužine isprala sam ultračistom vodom te postavila u staklene epruvete u kojima su se nalazile prethodno pripremljene otopine PS-MPs i PMMA-MPs koncentracija 0,01, 0,1 i 1 g L^{-1} . Otopine navedenih koncentracija priredila sam dodatkom ultračiste vode u matične otopine PS i PMMA. Za svaku od pripremljenih koncentracija otopina postavila sam po 6 replika, kao i za kontrolnu skupinu

(epruvete ispunjene ultračistom vodom). Tretman je trajao 72 h pod istim uvjetima za svaku od koncentracija i kontrolu, nakon čega su uzorci korjenčića bili isprani ultračistom vodom i podvrgnuti daljnjim analizama.

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje stabilnosti metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti

Veličinu čestica svih ispitivanih koncentracija u suspenziji ultračiste vode odredila sam metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (eng. *Dynamic Light Scattering*, DLS) (Hassan i sur. 2015). Za potrebe mjerenja prvo sam u Falcon epruveti pripremila 15 mL otopine za svaku pojedinu koncentraciju. Neposredno prije mjerenja, 2,5 mL uzorka prebacila sam u kivete koje sam postavila u uređaj ZetaPlus Zeta Potential Analyzer (Brookhaven Instruments, SAD) na očitavanje. Hidrodinamički promjer (d_h) PS-MPs i PMMS-MPs dobila sam očitavajući pik raspodjele maksimalne vrijednosti veličine čestica po volumenu kroz tri mjerenja tijekom tri dana.

3.2.2. Morfometrijsko mjerenje duljine korjenčića

Uz pomoć ravnala izmjerila sam duljinu korjenčića svih tretiranih i kontrolnih lukovica prije i nakon izlaganja pojedinim tretmanima. Nakon mjerenja izračunala sam prosječne vrijednosti promjene duljine korjenčića za svaki tretman.

3.2.3. Ekstrakcija proteina

Za ekstrakciju proteina koristila sam 0,1 g izvaganog svježeg tkiva korjenčića po 6 replika za kontrolu i svaki tretman, koje sam potom homogenirala uz pomoć tučka u tarioniku uz dodatak 10 mg polivinilpirolidona (PVP). Cijeli postupak radila sam na ledu kako bi proteini zadržali svoju aktivnost te kako bi se spriječila njihova denaturacija. Nakon toga dodala sam 1,5 mL 100 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 te nastavila homogenizaciju tkiva. Dobivene homogenate prenijela sam u tubice te stavila na centrifugiranje u centrifugu (Eppendorf 5804R, Njemačka) 15 minuta pri 4 °C i 14000 rpm. Dobivene supernatante sam potom prebacila u čiste tubice i ponovno centrifugirala 60 minuta pri 4 °C i 14000 rpm. Dobivene supernatante potom sam prebacila u čiste tubice i pohranila ih na -20 °C kako bi uzorci (proteinski ekstrakti) bili spremni

za daljnje analize određivanja količine ROS, sadržaja proteinskih karbonila i aktivnosti antioksidacijskih enzima.

3.2.4. Spektrofotometrijsko određivanje koncentracije proteina

Ukupnu koncentraciju proteina odredila sam spektrofotometrijskim mjerenjem metodom po Bradfordu (1976). Navedena metoda uključuje vezanje boje CBB (eng. *Coomassie Brilliant Blue*) G-250 na proteine. Za mjerenje sam napravila reakcijsku smjesu od 980 μL Bradford radne otopine i 20 μL uzorka. Prvo sam pripremila Bradford matičnu otopinu (350 mg CBB G-250, 30 mL 96% etanola i 200 mL 88% fosforne kiseline) iz koje sam pripremila Bradford radnu otopinu koja se sastoji od 30 mL Bradford matične otopine, 15 mL 96% etanola, 30 mL fosforne kiseline i 425 mL destilirane vode. Za slijepu probu, potrebnu za nuliranje spektrofotometra, sam koristila 20 μL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7,0. Nakon kratkog miješanja tubica s reakcijskim smjesama na vorteksu, sadržaj sam prebacila u kivete i uzorke analizirala na spektrofotometru Specord 50 PLUS (Analytik Jena, Njemačka). Mjerenjem apsorbancije poznatih koncentracija (0,2 – 2,0 mg mL⁻¹) otopine albumina goveđeg seruma (eng. *Bovine Serum Albumin*, BSA) pripremljenih u 0,1 M kalij-fosfatnom puferu, pH 7,0 pri valnoj duljini od 595 nm dobila sam baždarni pravac. Pri navedenoj valnoj duljini dolazi do maksimalne apsorpcije plavog obojenja zbog reakcije proteina s Bradfordovom otopinom. Iz izmjerenih apsorbancija i ranije spomenutog baždarnog pravca izračunala sam koncentraciju proteina izraženu u mg mL⁻¹ otopine.

3.2.5. Određivanje količine ROS

Za određivanje količine ROS-a koristila sam dvije fluorescentne boje: dihidroetidij (DHE) za određivanje sadržaja O₂⁻, pri čemu nastaje produkt 2-hidroksietidij, te 2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat (H₂DCF-DA) za određivanje sadržaja H₂O₂, pri čemu nastaje produkt 2',7'-diklorodihidrofluorescein. Na mikrotitarsku pločicu s 96 jažica stavila sam 50 μL proteinskih ekstrakata (poglavlje 3.2.3.) i 50 μL 20 μM otopine DHE ili H₂DCF-DA te reakcijske smjese promiješala na miješalici 10 s. Pomoću čitača mikrotitarskih pločica (GloMax, Promega, SAD) očitala sam fluorescenciju nastalih produkata, gdje je za boju DHE valna duljina ekscitacije postavljena na 525 nm, a emisije između 580 nm i 640 nm, dok je za boju H₂DCF-DA valna duljina ekscitacije bila 490 nm, a emisije između 510 nm i 570 nm. Rezultati su prikazani kao postotak od kontrole, a prikazuju srednju vrijednost 6 replika \pm standardna pogreška.

3.2.6. Određivanje sadržaja malondialdehida

Za određivanje razine lipidne peroksidacije koristila sam metodu po Heathu i Packeru (1968), pri čemu sam spektrofotometrijski mjerila količinu MDA, produkta peroksidacije. Najprije je bilo potrebno ekstrahirati lipide. Za pripremu ekstrakcijske smjese koristila sam 0,3% (w/v) TBA u 10% (w/v) trikloroacetne kiseline (eng. *Trichloroacetic Acid*, TCA). U ohlađeni tarionik sam stavila 0,1 g svježeg tkiva za svaku od 6 replika kontrole i svih tretmana te dodala 1,3 mL reakcijske smjese kako bi homogenirala tkivo pomoću tučka. Tako pripremljene ekstrakte prenijela sam u tubice za daljnju obradu. Ekstrakte sam potom zagrijavala 30 minuta pri 95° C u termomikseru u otvorenim tubicama budući da navedena smjesa vrije. Nakon toga ekstrakte sam ohladila u posudi s ledom te stavila na centrifugiranje 15 minuta pri 4 °C i 14000 rpm. Dobivene supernatante pretila sam u kivete te spektrofotometrijski izmjerila apsorbanciju na valnim duljinama od 532 nm i 600 nm. Korekciju za nespecifično zamućenje odredila sam oduzimajući vrijednosti očitane pri 600 nm od vrijednosti očitane pri 532 nm. Za slijepe probe koristila sam 200 µL kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 i 1,3 mL navedene reakcijske smjese. Iz koncentracije MDA izrazila sam razinu lipidne peroksidacije prema sljedećoj jednadžbi:

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

gdje je:

A₅₃₂ – apsorbancija izmjerena pri valnoj duljini od 532 nm

A₆₀₀ – apsorbancija izmjerena pri valnoj duljini od 600 nm

m – masa tkiva (g)

ε – molarni apsorpcijski koeficijent (155 mM⁻¹ cm⁻¹)

l – duljina puta (1 cm)

Rezultate sam izrazila u nmol g⁻¹ svježe tvari, a prikazuju srednju vrijednost 6 replika ± standardna pogreška.

3.2.7. Određivanje sadržaja proteinskih karbonila

Za određivanje proteinskih karbonila koristila sam metodu po Levinu i sur. (1994) koja se temelji na reakciji karbonilnih skupina s DNPH. Pripremila sam dva seta tubica. U jedan set

stavila sam 200 μL proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.2.3.) i 300 μL 10 mM otopine DNPH u 2 M HCl, dok sam u drugi set tubica, koje su služile kao kontrola, stavila 200 μL proteinskog ekstrakta i 300 μL 2 M HCl. Sadržaje oba seta promiješala sam na vorteksu te potom ostavila u tami tijekom jednog sata na sobnoj temperaturi uz povremeno protresanje sadržaja. Nakon toga u svaku pojedinu tubicu dodala sam 500 μL 10% (w/v) TCA za precipitaciju proteina te ostavila 5 minuta na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tubice sam zatim centrifugirala 10 minuta pri $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ i 14000 rpm. Odlila sam dobivene supernatante, a nastali talog isprala tri puta s 500 μL otopine etanol/etilacetata omjera 1:1 kako bih uklonila nevezani reagens. Zatim sam talog otapala u 1 mL 6 M uree u 20 mM kalij-fosfatnom puferu pri pH 2,4 miješajući na vorteksu zbog boljeg otapanja. Spektrofotometrijski sam izmjerila apsorbanciju na valnoj duljini od 370 nm. Za svaki uzorak s DNPH koristila sam slijepu probu bez DNPH. Koncentraciju karbonila izrazila sam prema sljedećoj jednadžbi:

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

gdje je:

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

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

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

l – duljina optičkog puta (1 cm)

Rezultate sam prikazala u $\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteina dobivene iz srednje vrijednost 6 replika \pm standardna pogreška.

3.2.8. Komet test

Za mjerenje oštećenja molekule DNA koristila sam Komet test (Gichner i sur. 2004). Jezgre iz tkiva korjenčića mehanički sam izolirala uz pomoć žileta u 50 μL otopine 400 mM 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol-HCl (Tris-HCl) pH 7,5 na ledu. Dobivenu suspenziju sam pomiješala s 250 μL 1% (w/v) agaroze niskog tališta (eng. *Low Melting Point*, LMP), pripremljene u puferiranoj otopini fosfatnih soli (eng. *Phosphate Buffer Saline*, PBS) sastavljenoj od 10 mM Na_2HPO_4 , 1,7 mM KH_2PO_4 , 130 mM NaCl i 2,7 mM KCl, pH 7,4 prethodno zagrijanoj na $42\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tako pripremljene smjese stavila sam na predmetna stakalca koja sam prethodno pripremila nanoseći sloj 1% (w/v) agaroze normalnog tališta (eng. *Normal Melting*

Point, NMP). Tako pripremljene predmetnice sam potom prekrila pokrovnicom i ostavila na ledu da se agarozna stvrđne. Hladni pufer za elektroforezu koji se sastoji od 1 mM Na₂EDTA i 300 mM NaOH, pH 13 stavila sam u posudu za horizontalnu elektroforezu te u nju stavila stakalca s kojih sam prethodno uklonila pokrovnice. Stakalca sam ostavila u puferskoj otopini 10 minuta zbog denaturacije DNA te nakon toga pokrenula elektroforezu u vremenskom trajanju od 20 minuta pri 26 V i 300 mA. Nakon završene elektroforeze stakalca sam isprala s neutralizacijskim puferom (400 mM Tris-HCl pH 7,5) te ostavila na zraku da se osuše. Potom sam molekule DNA na stakalcima obojila sa 70 µL boje za nukleinske kiseline GelStar™ (Lonza, SAD). Na svakom stakalcu analizirala sam 150 jezgara primjenom fluorescencijskog mikroskopa (Olympus BX51, Japan) s ekscitacijskim filterom BP 520/09 nm i graničnim filterom od 610 nm. Program za obradu slika ImageJ (National Institutes of Health, SAD) uz dodatak alata OpenComet v1.3.1 (Gyori i sur. 2014) koristila sam za određivanje postotka DNA u repu (%tDNA) koji predstavlja primarnu mjeru za oštećenje DNA. Rezultate sam prikazala kao srednju vrijednost ukupno 150 jezgara ± standardna pogreška.

3.2.9. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima

3.2.9.1. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Za određivanje aktivnosti SOD koristila sam metodu koju su razvili Beauchamp i Fridovich (1971). Prvo sam pripremila 800 µL reakcijske smjese koja je sadržavala: 13 mM metionina, 75 µM nitroplavog tetrazolija (eng. *NitroBlue Tetrazolium*, NBT), 0,1 M etilendiamintetraoctene kiseline (eng. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*, EDTA) u koju sam dodala 190 µL kalij-fosfatnog pufera pH 7,8 i 10 µL otopine 2 mM riboflavina. Kako bi se mogla odrediti aktivnost enzima SOD morala sam pripremiti nekoliko otopina čiju sam apsorbanciju mjerila pri valnoj duljini od 560 nm. Za mjerenje maksimuma neinhibirane kontrole koristila sam pripremljenu reakcijsku smjesu gdje sam uz neposredan dodatak riboflavina promiješala sadržaj u kivetu i stavila u transiluminator na 8 minuta pri 15 W. Pod utjecajem svjetlosti dolazi do redukcije riboflavina, pri čemu nastaje O₂⁻ koji reducira NBT u formazan, plavo obojeni, netopivi produkt. Za slijepu probu koristila sam istu reakcijsku smjesu bez izlaganja svjetlosti transiluminatora stoga navedena smjesa nije sadržavala O₂⁻. Mjerenje proteinskih uzoraka provela sam tako što sam reakcijskoj smjesi smanjila količinu kalij-fosfatnog pufera dodajući proporcionalnu istu količinu uzorka kontrole (poglavlje 3.2.3.) koji je trebao dati 50% vrijednosti

apsorpcijskog maksimuma neinhibirane kontrole. Navedeni postupak ponovila sam za svaki ispitivani uzorak. Isti taj postupak napravila sam i sa SOD standardima (razrjeđenja otopina poznatih koncentracija od 0,025 do 1 U μL^{-1}). Nakon što sam odradila sva spektrofotometrijska mjerenja, linearizirala sam rezultate podijelivši vrijednost maksimalne apsorbancije neinhibirane kontrole s vrijednosti apsorbancije za uzorke i SOD standarde. Izradila sam baždarnu krivulju na temelju SOD standarda pomoću koje sam izračunala aktivnosti SOD za svaki mjereni uzorak. Rezultate sam prikazala kao količinu nastalog produkta u $\mu\text{mol}_{\text{produkta}} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{proteina}}$ odnosno U $\text{mg}^{-1}_{\text{proteina}}$ dobivene iz srednje vrijednosti 6 replika \pm standardna pogreška.

3.2.9.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze

Za određivanje aktivnosti CAT koristila sam metodu koju je razvio Aebi (1984). Prvo sam pripremila reakcijsku smjesu koja se sastojala od 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 i 51 μL H_2O_2 . Za mjerenje aktivnosti u uzorcima pomiješala sam 970 μL reakcijske smjese i 30 μL proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.2.3.). Za slijepu probu sam koristila 970 μL navedene reakcijske smjese u koju sam dodala 30 μL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7,0. Spektrofotometrijski sam izmjerila promjenu apsorbancije na valnoj duljini od 240 nm, svakih 10 s tijekom 1 minute, koja nastaje zbog utroška H_2O_2 . Aktivnost enzima CAT izračunala sam prema jednadžbi:

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A (\text{s.v.}) \times 6 \times V(\text{r.s.}) \times \text{F.R.}}{V(\text{uz}) \times \epsilon \times l \times c} [\mu\text{mol}_{\text{H}_2\text{O}_2} \text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}]$$

gdje je:

ΔA (s.v.) – srednja vrijednost promjene apsorbancije pri valnoj duljini od 240 nm u 10 sekundi

6 – faktor korekcije za ΔA (s.v.) za izražavanje rezultata u minuti

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

F.R. – faktor razrjeđenja uzorka (1)

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

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

l – duljina optičkog puta (1 cm)

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

Rezultate sam prikazala kao količinu utrošenog H₂O₂ u μmol min⁻¹ po mg proteina dobivene iz srednje vrijednost 6 replika ± standardna pogreška.

3.2.9.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze

Za određivanje aktivnosti APX prema metodi Nakana i Asade (1981) pripremila sam sljedeće otopine: 10 mM EDTA, 50 mM kalij-fosfatni pufer pH 7,0, 12 mM H₂O₂, 10 mM askorbinsku kiselinu i pufer 1 pripremljen od 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 i 500 μL 10 mM EDTA. Za mjerenje aktivnosti enzima APX napravila sam smjesu koja se sastojala od 800 μL pufera 1, 180 μL proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.2.3.), 10 μL 10 mM askorbinske kiseline i 10 μL 12 mM H₂O₂. Za slijepu probu sam umjesto 180 μL ekstrakta dodala 180 μL 0,1 kalij-fosfatnog pufera pH 7,0. Navedene smjese i slijepu probe stavila sam u kvarcne kivete te izmjerila apsorbanciju na valnoj duljini od 290 nm. Mjerenje se temelji na padu apsorbancije zbog oksidacije askorbinske kiseline stoga su mjerenja provedena svakih 15 sekundi tijekom 1 minute. Aktivnost enzima APX izračunala sam prema jednadžbi:

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

gdje je:

ΔA (s.v.) – srednja vrijednost promjene apsorbancije pri valnoj duljini od 290 nm u 15 sekundi

4 – faktor korekcije za ΔA(s.v.) za izražavanje rezultata u minuti

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

F.R. – faktor razrjeđenja uzorka (1)

V(uz) – volumen uzorka (0,18 mL)

ε – molarni apsorpcijski koeficijent (2,8 mM⁻¹ cm⁻¹)

l – duljina optičkog puta (1 cm)

c – koncentracija proteina (mg mL⁻¹)

Rezultate sam izrazila kao količinu utrošenog askorbata u μmol min⁻¹ po mg proteina, a prikazuju srednju vrijednost 6 replika ± standardna pogreška.

3.2.9.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti pirogalol peroksidaze

Za određivanje aktivnosti PPX primijenila sam metodu prema Nakano i Asada (1981) gdje sam prvo pripremila reakcijsku smjesu koja se sastojala od 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog

pufera pri pH 7,0 u koji sam otopila 0,126 g pirogalola te neposredno prije korištenja dodala još 5,5 μL H_2O_2 . Zbog osjetljivosti na svjetlost reakcijsku smjesu pohranila sam u tamnu bocu. Za mjerenje aktivnosti u uzorcima pomiješala sam 980 μL reakcijske smjese i 20 μL proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.2.3.). Za slijepu probu sam koristila 980 μL navedene reakcijske smjese u koju sam dodala 20 μL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7,0. Spektrofotometrijski sam izmjerila apsorbanciju na valnoj duljini od 430 nm, svakih 15 sekundi tijekom 2 minute. Aktivnost enzima PPX izračunala sam prema jednadžbi:

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

gdje je:

ΔA (s.v.) – srednja vrijednost promjene apsorbancije pri valnoj duljini od 430 nm u 15 sekundi

4 – faktor korekcije za ΔA (s.v.) za izražavanje rezultata u minuti

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

F.R. – faktor razrjeđenja uzorka (1)

V (uz) – volumen uzorka (0,02 mL)

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

l – duljina optičkog puta (1 cm)

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

Rezultate sam prikazala kao količinu nastalog produkta u $\mu\text{mol min}^{-1}$ po mg proteina, dobivene iz srednje vrijednost 6 replika \pm standardna pogreška.

3.2.10. Statistička obrada podatka

Za obradu podataka koristila sam računalni program Statistica 12.0 (Stas Soft Inc., SAD) primijenivši jednosmjernu analizu varijance (eng. *Analysis Of Variance* – ANOVA) i post-hoc Duncan test. Za određivanje značajne razlike između vrijednosti istih koncentracija različitih tipova MPs koristila sam t-test. Podatke sam prikazala kao srednje vrijednosti 6 replika \pm standardna pogreška, a razlike između rezultata smatrala sam statistički značajnim pri $p \leq 0,05$.

4. REZULTATI

4.1. Stabilnost MPs

4.1.1. Promjena hidrodinamičkog promjera PS-MPs

Pri najmanjoj koncentraciji PS-MPs došlo je do statistički značajnog povećanja vrijednosti d_H nakon svih izmjerenih vremenskih točaka (24, 48 i 72 h), s tim da je nakon 24 h došlo do najvećeg povećanja u odnosu na početno vrijeme (0 min). Kod koncentracije od 0,1 g L⁻¹ došlo je do statistički značajnog povećanja vrijednosti 24 h od početnog vremena (0 min), dok je nakon 48 i 72 h došlo do statistički značajnog smanjenja vrijednosti u odnosu na početno vrijeme, pri čemu je vrijednost nakon 72 h bila manje nego nakon 48 h. Pri najvećoj koncentraciji zabilježeno je postupno smanjenje vrijednosti pri svakoj sljedećoj vremenskoj točki u odnosu na 0 min, no bez statistički značajne razlike svake pojedine vremenske točke (24, 48 i 72 h) (Tablica 1).

Tablica 1. Vremenska promjena vrijednosti hidrodinamičkog promjera (d_H) MPs nakon izlaganja koncentracijama od 0,01, 0,1 i 1 g L⁻¹ PS-MPs u suspenziji ultračiste vode. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 10 replika \pm standardna pogreška. Različita slova označavaju statistički značajne razlike istih koncentracija kroz različite vremenske odrednice mjerenja ($p \leq 0,5$, jednosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test).

Vrijeme	Koncentracija PS-MPs (g L ⁻¹)		
	0,01	0,1	1
0 min	141,1 \pm 23,8 ^b	144,7 \pm 1,6 ^b	142,4 \pm 1,3 ^a
24 h	160,7 \pm 1,7 ^a	152,0 \pm 1,6 ^a	139,3 \pm 0,5 ^{ab}
48 h	157,7 \pm 1,5 ^a	136,1 \pm 2,3 ^c	136,9 \pm 1,4 ^a
72 h	159,3 \pm 2,2 ^a	131,9 \pm 1,6 ^d	131,7 \pm 1,6 ^{ab}

4.1.2. Promjena hidrodinamičkog promjera PMMA-MPs

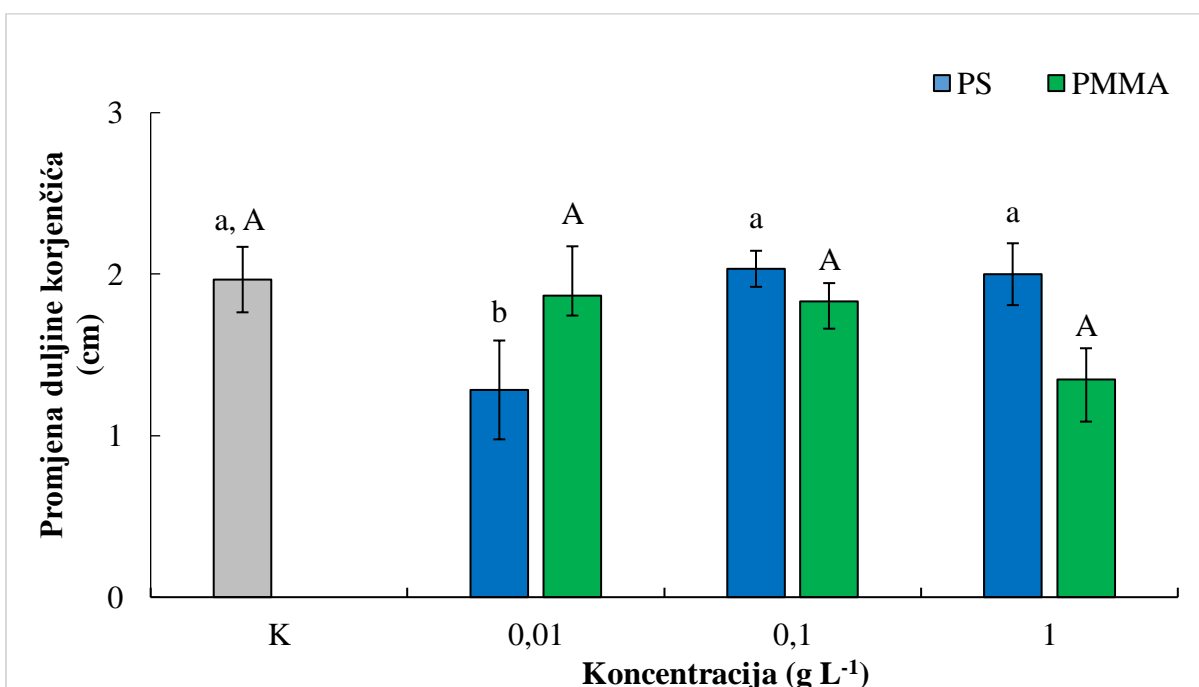
Pri najmanjoj koncentraciji PMMA-MPs nakon 48 h došlo je do statistički značajnog povećanja vrijednosti d_H u odnosu na početno vrijeme (0 min). Suprotno tome, nakon 72 h od početnog vremena zabilježeno je statistički značajno smanjenje vrijednosti d_H . Kod koncentracija od 0,1 i 1 g L⁻¹ došlo je do smanjenja vrijednosti d_H s obzirom na vrijednost 0 min, a statistički značajno smanjenje uočeno je kod koncentracija 0,1 g L⁻¹ nakon 24 i 48 h te kod koncentracije 1 g L⁻¹ nakon svih izmjerenih vremenskih točaka (Tablica 2).

Tablica 2. Vremenska promjena vrijednosti hidrodinamičkog promjera (d_H) MPs nakon izlaganja koncentracijama od 0,01, 0,1 i 1 g L⁻¹ PMMA-MPs u suspenziji ultračiste vode. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 10 replika \pm standardna pogreška. Različita slova označavaju statistički značajne razlike istih koncentracija kroz različite vremenske točke mjerenja ($p \leq 0,5$, jednosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test).

Vrijeme	Koncentracija PMMA-MPs (g L ⁻¹)		
	0,01	0,1	1
0 min	111,0 \pm 1,4 ^b	114,0 \pm 0,8 ^a	112,0 \pm 0,7 ^a
24 h	111,0 \pm 1,5 ^b	110,0 \pm 0,9 ^b	97,5 \pm 0,8 ^c
48 h	117,2 \pm 0,7 ^a	105,2 \pm 1,3 ^c	99,0 \pm 0,8 ^c
72 h	101,3 \pm 2,3 ^c	113,9 \pm 1,3 ^a	103,2 \pm 1,0 ^b

4.2. Učinak na rast korjenčića

Većina ispitanih tretmana s MPs nije pokazala značajan učinak na rast korjenčića *A. cepa*. Pri koncentraciji od 0,01 g L⁻¹ PS-MPs došlo je do statistički značajnog smanjenja duljine korjenčića, dok su više koncentracije (0,1 i 1 g L⁻¹) inducirale rast korjenčića u odnosu na kontrolnu skupinu, ali ne statistički značajno. Nakon izlaganja korjenčića česticama PMMA-MPs nije došlo do statistički značajne promjene u rastu u odnosu na kontrolu, iako su sve tri ispitane koncentracije rezultirale smanjenjem duljine korjenčića. Statistički značajna razlika u duljini korjenčića između različitih tretmana istih koncentracija nije zabilježena (Slika 2.).

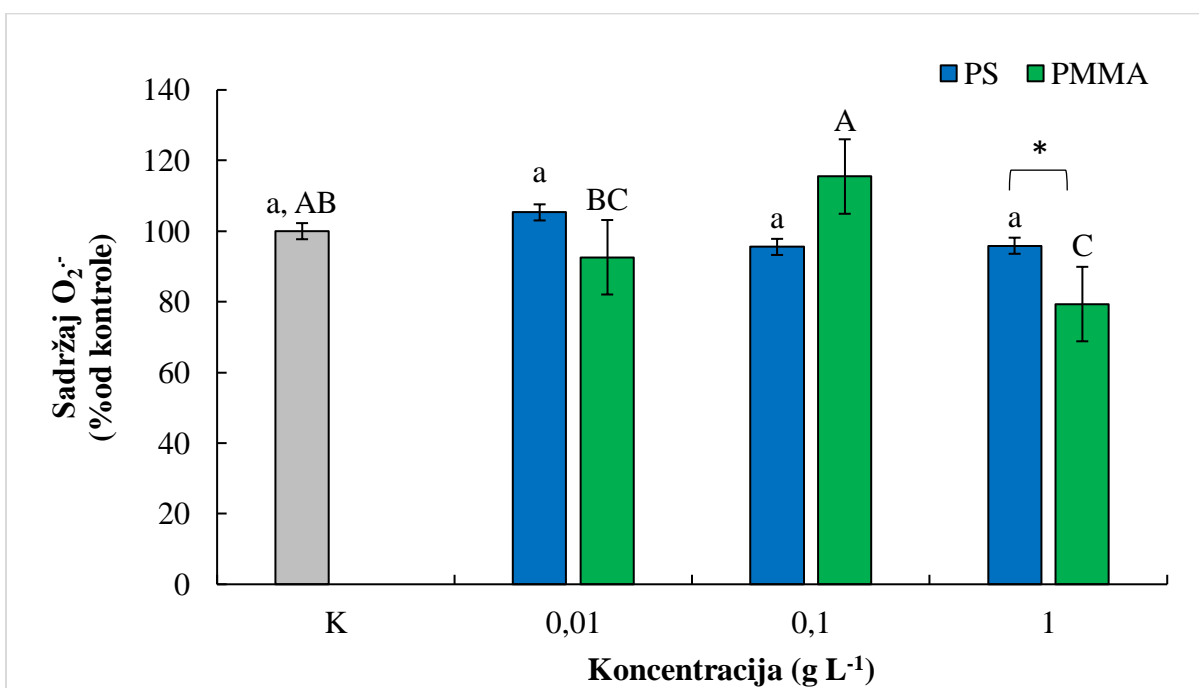


Slika 2. Promjena duljine korjenčića *A. cepa* izmjerena nakon 72 h u kontroli (K) i nakon izlaganja koncentracijama otopina od 0,01, 0,1 i 1 g L⁻¹ PS-MPs (PS) i PMMA-MPs (PMMA). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima označavaju značajne razlike ($p \leq 0,5$, jednosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test). Mala slova označavaju razlike između različitih koncentracija PS-MPs i K, dok velika slova označavaju razlike između različitih koncentracija PMMA-MPs i K.

4.3. Učinak na stvaranje ROS

4.3.1. Sadržaj $O_2^{\cdot-}$

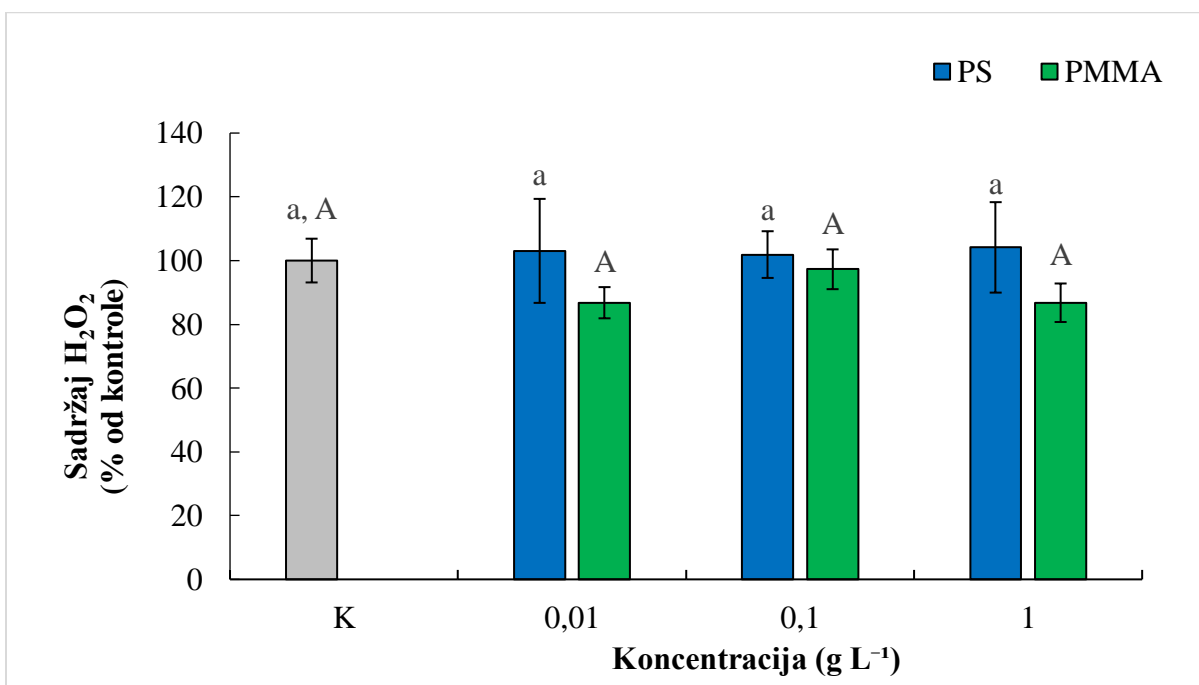
Većina ispitanih tretmana nije pokazala značajan učinak na stvaranje $O_2^{\cdot-}$ u korjenčićima *A. cepa*. Smanjenje sadržaja $O_2^{\cdot-}$ u odnosu na kontrolu zabilježeno je pri koncentracijama PS-MPs od 0,1 i 1 g L⁻¹, iako nije bilo statistički značajno. Kod tretmana s PMMA-MPs, smanjenje sadržaja $O_2^{\cdot-}$ zabilježeno je pri najmanjoj (0,01 g L⁻¹) i najvećoj koncentraciji (1 g L⁻¹), iako je statistički značajno u odnosu na kontrolu bilo samo pri najvećoj koncentraciji. Zanimljivo je da su tretmani s 0,01 g L⁻¹ PS-MPs i 0,1 g L⁻¹ PMMA-MPs izazvali povećanje stvaranja $O_2^{\cdot-}$ s obzirom na kontrolu, iako ne statistički značajno. Usporedba vrijednosti između istih koncentracija različitih tretmana pokazala je značajno povećanje sadržaja $O_2^{\cdot-}$ pri najvećoj koncentraciji nakon tretmana s PS-MPs u odnosu na tretman s PMMA-MPs (Slika 3.).



Slika 3. Sadržaj $O_2^{\cdot-}$ u korjenčićima *A. cepa* izmjerena nakon 72 h u kontroli (K) i nakon izlaganja koncentracijama otopina od 0,01, 0,1 i 1 g L⁻¹ PS-MPs (PS) i PMMA-MPs (PMMA). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika \pm standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima označavaju značajne razlike ($p \leq 0,5$, jednosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test). Mala slova označavaju razlike između različitih koncentracija PS-MPs i K, dok velika slova označavaju razlike između različitih koncentracija PMMA-MPs i K. Statistički značajne razlike između različitih tretmana iste koncentracije (t-test) označene su zvjezdicom (*).

4.3.2. Sadržaj H₂O₂

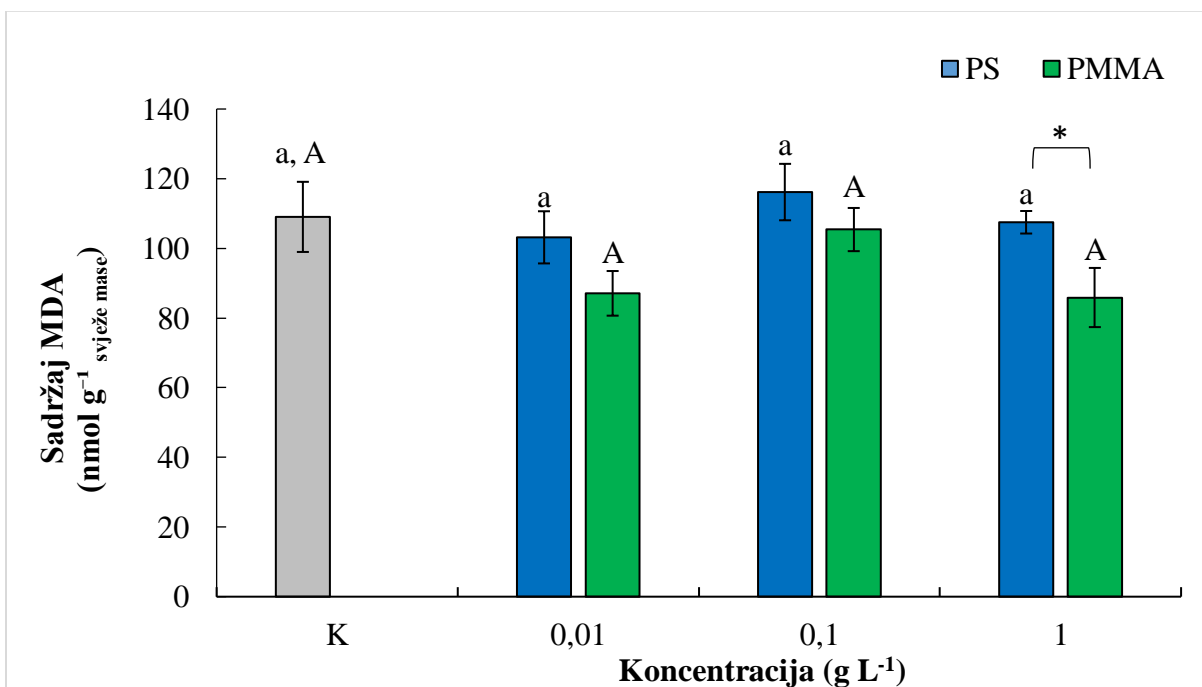
Sve koncentracije PS-MPs pokazale su povećanje sadržaja H₂O₂, dok su svi tretmani s PMMA-MPs rezultirali smanjenjem vrijednosti u usporedbi s kontrolom, ali ni jedan od ispitanih tretmana nije pokazao statistički značajnu razliku u sadržaju H₂O₂ u odnosu na kontrolu. Značajna razlika u sadržaju H₂O₂ između istih koncentracija različitih tretmana nije zabilježena (Slika 4.).



Slika 4. Sadržaj H₂O₂ u korjenčićima *A. cepa* izmjerena nakon 72 h u kontroli (K) i nakon izlaganja koncentracijama otopina od 0,01, 0,1 i 1 g L⁻¹ PS-MPs (PS) i PMMA-MPs (PMMA). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima označavaju značajne razlike ($p \leq 0,5$, jednosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test). Mala slova označavaju razlike između različitih koncentracija PS-MPs i K, dok velika slova označavaju razlike između različitih koncentracija PMMA-MPs i K.

4.4. Oštećenje lipida

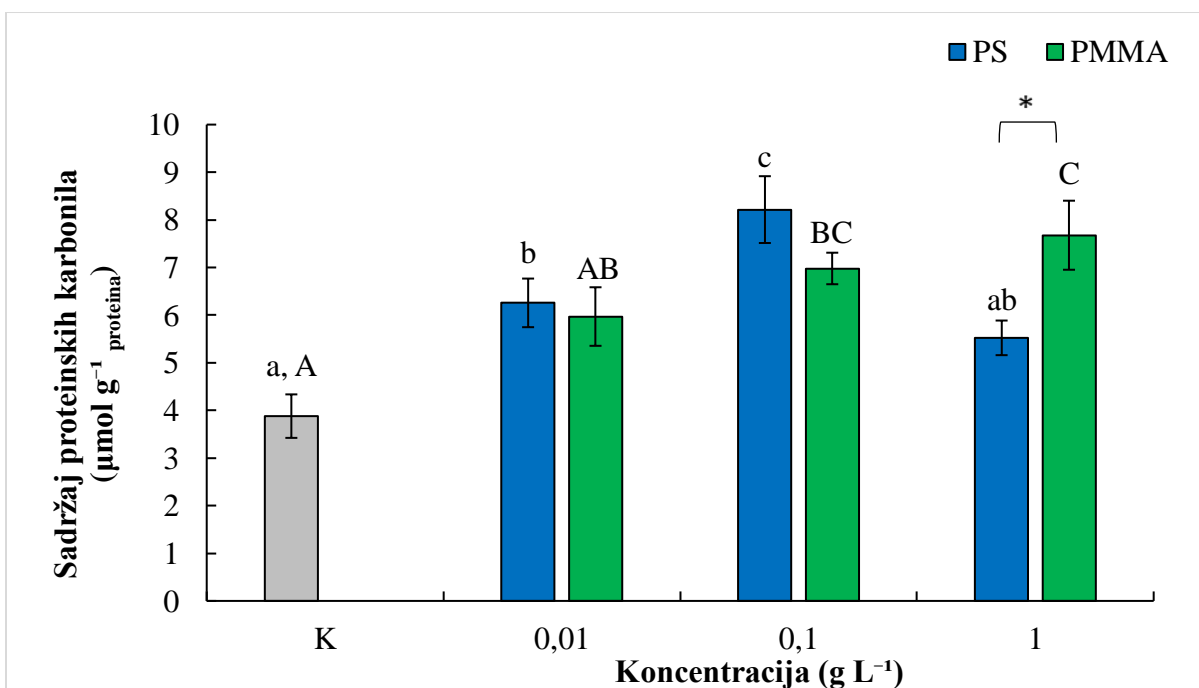
Niti jedan od ispitanih tretmana nije rezultirao značajnim učinkom na lipidnu peroksidaciju u korjenčićima *A. cepa*. Kod tretmana s PS-MPs, povećani sadržaj MDA zabilježen je samo pri srednjoj koncentraciji ($0,1 \text{ g L}^{-1}$), iako vrijednosti nisu bile statistički značajno povećane u usporedbi s kontrolom. Svi tretmani s PMMA-MPs rezultirali su blagim smanjenjem lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu, ali ne statistički značajno. Usporedbom vrijednosti između istih koncentracija različitih tretmana, uočeno je da je pri najvećoj ispitanoj koncentraciji (1 g L^{-1}) pri tretmanu s PS-MPs izmjeren značajno veći sadržaj MDA u odnosu na tretman s PMMA-MPs (Slika 5.).



Slika 5. Sadržaj MDA u korjenčićima *A. cepa* izmjerena nakon 72 h u kontroli (K) i nakon izlaganja koncentracijama otopina od $0,01$, $0,1$ i 1 g L^{-1} PS-MPs (PS) i PMMA-MPs (PMMA). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika \pm standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima označavaju značajne razlike ($p \leq 0,5$, jednosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test). Mala slova označavaju razlike između različitih koncentracija PS-MPs i K, dok velika slova označavaju razlike između različitih koncentracija PMMA-MPs i K. Statistički značajne razlike između različitih tretmana iste koncentracije (t-test) označene su zvjezdicom (*).

4.5. Oštećenje proteina

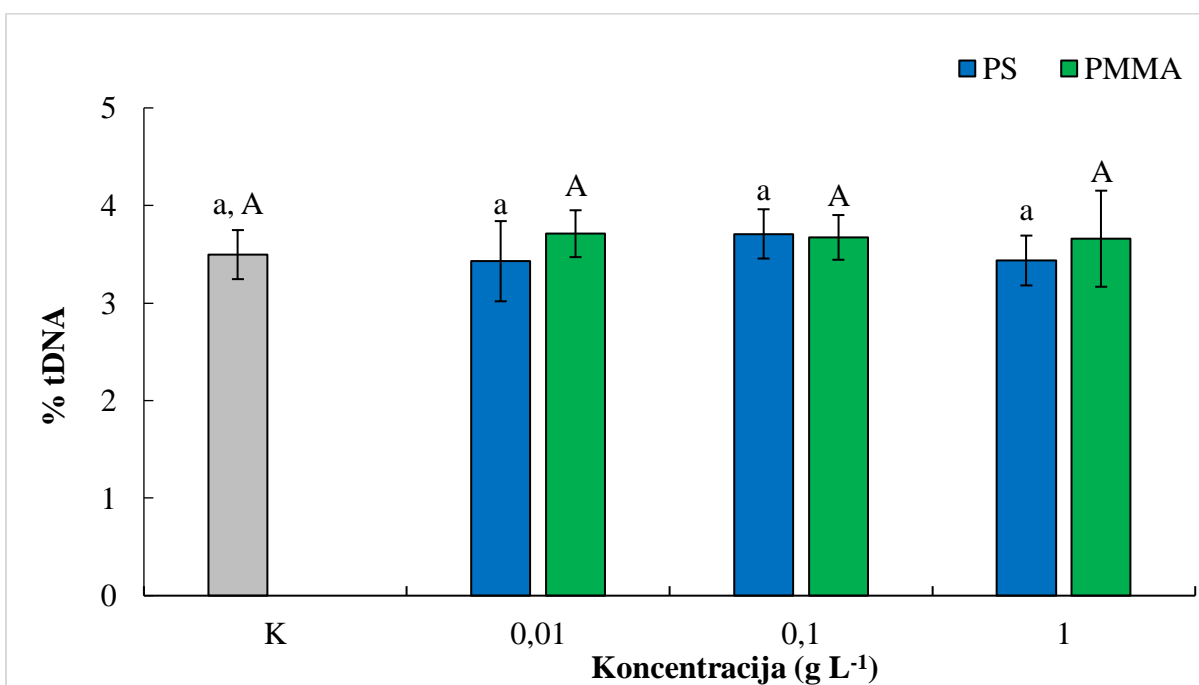
Izlaganje korjenčića *A. cepa* MPs izazvalo je porast sadržaja proteinskih karbonila u odnosu na kontrolu u svim tretmanima. Kod tretmana s PS-MPs, statistički značajno povećanje zabilježeno je za koncentracije od 0,01 i 0,1 g L⁻¹ PS-MPs, dok pri najvećoj koncentraciji dolazi do pada vrijednosti gotovo jednake kontrolnim. Kod tretmana s PMMA-MPs dolazi do postupnog povećanja sadržaja proteinskih karbonila porastom koncentracije tretmana od 0,01 do 1 g L⁻¹, pri čemu su statistički značajne vrijednosti u odnosu na kontrolu izmjerene pri dvije veće koncentracije (0,1 i 1 g L⁻¹). Usporedba različitih tretmana istih koncentracija pokazala je da je pri najvećoj ispitanoj koncentraciji u tretmanu s PS-MPs izmjeren značajno manji sadržaj proteinskih karbonila u odnosu na tretman s PMMA-MPs (Slika 6.).



Slika 6. Sadržaj proteinskih karbonila u korjenčićima *A. cepa* izmjerena nakon 72 h u kontroli (K) i nakon izlaganja koncentracijama otopina od 0,01, 0,1 i 1 g L⁻¹ PS-MPs (PS) i PMMA-MPs (PMMA). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima označavaju značajne razlike ($p \leq 0,5$, jednosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test). Mala slova označavaju razlike između različitih koncentracija PS-MPs i K, dok velika slova označavaju razlike između različitih koncentracija PMMA-MPs i K. Statistički značajne razlike između različitih tretmana iste koncentracije (t-test) označene su zvjezdicom (*).

4.6. Oštećenje molekule DNA

Niti jedan od ispitanih tretmana nije rezultirao značajnim učinkom na % tDNA u korjenčićima *A. cepa* te su nakon svih tretmana zabilježene približno jednake vrijednosti. Kod tretmana s PS-MPs, blago povećanje % tDNA zabilježeno je samo pri srednjoj koncentraciji (0,1 g L⁻¹), no vrijednosti nisu bile statistički značajno povećane u usporedbi s kontrolom. Kod tretmana s PMMA-MPs, svi tretmani rezultirali su blagim povećanjem % tDNA u odnosu na kontrolu, ali ne statistički značajno. Značajna razlika u % tDNA između istih koncentracija različitih tretmana nije zabilježena (Slika 7.).

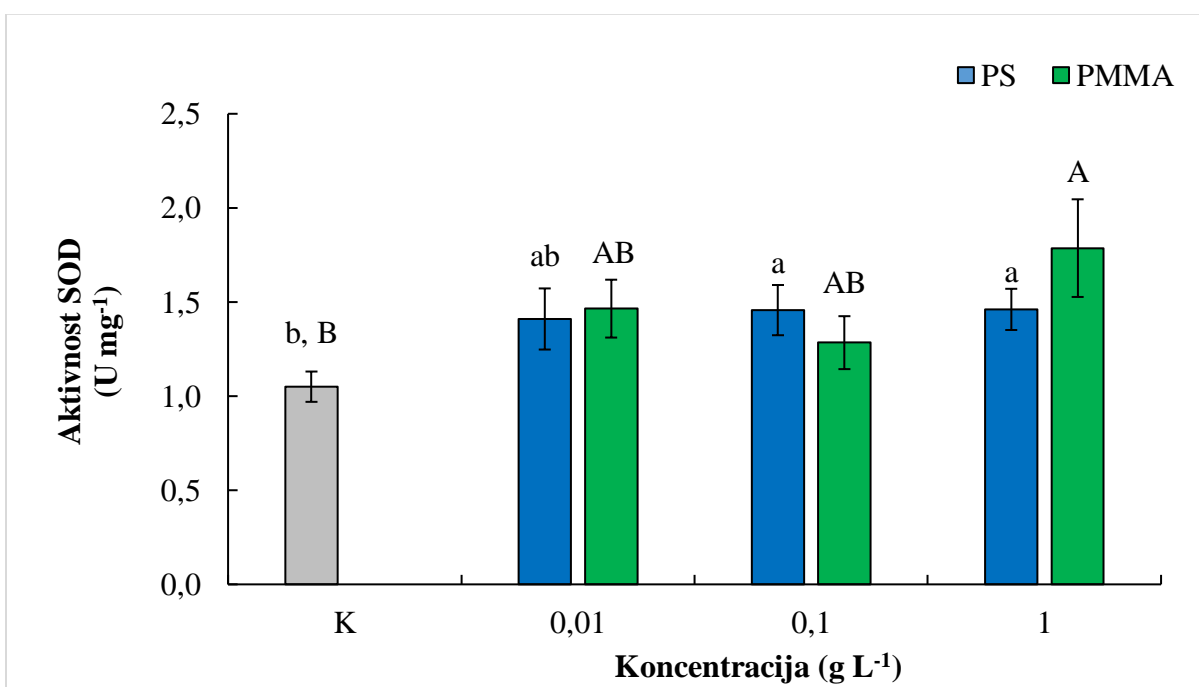


Slika 7. % tDNA u korjenčićima *A. cepa* izmjerena nakon 72 h u kontroli (K) i nakon izlaganja koncentracijama otopina od 0,01, 0,1 i 1 g L⁻¹ PS-MPs (PS) i PMMA-MPs (PMMA). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima označavaju značajne razlike ($p \leq 0,5$, jednosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test). Mala slova označavaju razlike između različitih koncentracija PS-MPs i K, dok velika slova označavaju razlike između različitih koncentracija PMMA-MPs i K.

4.7. Učinak na aktivnost antioksidacijskih enzima

4.7.1. Aktivnost enzima SOD

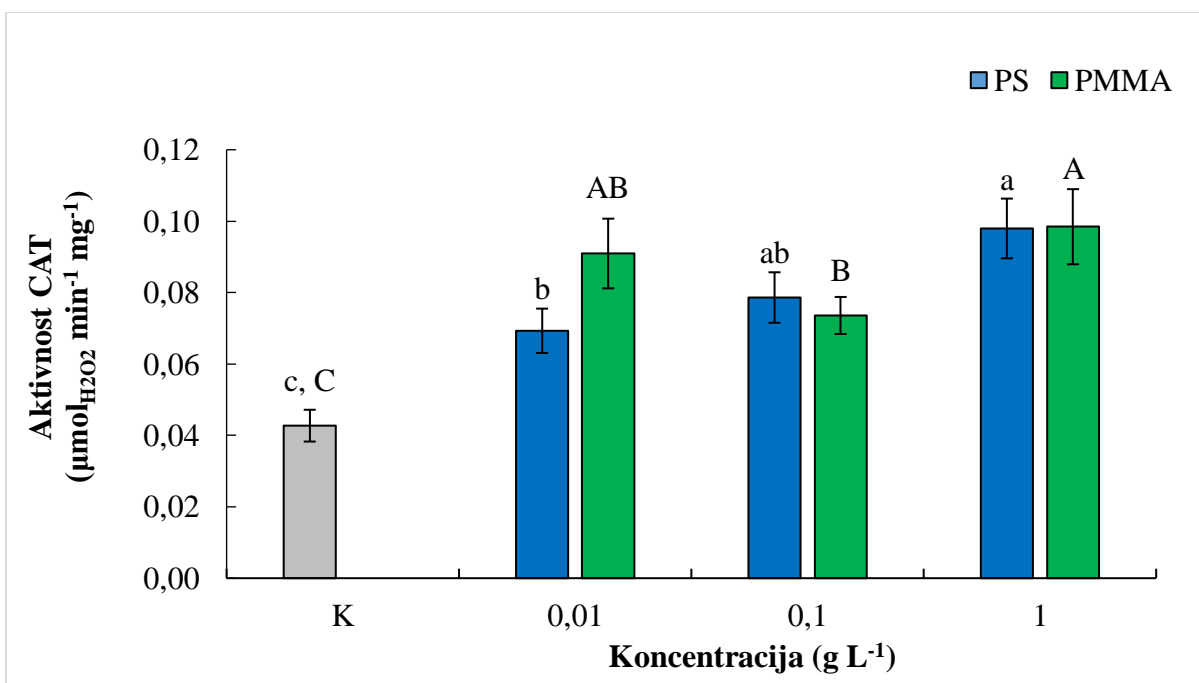
Povećanje aktivnosti enzima SOD zabilježeno je nakon svih ispitanih tretmana. Svi tretmani s PS-MPs pokazali su povećanu aktivnost enzima u odnosu na kontrolu, pri čemu je statistički značajna razlika utvrđena kod srednje i najveće koncentracije (0,1 i 1 g L⁻¹). Povećane vrijednosti zabilježene su i nakon tretmana s PMMA-MPs, iako je statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu dobivena samo za tretman s najvećom koncentracijom (1 g L⁻¹). Značajna razlika u aktivnosti enzima SOD između istih koncentracija različitih tretmana nije zabilježena (Slika 8.).



Slika 8. Aktivnost SOD u korjenčićima *A. cepa* izmjerena nakon 72 h u kontroli (K) i nakon izlaganja koncentracijama otopina od 0,01, 0,1 i 1 g L⁻¹ PS-MPs (PS) i PMMA-MPs (PMMA). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima označavaju značajne razlike ($p \leq 0,5$, jednosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test). Mala slova označavaju razlike između različitih koncentracija PS-MPs i K, dok velika slova označavaju razlike između različitih koncentracija PMMA-MPs i K.

4.7.2. Aktivnost enzima CAT

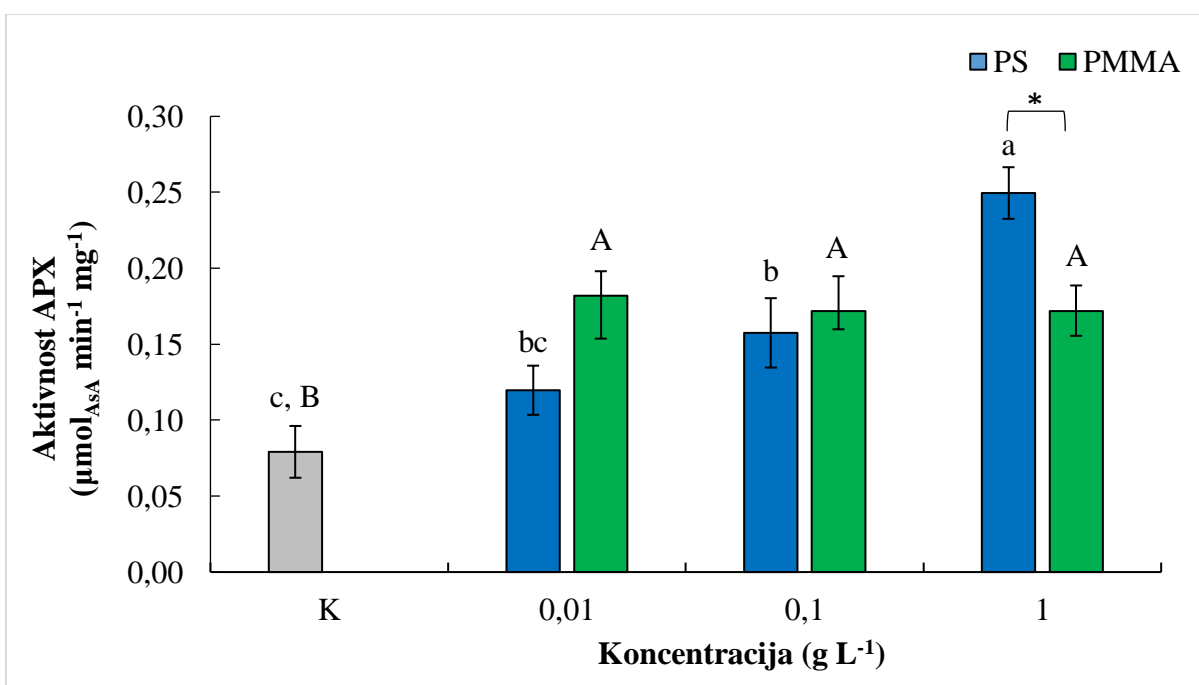
Sve ispitane koncentracije oba tipa MPs rezultirale su statistički značajnim povećanjem aktivnosti enzima CAT u usporedbi s kontrolom. Među tretmanima s PS-MPs uočen je linearni porast vrijednosti s povećanjem koncentracije MPs te je aktivnost CAT zabilježena pri najvećoj koncentraciji (1 g L^{-1}) bila statistički značajno veća od vrijednosti izmjerenih nakon tretmana s najnižom koncentracijom ($0,01 \text{ g L}^{-1}$). Što se tiče tretmana s PMMA-MPs, tu porast vrijednosti nije bio linearan, ali je ipak najveća koncentracija (1 g L^{-1}) rezultirala i najvećim vrijednostima koje su bile statistički značajno različite od onih izmjerenih pri srednjoj koncentraciji tretmana ($0,1 \text{ g L}^{-1}$). Značajna razlika u aktivnosti enzima CAT između istih koncentracija različitih tretmana nije zabilježena (Slika 9.).



Slika 9. Aktivnost CAT u korjenčićima *A. cepa* izmjerena nakon 72 h u kontroli (K) i nakon izlaganja koncentracijama otopina od 0,01, 0,1 i 1 g L^{-1} PS-MPs (PS) i PMMA-MPs (PMMA). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika \pm standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima označavaju značajne razlike ($p \leq 0,5$, jednosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test). Mala slova označavaju razlike između različitih koncentracija PS-MPs i K, dok velika slova označavaju razlike između različitih koncentracija PMMA-MPs i K.

4.7.3. Aktivnost enzima APX

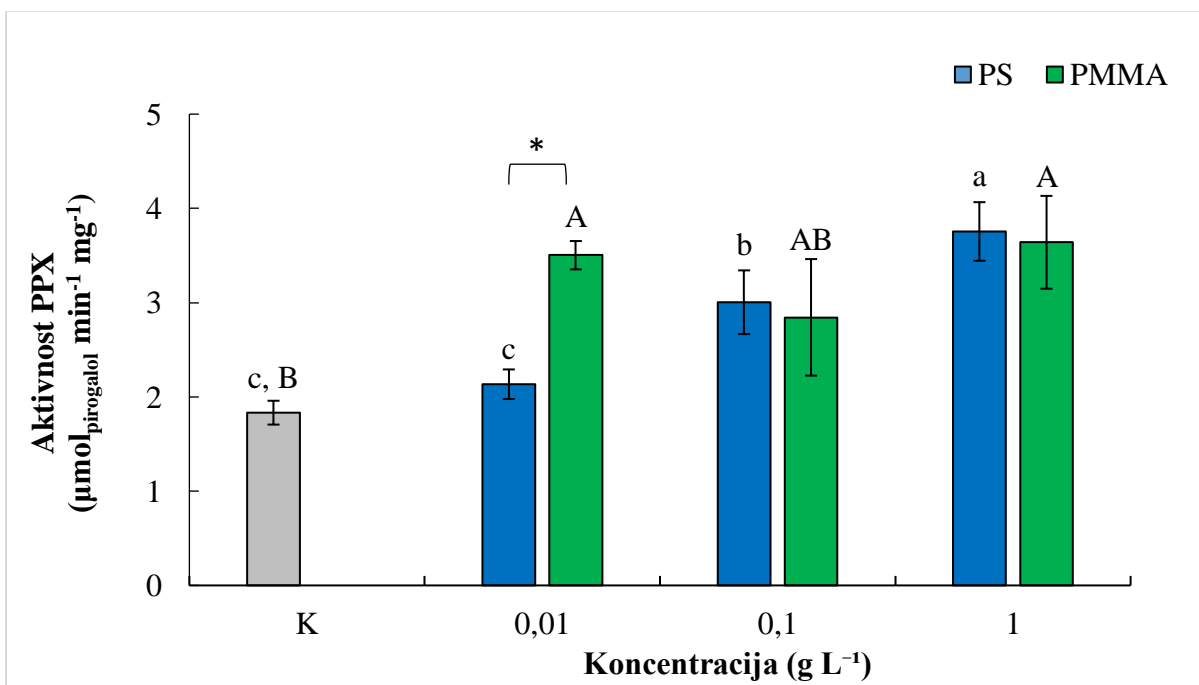
Gotovo sve ispitane koncentracije oba tipa MPs rezultirale su statistički značajnim povećanjem aktivnosti enzima APX u usporedbi s kontrolom. Svi tretmani s PS-MPs linearno su povećali vrijednosti s povećanjem koncentracije tretmana, iako je statistički značajna razlika zabilježena samo za dvije veće koncentracije (0,1 i 1 g L⁻¹). Kod svih tretmana s PMMA-MPs zabilježene vrijednosti bile su statistički značajno veće u odnosu na kontrolu, a međusobnom usporedbom tretmana uočeno je postepeno smanjenje aktivnosti enzima s povećanjem koncentracije MPs koje nije bilo statistički značajno. Usporedba različitih tretmana istih koncentracija ponovo je pokazala da je pri najvećoj ispitanoj koncentraciji (1 g L⁻¹) tretman s PS-MPs rezultirao sa značajno većim vrijednostima u odnosu na tretman s PMMA-MPs (Slika 10.).



Slika 10. Aktivnost APX u korjenčićima *A. cepa* izmjerena nakon 72 h u kontroli (K) i nakon izlaganja koncentracijama otopina od 0,01, 0,1 i 1 g L⁻¹ PS-MPs (PS) i PMMA-MPs (PMMA). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima označavaju značajne razlike ($p \leq 0,5$, jednosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test). Mala slova označavaju razlike između različitih koncentracija PS-MPs i K, dok velika slova označavaju razlike između različitih koncentracija PMMA-MPs i K. Statistički značajne razlike između različitih tretmana iste koncentracije (t-test) označene su zvjezdicom (*).

4.7.4. Aktivnost enzima PPX

Izlaganje korjenčića *A. cepa* česticama MPs izazvalo je statistički značajan porast aktivnosti enzima PPX u usporedbi s kontrolom za većinu ispitanih koncentracija. Linearno povećanje vrijednosti s povećanjem koncentracije MPs zabilježeno je nakon svih tretmana s PS-MPs, iako razlika izmjerena pri najnižoj koncentraciji (0,01 g L⁻¹) nije bila statistički značajna u odnosu na kontrolu. Tretmani s PMMA-MPs pri koncentraciji od 0,01 i 1 g L⁻¹ rezultirali su statistički značajnim i međusobno podjednakim povećanjem aktivnosti enzima PPX. Zanimljivo je da usporedba različitih tretmana istih koncentracija pokazala značajno veće vrijednosti s PMMA-MPs u odnosu na PS-MPs i to pri najnižoj ispitanoj koncentraciji (0,01 g L⁻¹) (Slika 11.).



Slika 11. Aktivnost PPX u korjenčićima *A. cepa* izmjerena nakon 72 h u kontroli (K) i nakon izlaganja koncentracijama otopina od 0,01, 0,1 i 1 g L⁻¹ PS-MPs (PS) i PMMA-MPs (PMMA). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima označavaju značajne razlike ($p \leq 0,5$, jednosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test). Mala slova označavaju razlike između različitih koncentracija PS-MPs i K, dok velika slova označavaju razlike između različitih koncentracija PMMA-MPs i K. Statistički značajne razlike između različitih tretmana iste koncentracije (t-test) označene su zvjezdicom (*).

5. RASPRAVA

Raznolika primjena plastičnih proizvoda u ljudskoj svakodnevici dovela je do visoke zastupljenosti polimera plastike i primjesa koje se dodaju tijekom njihove proizvodnje u svim sastavnicama okoliša. Djelovanjem vanjskih faktora navedeni polimeri usitnjavaju se na sitnije čestice (Kaur i sur. 2022), kao što su MPs, koje nakon što dospiju u kopneni okoliš, zbog svoje male veličine mogu ući u biljke i u njima se nakupljati, a njihov prijenos putem hranidbenog lanca može imati učinak i na druge trofičke razine (Igalavithana i sur. 2022). Čestice MPs predstavljaju sve veći izvor zagađenja tla te su rastući svjetski ekološki problem.

Iako su čestice MPs znatno prisutnije u kopnenim ekosustavima nego u vodenim (de Souza Machado i sur. 2018; Rillig i sur. 2019), nedostaju sveobuhvatna istraživanja o njihovom utjecaju na kopnenu floru. No, u posljednje vrijeme pojavio se interes i za učinke na kopnene biljke, a provedena istraživanja pokazala su da MPs izazivaju inhibiciju rasta korjenčića vodene leće *Lemna minor* (Kalčíková i sur. 2017), inhibiciju klijanja kod vrste salate *Lepidium sativum* (Bosker i sur. 2019), porast lipidne peroksidacije u korjenčićima luka *A. cepa* (Giorgetti i sur. 2020) te povećanje aktivnosti antioksidacijskih enzima na korjenčićima riže *Oryza sativa* (Spano i sur. 2022).

Cilj mog istraživanja bio je provjeriti utjecaj MPs građenih od dvije vrste polimera, PS-MPs i PMMA-MPs, na *A. cepa*, važnu poljoprivrednu vrstu, te na taj način doprinijeti boljem općem razumijevanju fitotoksičnih učinaka MPs.

U svom istraživanju koristila sam komercijalne čestice građene od dvije vrste polimera, PS-MPs (promjera 147 nm) i PMMA-MPs (promjera 105 nm), koje se obje s obzirom na veličinu nalaze na granici između nano- (<100 nm) i mikroplastike (>100 nm) (Biba i sur. 2023). Zadržavanjem MPs u okolišu dolazi do dezintegracije, tzv. starenja MPs, što podrazumijeva promjenu fizikalno-kemijskih svojstava čestica, između ostalog i veličine (de Souza Machado i sur. 2018; Li i sur. 2022). Za potrebe istraživanja, prvo sam ispitala stabilnost oba tipa MPs metodom DLS kroz vremenski period od tri dana, koliko je trajalo i izlaganje korjenčića *A. cepa*. Sve ispitane koncentracije PS-MPs i PMMA-MPs pokazale su stabilnost tijekom gotovo čitavog perioda mjerenja, tj. nije bilo velikih promjena u njihovoj veličini, što je na neki način bilo i očekivano s obzirom da je kao medij za izlaganje korištena ultračista voda. Ovaj rezultat u skladu

je s rezultatima istraživanja Sun i sur. (2020) gdje su različito nabijene čestice PS-NPs (PS-SO₃H i PS-NH₂) također pokazale stabilnost u ultračistoj vodi. No, ipak je zamjetno da je za većinu ispitanih koncentracija oba tipa MPs zabilježen manji promjer čestica u odnosu na kontrolu nakon 72 h. Mekaru (2020) je u svom istraživanju također pokazao da se PS-MPs, promjera 200 nm, nakon miješanja u ultračistoj vodi razgrađuju na manje čestice, dimenzija NPs, što je u skladu s rezultatima mog istraživanja.

Jedan od ključnih organa svakog biljnog organizma jest korjenčić koji služi za učvršćivanje biljke te unos, transport i skladištenje minerala i vode. Biljke putem korjenčića ostvaruju izravan kontakt s tlom i drugim vrstama biološkog materijala poput mikroorganizama i korjenčića drugih biljaka (Karlova i sur. 2021). Budući da se promjena duljine korjenčića koristi za procjenu fitotoksičnosti neke tvari (Jiang i sur. 2019), u svom istraživanju ispitala sam utjecaj čestica oba tipa MPs na duljinu korjenčića *A. cepa*. Kod najmanje koncentracije PS-MPs došlo je do statistički značajnog smanjenja duljine korjenčića u odnosu na kontrolu, što bi se možda moglo pripisati povećanju veličine čestica, izmjerenom metodom DLS, koje su vjerojatno prijanjale uz korjenčić i korijenove dlačice te zbog svojih većih dimenzija jače blokirale unos vode, što je moglo usporiti rast korjenčića. Čestice MPs često se akumuliraju i agregiraju u vrhovima korjenčića, a osobito na korijenovim dlačicama (Schwab i sur. 2015; Bosker i sur. 2019). U istraživanju Asli i Neumann (2009) na korjenčićima vrste *Zea mays* pri izlaganju NPs betonita i TiO₂ došlo je do vezanja čestica za staničnu stijenu korjenčića čime se smanjio promjer pora što je rezultiralo smanjenjem hidrauličke vodljivosti korjenčića. Nadalje, u istraživanju Wang i sur. (2017) prilikom izlaganja korjenčića vrsti *Triticum aestivum* česticama Ag₂S veličine do 120 nm zabilježena je smanjena aktivnost akvaporina, što je dovelo do smanjenja duljine korjenčića. Veće koncentracije PS-MPs i sve ispitane koncentracije PMMA-MPs nisu značajno utjecale na rast korjenčića, što je u skladu s rezultatima istraživanja Biba i sur. (2023). Također, u istraživanju Jiang i sur. (2019) nakon izlaganja biljke *Vicia faba* koncentracijama od 10, 50 i 100 mg L⁻¹ PS-MPs promjera 100 nm nije zabilježena promjena u duljini korjenčića u odnosu na kontrolu, dok su PS-MPs promjera 5 μm inducirale smanjenje korjenčića pri najvećim koncentracijama. Nadalje, rezultati istraživanja Li i sur. (2021) na korjenčićima biljke *Cucumis sativus* pokazali su kako primjena različitih veličina čestica PS-MPs (100, 300, 500 i 700 nm) u koncentraciji od 50 mg L⁻¹ nije izazvala statistički značajne promjene u duljini korjenčića u odnosu na kontrolu. Odgovor na promjenu rasta korjenčića ovisi o više

različitih faktora, ponajviše o veličini čestica za koju je veća vjerojatnost da će inducirati promjenu ako je promjer čestice manji budući da lakše može ući u stanicu (Dong i sur. 2021). Uz veličinu čestica važni su i drugi parametri kao što su vrsta biljke, sastav MPs, medij za izlaganje, duljina i način izlaganja (Ekner-Grzyb i sur. 2022).

Dulja izloženost biljaka nepovoljnim okolišnim uvjetima može dovesti do pojave oksidacijskog stresa, koji nastaje zbog prekomjernog stvaranja ROS unutar stanica (Zhou i sur. 2021). Među vrlo reaktivne ROS vrste ubraja se O_2^- , jedan od prvih produkata transportnog sustava elektrona, koji nastaje kada molekula O_2 preuzme elektron (El-Beltagi i Mohamed 2013). Njegova sinteza normalna je funkcija organela biljne stanice, no u stresnim uvjetima dolazi do pojačane proizvodnje koja može nadmašiti detoksikacijski kapacitet antioksidansa te dovesti do oštećenja biomolekula (Demidchik 2015). U mom istraživanju, niti jedan od ispitanih tretmana s PS-MPs i PMMA-MPs nije značajno povećao nastanak O_2^- , čak naprotiv, kod najveće koncentracije PMMA-MPs izmjeren je smanjeni sadržaj O_2^- , što je u skladu s rezultatima istraživanja Biba i sur. (2023). Za razliku od toga, u istraživanju Maity i sur. (2020) na korjenčićima *A. cepa* koji su bili izloženi česticama PS-MPs veličine 100 nm zabilježeno je povećanje sadržaja O_2^- kod koncentracija 25, 100 i 400 mg L⁻¹. Razlike između navedenih istraživanja mogu se pripisati različitoj veličini čestica, pri čemu su manje čestice lakše mogle ući u stanicu i prouzročiti negativan učinak.

H_2O_2 , stabilna ROS molekula koja nastaje disproporcioniranjem O_2^- (Demidchik 2015) ima kratak životni vijek i brzo difundira kroz membrane, pri čemu je enzimi poput CAT i POX dalje razlažu (Hasanuzzaman i sur. 2020). U svom istraživanju nisam zabilježila značajne promjene u sadržaju H_2O_2 , što zajedno s rezultatima sadržaja O_2^- navodi na zaključak da ili MPs nisu izazvale pojavu oksidacijskog stresa ili su antioksidacijski enzimi nakon tri dana već uspješno razgradili suvišak ROS molekula. Giorgetti i sur. (2020) su u korjenčićima *A. cepa*, nakon izlaganja 72 h PS-NPs promjera 50 nm istih koncentracija kao u mom istraživanju, pri najvećoj koncentraciji (1 g L⁻¹) izmjerili statistički značajno povećanje H_2O_2 , dok su tretmani s dvije niže koncentracije (0,01 i 0,1 g L⁻¹) rezultirali ili blagim sniženjem ili blagim povećanjem sadržaja H_2O_2 , što je u skladu s mojim rezultatima. Značajno povećanje vrijednosti zabilježeno pri najvećoj koncentraciji razlikovalo se od rezultata mog istraživanja, a može se također pripisati razlici u veličini čestica.

Djelovanjem ROS i oksidacijskog stresa može doći do trajnih i privremenih oštećenja lipida, proteina i molekule DNA (Demidchik 2015). Sadržaj MDA, jednog od konačnih produkata peroksidacije lipida, koristi se kao biokemijski marker oštećenja bioloških membrana. Povećane razine MDA ukazuju na povećanu peroksidaciju lipida, pri čemu slobodni radikali napadaju PUFA te nastaju reaktivni karbonilni spojevi (Anjum i sur. 2014). U svom istraživanju nakon ispitanih tretmana s oba tipa MPs sadržaj MDA nije se značajno promijenio u usporedbi s kontrolom, što je u skladu s rezultatima istraživanja Biba i sur. (2023). Nadalje, u istraživanju Jiang i sur. (2019) nakon izlaganja korjenčića *V. faba* česticama PS-MPs promjera 5 μm također nisu zabilježene statistički značajne promjene u sadržaju MDA niti pri jednoj ispitivanoj koncentraciji; no, nakon tretmana česticama promjera 100 nm u koncentraciji od 50 mg L^{-1} zabilježena je povećana lipidna peroksidacija. Sličan rezultat zabilježen je i u istraživanju Giorgetti i sur. (2020), u kojem su čestice PS-NPs promjera 50 nm kod koncentracija 1 g L^{-1} dovele do pojačane proizvodnje MDA, a kod koncentracije 0,01 g L^{-1} smanjenje sadržaja MDA. Razlike mogu biti posljedica različitih dimenzija čestica te razlike u biljnoj vrsti i koncentraciji MPs.

Uz peroksidaciju lipida, akumulacija ROS može aktivirati karbonilaciju proteina i oksidaciju nukleinskih kiselina (Ekner-Grzyb i sur. 2022). Sadržaj proteinskih karbonila nastalih modifikacijom proteina koristi se kao mjera oštećenja proteina, a budući da su oksidirani proteini relativno stabilni, pogodan su biomarker oksidacijskog stresa (Dalle-Donne i sur. 2003). Mjerenjem proteinskih karbonila utvrdila sam povećanje sadržaja kod svih ispitanih koncentracija oba tipa MPs u odnosu na kontrolu. Najveće vrijednosti svakog tretmana, a ujedno i statistički značajne vrijednosti izmjerene su nakon tretmana s 0,01 i 0,1 g L^{-1} PS-MPs te 1 g L^{-1} PMMA-MPs, što je u skladu s rezultatima koje su dobili Biba i sur. (2023). Povećanje sadržaja proteinskih karbonila zabilježeno je i u biljci *O. sativa*, tretiranoj s PS-MPs mikrosferama veličine 0,45 nm pri svim ispitanim koncentracijama (10, 20 i 40 mg L^{-1}) (Liu i sur. 2023).

Kao posljedica oksidacije molekule DNA oštećeni fragmenti migriraju iz jezgre tvoreći rep kometa čija je duljina povezana s razinom oštećenja molekule DNA u stanici (Mazur i sur. 2021). Mjerenjem duljine tDNA nije ustanovljeno povećanje sadržaja niti pri jednom ispitivanom tretmanu u odnosu na kontrolu. Navedeni rezultati u skladu su s istraživanjem Biba i sur. (2023),

što ukazuje na to da je aktivacija antioksidacijskog sustava spriječila značajnije oštećenje molekule DNA.

Tijekom evolucije biljke su razvile mnoge mehanizme za sprječavanje i minimiziranje različitih štetnih djelovanja među kojima je i antioksidacijski sustav (Kadac-Czapska i sur. 2024) koji je sastavljen od dvije komponente, enzimske i neenzimske (Pandey i sur. 2017). Enzimskom komponentom sastoji se od niza enzima koji rade simultano s ciljem inhibicije nagomilavanja ROS i sprječavanja oksidacije (Pandey i sur. 2017; Hasanuzzaman i sur. 2020). U svom istraživanju određivala sam aktivnost četiri različita enzima: SOD, CAT, APX i PPX.

Prvi enzim koji se aktivira u sklopu antioksidacijskog sustava je SOD čijim katalitičkim djelovanjem dolazi do disproporcioniranja O_2^- na H_2O_2 i O_2 (Del Rio i sur. 2018). U svom istraživanju zabilježila sam porast aktivnosti SOD kod svih tretmana MPs, pri čemu je kod viših koncentracija ($0,1$ i 1 g L^{-1} PS-MPs i 1 g L^{-1} PMMA-MPs) zabilježeno značajno povećanje aktivnosti u odnosu na kontrolu. Budući da tretmani nisu rezultirali značajnim povećanjem sadržaja O_2^- , dok je istovremeno zabilježena povećana aktivnost enzima SOD, mogu zaključiti kako je navedeni enzim uspješno razgradio suvišak O_2^- . Navedeni rezultati su u skladu s rezultatima Biba i sur. (2023), gdje je došlo do blagog povećanja aktivnosti SOD također sa značajnim razlikama pri višim koncentracijama (1 g L^{-1} PS-MPs i 1 g L^{-1} PMMA-MPs).

CAT, APX i PPX ključni su enzimi za razgradnju H_2O_2 na H_2O koji u kombinaciji s drugim antioksidacijskim enzimima kontroliraju optimalnu razinu H_2O_2 za normalan rast i razvoj biljaka (Anjum i sur. 2016; Rajput i sur. 2021). Međusobno se razlikuju prema afinitetu za H_2O_2 i potrebi za redukcijskom snagom: APX i PPX imaju veći afinitet te učinkovito djeluju pri nižim koncentracijama koristeći određeni supstrat kao donor elektrona, dok CAT s manjim afinitetom učinkovito djeluje pri višim koncentracijama (Maehly i Chance 1954; Anjum i sur. 2016). U svom istraživanju zabilježila sam značajne promjene aktivnosti CAT nakon svih ispitanih tretmana u odnosu na kontrolu, što je u skladu s literaturnim podacima. Jiang i sur. (2019) zabilježili su značajan porast aktivnosti CAT u korjenčićima *V. faba* nakon izlaganja česticama PS-MPs promjera 100 nm pri svim ispitanim koncentracijama (10 , 50 i 100 mg L^{-1}), dok su Biba i sur. (2023) sličan rezultat zabilježili u korjenčićima *A. cepa* nakon izlaganja PS-MPs i PMMA-MPs. Nadalje, značajan porast aktivnosti CAT izmjeren je i u korjenčićima vrste *O. sativa* nakon tretmana s 50 i 100 mg L^{-1} PS-NPs (Zhou i sur. 2021). U mom istraživanju, povećanu aktivnost

pokazali su i enzimi APX (svi tretmani izuzev najmanje koncentracije PS-MPs) i PPX (svi tretmani izuzev najmanje koncentracije PS-MPs i srednje koncentracije PMMA-MPs), što je također u skladu s rezultatima istraživanja Biba i sur. (2023). Iz navedenog možemo zaključiti da je povećana aktivnost enzima antioksidacijskog sustava uspješno neutralizirala ROS molekule, što je ondarezultiralo malim oksidacijskim oštećenjem biomolekula, naročito lipida i molekule DNA.

Ako se međusobno usporede učinci PS-MPs i PMMA-MPs na korjenčiće *A. cepa*, najveće razlike zabilježene su u biokemijskim parametrima. Naime, izloženost PS-MPs rezultirala je nešto većim stvaranjem ROS molekula i povećanim sadržajem MDA i proteinskih karbonila u usporedbi s odgovarajućim tretmanima s PMMA-MPs, što je bilo posebno izraženo pri najvišoj testiranoj koncentraciji. Ti bi se rezultati mogli objasniti većom stabilnošću PMMA-MPs od PS-MPs, što sam zabilježila u svom radu, ali i slabijim unosom PMMA-MPs u stanice korjenčića u odnosu na PS-MPs, što su u svom radu pokazali Biba i sur. (2023). Međutim, aktivnosti antioksidacijskih enzima bile su podjednako povišene nakon izlaganja objema vrstama MPs u usporedbi s kontrolom. Iz dobivenih rezultata možemo zaključiti da, iako korjenčići *A. cepa* možda ne unose PMMA-MPs jednako učinkovito kao PS-MPs, PMMA-MPs ipak induciraju odgovor u staničnom antioksidacijskom sustavu. Diferencijalni odgovor biokemijskih parametara pri izlaganju pojedinih biljnih vrsta MPs različitog sastava polimera zabilježen je i u istraživanjima drugih autora. Kada su proučavani učinci PS-, PE- i PP-MPs na klijance *Lycopersicon esculentum*, PP-MPs su slabije inducirali aktivnost antioksidacijskih enzima od PS- i PE-MPs (Shi i sur. 2022). Nadalje, PVC-MPs izazvali su jači učinak na biokemijske parametre u vrsti *Lepidium sativum* u usporedbi s PP-MPs i PE-MPs, a autori su zaključili da se biljka ne može boriti s toksičnošću koju izazivaju PVC-MPs, dok se slabije nosi s učincima PE-MPs tijekom duljeg vremena izlaganja (Pignatelli i sur. 2020). Ovi rezultati pokazuju da MPs različitog sastava polimera mogu rezultirati različitim učincima na rast i fiziologiju biljaka u različitim biljnim vrstama.

6. ZAKLJUČAK

Dobiveni rezultati pružaju uvid u odgovor *A. cepa* na izloženost MPs na temelju dva različita polimera:

1. Analiza stabilnosti MPs u ultračistoj vodi pokazala je veću stabilnost PMMA-MPs u odnosu na PS-MPs.
2. Ispitane koncentracije PS-MPs i PMMA-MPs nisu izazvale značajne promjene u duljini korjenčića niti značajna oštećenja lipida, proteina i molekule DNA u odnosu na kontrolu budući da su povećane aktivnosti antioksidacijskih enzima uspješno razgradile ROS te spriječile nastanak oksidacijskog stresa.
3. Najveće razlike u učincima MPs od različitih polimera zabilježene su u biokemijskim parametrima:
 - PS-MPs izazvale su pojačano stvaranje ROS molekula te povećani sadržaj MDA i proteinskih karbonila u odnosu na PMMA-MPs, što je osobito bilo izraženo pri najvećoj koncentraciji.
 - Oba tipa MPs izazvala su povećanje aktivnosti antioksidacijskih enzima s povećanjem koncentracije MPs; PS-MPs pokazao je linearan rast, dok je takav odgovor izostao kod PMMA-MPs.

7. LITERATURA

Aebi M. (1984): Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105:121-126.

Anjum N.A., Sharma P., Gil L. S.S., Hasanuzzaman M., Khan E.A., Kachhap K., Mohamed A.A., Thangavel P., Devi G.D., Vasudhevan P., Sofu A., Khan N.A., Misra A.N., Lukatkin A.S., Singh H.P., Pereira E., Tuteja N. (2016): Catalase and ascorbate peroxidase - representative H₂O₂ - detoxifying heme enzymes in plants. *Environmental Science and Pollution Research International* 23(19):19002-19029.

Anjum N.A., Sofu A., Scopa A., Roychoudhury A., Gill S.S., Iqbal M., Lukatkin A.S., Pereira E., Duarte A.C., Ahmad I. (2014): Lipids and proteins - major targets of oxidative modifications in abiotic stressed plants. *Environmental Science and Pollution Research* 22(6):4099-121.

Arora A., Sairam R.K., Srivastava G.C. (2002): Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 82(10):1227-1238.

Asli S., Neumann P.M. (2009): Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. *Plant, Cell & Environment* 32:577-584.

Beauchamp C., Fridovich I. (1971): Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44:276-287.

Biba R., Cvjetko P., Jakopčić M., Komazec B., Tkalec M., Dimitrov N., Begović T., Balen B. (2023): Phytotoxic effects of polystyrene and polymethyl methacrylate microplastics on *Allium cepa* roots. *Plants* 12(4):747.

Bonciu E., Firbas P., Fontanetti C. S., Wusheng J., Karaismailoğlu M. C. Liu, D., Menicucci F., Pesnya D.S., Popescu A., Romanovsky A.V., Schiff S., Ślusarczyk J., de Souza C.P., Srivastava A., Sutan A., Papini, A. (2018): An evaluation for the standardization of the *Allium cepa* test as cytotoxicity and genotoxicity assay. *Caryologia* 71(3):191-209.

Bosker T., Bouwman L.J., Brun N.R., Behrens P., Vijver M.G. (2019): Microplastics accumulate on pores in seed capsule and delay germination and root growth of the terrestrial vascular plant *Lepidium sativum*. *Chemosphere* 226:774-781.

Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

Caldwell J., Taladriz-Blanco P., Lehner R., Lubsky A., Ortuso R.D., Rothen-Rutishauser B., Petri-Fink A. (2022): The micro-, submicron-, and nanoplastic hunt: A review of detection methods for plastic particles. *Chemosphere* 293:133514.

Cavaliere A., Pigliafreddo S., De Marchi E., Banterle A. (2020): Do consumers really want to reduce plastic usage? Exploring the determinants of plastic avoidance in food-related consumption decisions. *Sustainability* 12(22):9627.

Colzi I., Renna L., Bianchi E., Castellani M.B., Coppi A., Pignattelli S., Loppi S., Gonnelli C. (2022): Impact of microplastics on growth, photosynthesis and essential elements in *Cucurbita pepo* L. *Journal of Hazardous Materials* 423:127238.

Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R. (2003): Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 329(1-2):23-38.

De Oliveira F.K., Santos L.O., Buffon J.G. (2021): Mechanism of action, sources, and application of peroxidases. *Food Research International* 143:110266.

de Souza Machado A.A., Kloas W., Zarfl C., Hempel S., Rillig M.C. (2018): Microplastics as an emerging threat to terrestrial ecosystems. *Global Change Biology* 24: 1405-1416.

Del Rio L.A., Corpas F.J., López-Huertas E., Palma J.M. (2018): Plant superoxide dismutases: Function under abiotic stress conditions. *Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants*, str. 1-26.

Demidchik V. (2014): Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany* 109:212-228.

Dong R., Liu R., Xu Y., Liu W., Wang L., Liang X., Huang Q., Sun Y. (2022): Single and joint toxicity of polymethyl methacrylate microplastics and As (V) on rapeseed (*Brassica campestris* L.). *Chemosphere* 291(3):133066.

Dutta J., Aijaz A, Singh J. (2018): Study of industrial effluents induced genotoxicity on *Allium cepa* L. *Caryologia* 71(2):1-7.

Ekner-Grzyb A., Duka A., Grzyb T., Lopes I., Chmielowska-Bąk J. (2022): Plants oxidative response to nanoplastic. *Frontiers in Plant Science* 13:1027608.

El-Beltagi H.S., Mohamed H.I. (2013): Reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidative defense mechanism. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 41(1):44-57.

Geyer R., Jambeck J.R., Law K.L. (2017): Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances* 3(7):1700782.

Gichner T., Patková Z., Száková J., Demnerova K. (2004): Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutation Research* 559(1-2):49-57.

Giorgetti L., Spanò C., Muccifora S., Bottega S., Barbieri F., Bellani L., Castiglione M.F. (2020): Exploring the interaction between polystyrene nanoplastics and *Allium cepa* during germination: Internalization in root cells, induction of toxicity and oxidative stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 149:170-177.

Gyori B.M., Venkatachalam G., Thiagarajan P.S., Hsu D., Clement, M.-V. (2014): OpenComet: An automated tool for Comet assay image analysis. *Redox Biology*. 2:457-465.

Hasanuzzaman M., Bhuyan M.H.M.B., Zulfiqar F., Raza A., Mohsin S.M., Mahmud J.A., 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* 9(8):681.

Hassan P.A., Rana S., Verma G. (2015): Making sense of brownian motion: colloid characterization by dynamic light scattering. *Langmuir* 31(1):3-12.

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

Igalavithana A.D., Mahagama M.G.Y.L., Gajanayake P., Abeynayaka A., Gamaralalage P.J.D., Ohgaki M., Takenaka M., Fukai T., Itsubo N. (2022): Microplastics and potentially toxic elements: potential human exposure pathways through agricultural lands and policy based countermeasures. *Microplastics* 1(1):102-120.

Iqbal M., Abbas M., Nisar J., Nazir A., Qamar A.Z. (2019): Bioassays based on higher plants as excellent dosimeters for ecotoxicity monitoring: A review. *Chemistry International* 5(1):1-80.

Jiang X., Chen H., Liao Y., Ye Z., Li M., Klobučar G. (2019): Ecotoxicity and genotoxicity of polystyrene microplastics on higher plant *Vicia faba*. *Environmental Pollution* 250:831-838.

Kadac-Czapska K., Oško J., Knez E., Grembecka M. (2024): Microplastics and oxidative stress-current problems and prospects. *Antioxidants* 13(5):579.

Kalčíková G., Žgajnar Gotvajn A, .Kladnik A., Jemec A. (2017): Impact of polyethylene microbeads on the floating freshwater plant duckweed *Lemna minor*. *Environmental Pollution* 230:1108-1115.

Karlova R., Boer D., Hayes S., Testerink C. (2021): Root plasticity under abiotic stress. *Plant Physiology* 187(3):1057-1070.

Kaur M., Xu M., Wang L. (2022): Cyto-genotoxic effect causing potential of polystyrene microplastics in terrestrial plants. *Nanomaterials* 12(12):2024.

Kumari A., Rajput V.D., Mandzhieva S.S., Rajput S., Minkina T., Kaur R., Sushkova S., Kumari P., Ranjan A., Kalinitchenko V.P., Glinushkin A.P. (2022): Microplastic pollution: an emerging threat to terrestrial plants and insights into its remediation strategies. *Plants* 11(3): 340.

Levine R.L., Williams J.A., Stadtman E.R., Shacter E. (1994): Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 233:346-357.

Li C., Jiang B., Guo J., Sun C., Shi C., Huang S., Liu W., Wu C., Zhang Y. (2022): Aging process of microplastics in the aquatic environments: aging pathway, characteristic change, compound effect, and environmentally persistent free radicals formation. *Water* 14(21):3515.

Li Z., Li Q., Li R., Zhou J., Wang G. (2021): The distribution and impact of polystyrene nanoplastics on cucumber plants. *Environmental Science and Pollution Research* 28:16042-16053.

Liu D., Kottke I. (2003): Subcellular localization of chromium and nickel in root cells of *Allium cepa* by EELS and ESI. *Cell Biology and Toxicology* 19:299–311.

Liu L., Zhou, Y., Wang, C., Liu H., Xie R., Wang L. Hong T., Hu Q. (2023): Oxidative damage in roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings exposed to microplastics or combined with cadmium. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 110(1):15.

Maehly A.C., Chance B. (1954): The assay of catalase and peroxidases. *Methods of Biochemical Analysis* 1:358-423.

Corrêa Martins M.N.C., de Souza V.V, da Silva Souza T. (2016): Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on *Allium cepa*. *Chemosphere* 148:481-486.

Mekaru H. (2020): Effect of agitation method on the nanosized degradation of polystyrene microplastics dispersed in water. *ACS Omega* 5(7):3218-3227

Nakano Y., Asada K. (1981): Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22:867-880.

Nayanathara Thathsarani Pilapitiya P.G.C., Ratnayake A.S. (2024): The world of plastic waste: a review. *Cleaner Materials* 11:100220.

Pandey V.P., Awasthi M., Singh S., Tiwari S., Dwivedi U.N. (2017): A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochemistry Analytical Biochemistry* 6:308.

Pareek S., Sagar N.A., Sharma S., Kumar V. (2017): Onion (*Allium cepa* L.). U: Yahia E.M. (ur.) Fruit and vegetable phytochemicals: chemistry and human health. SAD, Wiley, str. 1145-1162.

Pignattelli S., Broccoli A., Renzi M. (2020): Physiological responses of garden cress (*L. sativum*) to different types of microplastics. The Science of The Total Environment 727(9):138609.

Rajput V.D., Harish, Singh R.K., Verma K.K., Sharma, L., Quiroz-Figueroa F.R., Meena M., Gour V.S., 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.

Rillig M.C., Lehmann A., de Souza Machado A.A., Yang G. (2019): Microplastic effects on plants. New Phytologist 223(3):1066-1070.

Roy T., Dey T.K., Jamal M. (2022): Microplastic/nanoplastic toxicity in plants: an imminent concern. Environmental Monitoring and Assessment 195(1):27.

Schwab F., Zhai G., Kern M., Turner A., Schnoor J.L., Wiesner M.R. (2016): Barriers, pathways and processes for uptake, translocation and accumulation of nanomaterials in plants – Critical review. Nanotoxicology 10(3):257-278.

Sharma P., Jha A.B., Dubey R.S., Pessarakli M. (2012): Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. Journal of Botany 2012:1-26.

Shi R., Liu W., Lian Y., Wang Q., Zeb A., Tang J. (2022): Phytotoxicity of polystyrene, polyethylene and polypropylene microplastics on tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Journal of Environmental Management 317:115441.

Sies H., Jones D.P. (2020): Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. Nature Reviews Molecular Cell Biology 21:63-383.

Spanò C., Muccifora S., Ruffini Castiglione M., Bellanic L., Bottega S., Giorgetti L. (2022): Polystyrene nanoplastics affect seed germination, cell biology and physiology of rice seedlings in-short term treatments: evidence of their internalization and translocation. Plant Physiology and Biochemistry 172:158-166.

Stephenie S., Chang J.P., Gnanasekaran A., Esa N.M., Gnanaraj C. (2020): An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. *Journal of Functional Foods* 68:103917.

Sun X.D., Yuan X.Z., Jia Y., Feng L.J., Zhu F.P., Dong S.S., Liu J., Kong X., Tian H., Duan J.L., Ding Z., Wang S.G., Xing B. (2020): Differentially charged nanoplastics demonstrate distinct accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Nanotechnology* 15:755-760.

Štefan L., Tepšić T., Zavidčić T., Urukalo M., Tota D., Domitrović R. (2007): Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina* 43:84-93.

Thushari G.G.N., Senevirathna J.D.M. (2020): Plastic pollution in the marine environment. *Heliyon* 6 (8):e04709.

Tuteja N., Ahmad P., Panda B.B., Tuteja R. (2009): Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutation Research* 681(2-3):134-149.

Wang P., Lombi E., Sun S., Scheckel K.G., Malysheva A., McKenna B.A., Menzies N.W., Zhao F.-J., Kopittke P.M. (2017): Characterizing the uptake, accumulation and toxicity of silver sulfide nanoparticles in plants. *Environmental Science Nano* 4:448-460.

Wojnowska-Baryła I., Bernat K., Zaborowska M. (2022): Plastic waste degradation in landfill conditions: the problem with microplastics, and their direct and indirect environmental effects. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 19(20):13223.

Xie X., He Z., Chen N., Tang Z., Wang Q., Cai Y. (2019): The roles of environmental factors in regulation of oxidative stress in plant. *Biomed Research International* 4:1-11.

Xiong Y.L., Guo A. (2020): Animal and plant protein oxidation: chemical and functional property significance. *Foods* 10(1):40.

Yekeen T. A., Azeez M. A., Lateef A., Asafa T. B. Oladipo I. C., Badmus J. A., Adejumo S.A., Ajibola A. A. (2017): Cytogenotoxicity potentials of cocoa pod and bean-mediated green synthesized silver nanoparticles on *Allium cepa* cells. *Caryologia* 70(4):366-377.

Yin H., Xu L., Porter N.A. (2011): Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chemical Reviews* 111(10):5944-72.

Yuzugullu Karakus Y., Acemi A., Isik S., Duman Y. (2017): Purification of peroxidase from *Amsonia orientalis* by three-phase partitioning and its biochemical characterization. *Separation Science and Technology* 53(5):756-766.

Zhou C.Q., Lu C.H., Mai L., Bao L.J., Liu L.Y., Zeng E.Y. (2021): Response of rice (*Oryza sativa* L.) roots to nanoplastic treatment at seedling stage. *Journal of Hazardous Materials* 401:123412.

Internetski izvor:

Plastics Europe

(pristupljeno: travanj 2024.)

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 20.09.1997. godine u Zagrebu. Osnovnoškolsko obrazovanje stekla sam u Osnovnoj školi Banova Jaruga, a srednjoškolsko u Srednjoj školi Tina Ujevića u Kutini, smjer opća gimnazija. Preddiplomski sveučilišni studij Znanosti o okolišu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu upisala sam 2017. godine tijekom kojeg sam sudjelovala na događanju Dan i noć na PMF- u. Znanosti o okolišu interdisciplinarni je smjer koji objedinjuje znanja na području biologije, geologije, geografije i kemije. Diplomski sveučilišni studij Znanosti o okolišu upisala sam 2020. godine tijekom kojeg sam sudjelovala na simpozijima kao što su 4. Simpozij o invazivnim vrstama i Simpozij studenata bioloških usmjerenja. Dobitnica sam Rektorove nagrade za timski znanstveni i istraživački rad te koautor dva objavljena znanstvena rada. Tijekom studija stekla sam četverogodišnje radno iskustvo kao student, a kasnije i kao zaposlenik u vrtnom centru u odjelu marketinga.

Znanstveni radovi:

Biba R., Cvjetko P., Jakopčić M., Komazec B., Tkalec M., Dimitrov N., Begović T., Balen B. (2023): Phytotoxic effects of polystyrene and polymethyl methacrylate microplastics on *Allium cepa* roots. *Plants* 12(4):747.

Novoselec L., Židak L., Bošnjak A., Depolo A., Jakopčić M., Hudina S. (2024): Exploring the knowledge and application of biosecurity practices related to invasive alien species in field research in Croatia. *Journal for Nature Conservation* 80:126648.