Učinak stabilizacije nanočestica zlata i srebra tiolnim biomolekulama na njihovu toksičnost u vodenbuhi (Daphnia magna Straus, 1820)

Pasariček, Ema

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:900689

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Ema Pasariček

UČINAK STABILIZACIJE NANOČESTICA ZLATA I SREBRA TIOLNIM BIOMOLEKULAMA NA NJIHOVU TOKSIČNOST U VODENBUHI (*Daphnia magna* Straus, 1820)

Diplomski rad

Zagreb, 2017.

Ovaj rad je izrađen u Jedinici za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Ivane Vinković Vrček. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistre struke znanosti o okolišu (mag. oecol.).

Neizmjerno se zahvaljujem svojoj mentorici dr. sc. Ivani Vinković Vrček, s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, koja me usmjeravala te mi puno pomogla u izradi ovog diplomskog rada uz silno strpljenje i pažljivost.

Htjela bih se zahvaliti i mr. sc. Lei Ulm, s Nastavnog zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“, za sve što me naučila u Laboratoriju za ekotoksikologiju, stručnoj pomoći u izradi ovog diplomskog rada i iznimnoj susretljivosti. Dužna sam se zahvaliti i gđi Nevenki Šimek, iz istog Laboratorija, na velikoj pomoći pri iscrpnom radu s vodenbuhama te prijateljskom pristupu.

Zahvaljujem se i svojoj suvoditeljici diplomskog rada, doc. dr. sc. Anamariji Štambuk na inzistiranju da ovaj rad poprimi profesionalne crte i velikoj količini strpljenja unatoč mojoj brzopletosti.

Tei Crnković, Marti Mikulčić i Mislavu Oreškoviću, svojim prijateljima, zahvaljujem na svim važnim informacijama vezanim uz izradu i prijavu diplomskog rada, pomoći i podršci.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek Diplomski rad

UČINAK STABILIZACIJE NANOČESTICA ZLATA I SREBRA TIOLNIM BIOMOLEKULAMA NA NJIHOVU TOKSIČNOST U VODENBUHI (*Daphnia magna* Straus, 1820)

Ema Pasariček

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Vodenbuha (*Daphnia magna* Straus, 1820) je planktonski račić koji se koristi kao modelni organizam u validiranim metodama ekotoksikoloških testiranja. U ovom smo istraživanju koristili vodenbuhu kao testni organizam za ispitivanje ekotoksičnosti nanočestica zlata i srebra koje su bile stabilizirane tiolnim omotačima (glutation i/ili cistein). Učinke nanočestica srebra i zlata usporedili smo s ekotoksičnim učincima njihovih ionskih oblika (Ag^+ i Au^{3+}). Osim određivanja preživljenja vodenbuha nakon tretmana s nano i ionskim oblicima srebra i zlata, mjerili smo i razine biomarkera oksidativnog stresa (superoksid radikala, peroksidnog radikala i glutationa) primjenom fluorescentnih proba dihidroetidija, diklorodihidroflourescein diacetata i monoklorobimana. Cilj ovog rada bio je utvrditi smanjuje li tiolna stabilizacija nanočestica zlata i srebra njihov ekotoksični učinak. Akutni test toksičnosti je pokazao veću toksičnost ionskih oblika zlata i srebra u odnosu na nanozlato i nanosrebro. Ionsko srebro je najtoksičnija vrsta, u skladu s prijašnjim istraživanjima. Rezultati istraživanja pokazali su kako je glutationski omotač toksičniji od cisteinskog omotača. Nanozlato se nije pokazalo toksičnim. Rezultati upotrebe fluorescentnih proba ukazali su na prisutnost oksidativnog stresa u vodenbuhama. Vrsta Ag^+ je pokazala višu razinu oksidativnog stresa od vrste Au^{3+}. Opažena je dinamika između superoksidnih i peroksidnih radikala kod proba diklorodihidroflourescein diacetat i dihidroetidij. Naposljetku, nanosrebro stabilizirano glutationom pokazalo je najvišu razinu oksidativnog stresa.

(39 stranica, 24 slike, 2 tablice, 61 literaturni navod, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: nanočestice zlata, nanočestice srebra, *Daphnia magna*, oksidativni stres
Voditeljica: dr. sc. Ivana Vinković Vrček, viša znanstvena suradnica
Suvoditeljica: doc. dr. sc. Anamaria Štambuk
Ocjenitelji: doc. dr. sc. Anamaria Štambuk, izv. prof .dr. sc. Sandra Radić Brkanac,
izv. prof. dr. sc. Alan Moro, izv. prof. dr. sc. Nenad Buzjak
Rad prihvaćen: 2. veljače 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Division of Biology

Graduation thesis

EFFECT OF THIOL BIOMOLECULES STABILIZATION OF GOLD AND SILVER NANOPARTICLES TOXICITY TO WATER FLEA (*Daphnia magna* Straus, 1820)

Ema Pasariček

Rooseveltov trg 6, 10 000 Zagreb, Croatia

Water flea (*Daphnia magna* Straus, 1820) is a planktonic crustacean used as a model organism in validated methods in ecotoxicology research. In this research, we used water flea as a test organism to assess ecotoxicity of gold and silver nanoparticles stabilized with thiol biomolecules (gluthatione and/or cysteine). We compared the effects of gold and silver nanoparticles with ecotoxicological effects of their ionic forms (Ag^{+} and Au^{3+}). Besides determining the survival of water fleas after the treatment with nano and ionic forms of gold and silver we, also measured levels of oxidative stress biomarkers (superoxide radical, peroxide radical and gluthatione) by using fluorescent probes dihydroethidium, dichloro-dihydro-fluorescein diacetate and monochlorobimane. The aim of this study was to ascertain whether thiol stabilization of gold and silver nanoparticles decreases their ecotoxicological effect. Results obtained in acute toxicity testing showed greater toxicity when water fleas were exposed to ionic forms of gold and silver than when exposed to nanogold and nanosilver. Ionic silver exhibited the greatest toxicity which goes in accordance with previous research. Gluthatione coating showed greater toxicity than cysteine coating. However, nanogold showed no toxicity whatsoever. Results obtained in reactive oxygen species (ROS) assay indicated oxidative stress in water fleas when exposed to each fluorescent probe. Ionic silver showed greater level of oxidative stress than ionic gold. Furthermore, the dynamics between superoxide and peroxide radical were observed when using probes dichloro-dihydro-fluorescein diacetate and dihydroethidium. Finally, nanosilver stabilized with gluthatione showed the greatest level of oxidative stress.

(39 pages, 24 figures, 2 tables, 61 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library
Key words: gold nanoparticles, silver nanoparticles, *Daphnia magna*, oxidative stress
Supervisor: dr. sc. Ivana Vinković Vrček, Senior research associate
Assistant Supervisor: doc. dr. sc. Anamaria Štambuk, Assistant professor
Reviewers: doc. dr. sc. Anamaria Štambuk, izv. prof .dr. sc. Sandra Radić Brkanac,
izv. prof. dr. sc. Alan Moro, izv. prof. dr. sc. Nenad Buzjak
Thesis accepted: February 2, 2017

POPIS KRATICA

Au	zlato (od lat. *Aurus*)
Ag	srebro (od lat. *Argentum*)
AgNP	nanočestice srebra
AuNP	nanočestice zlata
CYS	cistein
GSH	glutation
$HAuCl_4$	zlatni hidroklorid (kloroaurična kiselina)
$AgNO_3$	srebrov nitrat (srebrov(I) nitrat)
SM	standardni medij za kulture (od eng. *Standard Medium*)
CYSnanoAg	nanočestice srebra stabilizirane cisteinom
GSHnanoAg	nanočestice srebra stabilizirane glutationom
CYSnanoAu	nanočestice zlata stabilizirane cisteinom
GSHnanoAu	nanočestice zlata stabilizirane glutationom
DCFH-DA	diklorodihidrofluorescein diacetat (od eng. *dichlorodihydrofluorescein diacetate*)
DHE	dihidroetidij (od eng. *dihydroethidium*),
mBCl	monoklorobiman (od eng. *monochlorobimane*)
PBS	fosfatni pufer (od eng. *Phosphate Buffered Saline*)
EC_{50}	efektivna koncentracija koja uzrokuje smrtnost 50% populacije (od eng. *Half maximal effective concentration*)
CI	interval pouzdanosti (od eng. *Confidence Interval*)
LOAEL	najmanja koncentracija koja uzrokuje odgovor testne populacije (od eng. *Lowest observed adverse effect level*)
NOAEL	najveća koncentracija pri kojoj nema vidljivog odgovora u testnoj populaciji (od eng. *No observed adverse effect level*)
ROS	reaktivne vrste kisika (od eng. *Reactive Oxygen Species*)

SADRŽAJ

1. UVOD ... 1
1.1. Nanotehnologija ... 1
1.2. Nanočestice ... 1
1.2.1. Nanočestice srebra ... 3
1.2.2. Nanočestice zlata ... 4
1.3. Stabilizacijski omotači nanočestica ... 6
1.3.1. Glutation…. ... 6
1.3.2. Cistein…… ... 7
1.4. Oksidativni stres ... 8
1.5. Ekotoksikološka istraživanja nanočestica ... 9
1.5.1. Vodenbuha kao modelni organizam ... 11
2. CILJ ISTRAŽIVANJA ... 14
3. MATERIJALI I METODE ... 15
3.1. Metode sinteze nanočestica ... 15
3.1.1. Sinteza nanočestica zlata i srebra ... 16
3.2. Metode karakterizacije nanočestica ... 16
3.2.1. Atomska apsorpcijska spektroskopija ... 16
3.2.2. Dinamičko raspršenje svjetlosti ... 17
3.2.3. Elektroforetsko raspršenje svjetlosti ... 18
3.2.4. Transmisijska elektronska mikroskopija ... 19
3.3. Priprema otopina i fluorescentnih proba ... 19
3.4. Akutni test toksičnosti ... 20
3.5. Mjerenje razine biomarkera oksidativnog stresa ... 21
3.5.1. Dikloro-dihidro-fluorescein diacetat ... 21
3.5.2. Dihidroetidij ... 22
3.5.3. Monoklorobiman ... 22
3.5.4. Postupak određivanja razine oksidativnog stresa u vodenbuhama ... 23
3.6. Statistička obrada podataka ... 23
4. REZULTATI ... 24
4.1. Karakteristike nanočestica srebra i zlata ... 24
4.2. Akutni test toksičnosti nakon 24 i 48 h ... 26
4.3. Razine biomarkera oksidativnog stresa ... 24
4.3.1. Razina glutationa ... 24
4.3.2. Razina peroksidnih radikala ... 25
4.3.3. Razina superoksidnih radikala ... 27
5. RASPRAVA ... 30
6. ZAKLJUČAK ... 33
7. LITERATURA ... 34
8. ŽIVOTOPIS ... 37
9. PRILOZI ... 38

1. UVOD

1.1. Nanotehnologija

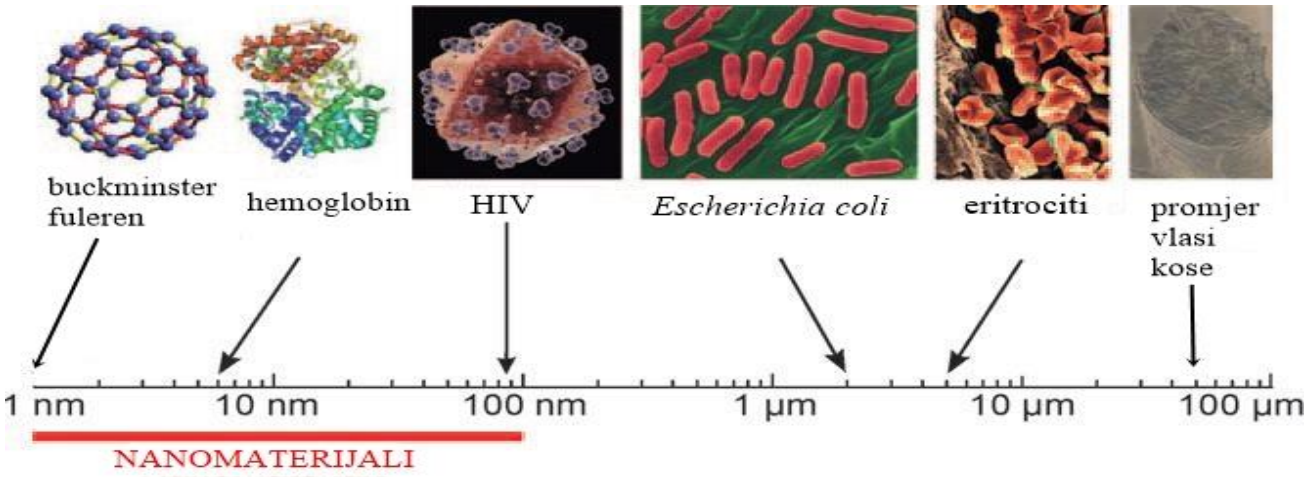
Nanotehnologija je grana tehnologije kojoj je cilj razvoj i istraživanje funkcionalnih materijala, struktura i uređaja nanometarskih dimenzija (1-100 nm) (Seetharam i Sridhar, 2007). Ova grana tehnologije je postigla gotovo revolucionarnu brzinu napretka te predstavlja obećavajuću budućnost tehnološkog napretka 21. stoljeća (Roco, 1999).

U svojem poznatom predavanju pod nazivom „*There's Plenty of Room at the Bottom*“, 1959. god., američki fizičar i dobitnik Nobelove nagrade, Richard Feynman, potaknuo je znanstvenu zajednicu na razmišljanje o potencijalnim mogućnostima manipulacije pojedinačnih atoma kako bi stvorili nove materijale nanodimenzija (Poole i Owens, 2003). Tada je pokrenuo novo razdoblje u znanosti i tehnologiji gdje je fokus stavljen na nanorazinu (Maynard i sur., 2006).

Nanočestice, nanotube, nanokompoziti, nanokristali, fulereni i dendrimeri neki su od primjera tvorevina nanotehnologije zbog svoje mnogostruke primjene u biotehnologiji, kozmetici, poljoprivredi, farmaceutskoj industriji, elektronici itd. Njihova ubrzana proizvodnja neminovno označava njihovu interakciju s biološkim sustavima te unos u okoliš. Stoga je važno provoditi istraživanja toksikoloških učinaka nanočestica, procjene njihovih rizika i sigurnosti za ljude, životinje i okoliš (Singh i Nalwa, 2007).

1.2. Nanočestice

Europska komisija, u svojem obraćanju Europskom parlamentu, Vijeću i Gospodarskom i socijalnom odboru 2013. god., je donijela izvještaj kojim nanomaterijale i nanočestice definira na sljedeći način: „*Nanomaterijal je definiran kao prirodni, slučajni ili proizvedeni materijal, koji sadržava čestice u nevezanom, agregiranom ili aglomeriranom stanju te u kojem 50% ili više čestica, u jednolikoj veličinskoj raspodjeli, ima jednu ili više vanjskih dimenzija u rasponu od 1 do 100 nm. U posebnim uvjetima, gdje postoji zabrinutost za okoliš, zdravlje, sigurnost ili kompetitivnost, granica od 50% se može pomaknuti na granicu od 1 do 50 %“* (Bondarenko i sur., 2013). U svrhu lakšeg shvaćanja nanodimenzija **Slika 1.** prikazuje odnose veličina poznatih tvari kao što su vlas kose, crvena krvna stanica (eritrocit), bakterija *Escherichia coli* (Migula, 1895), virus humane imunodeficijencije (HIV), hemoglobin te buckminsterfuleren u usporedbi s veličinom nanomaterijala.



Slika 1. Ljestvica veličine poznatih tvari u usporedbi s veličinama nanomaterijala (preuzeto i prilagođeno iz Feldmann i Goesmann, 2010).

Nanočestice imaju posebna fizičko-kemijska svojstva koja se mogu podijeliti u tri grupe: svojstva ovisna o površini čestica, svojstva ovisna o veličini čestica i kvantni učinci ovisni o veličini čestica.

Velika katalitička moć nanočestica-katalizatora, izuzetna kemijska reaktivnost nanočestica, Lotus učinak gdje se vlaga odbija od površine nanočestica te površinska provodljivost oksida nanočestica primjeri su svojstava ovisnih o površini čestica.

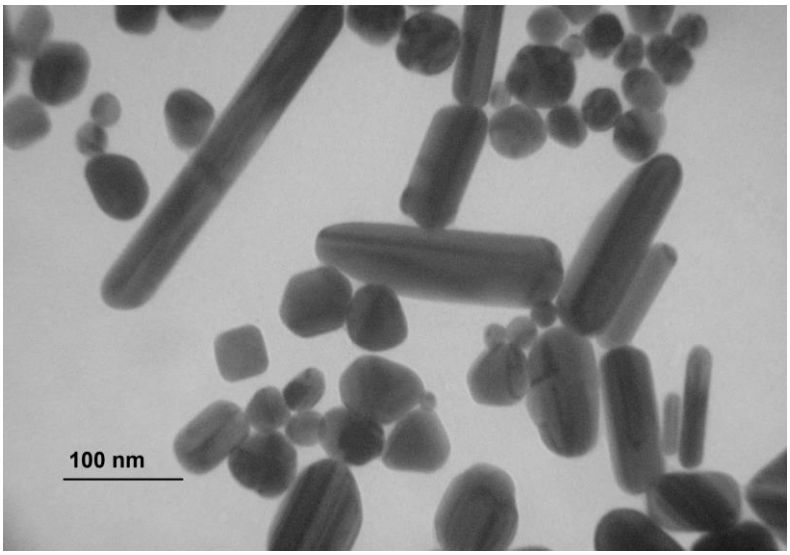
Optički transparentni slojevi (npr. pigmenti, tankoslojne elektrode), interferencijski učinci, superparamagnetizam nanočestica neki su od primjera svojstava ovisnih o veličini čestica.

Kvantni učinci ovisni o veličini čestica su pojave kada elektronske strukture nanočestica ovise o njihovoj veličini. Oni se događaju pri prijelazu atoma ili molekula, točno određenih razina energije, u raspršene sastave atoma. Pomak plazmonske resonance nanočestica zlata te boja i luminiscencija kvantnih točaka-poluvodiča ovisnih o veličini čestica dva su primjera tih učinaka (Feldmann i Goesmann, 2010).

Sve nabrojano pokazuje značaj i mnogostruke prednosti nanočestica za znanstvena istraživanja i boljitak tehnologije. Stoga ne čudi što se već upotrebljavaju ili istražuju za sljedeće: interakcije nanočestica i biomolekula, biosenzore (kolorimetrijske, fluorescentne, elektrokemijske), sustave za primjenu lijekova, oslikavanje u biomedicini itd. (De i sur., 2008).

1.2.1. Nanočestice srebra

Nanočestice srebra (**Slika 2**.) su poznate po svojim antimikrobnim svojstvima zbog čega se danas upotrebljavaju u raznim proizvodima gotovo bez zadrške unatoč malom broju istraživanja o njihovom utjecaju na okoliš (Blinova i sur., 2013). Uz antimikrobna, katalitička i plazmonska svojstva, čine ih jednim od najkorištenijih, proizvedenih nanočestica u potrošačkim proizvodima i medicinskoj primjeni (Ulm i sur., 2015). Kako bi jasnije prikazala ovu pojavu, baza podataka „Woodrow Wilson" nabrojala je 1317 proizvoda na bazi nanosrebra na današnjem tržištu. Od tog broja 311 ih sadrži same nanočestice srebra. Također, prema provedenom istraživanju godišnje se u svijetu proizvede približno 500 t nanosrebra (Blinova i sur., 2013).



Slika 2. Fotografija nanočestica srebra stabiliziranih citratom snimljena primjenom transmisijske elektronske mikroskopije.

Upravo zbog njihove široke upotrebe one dolaze u okoliš putem otpadnih voda, iz odlagališta otpada ili iz industrijskih postrojenja (Stensberg i sur., 2014). Stoga je nužno prikupiti relevantne znanstvene informacije o njihovom utjecaju na zdravlje ljudi i okoliš. Većina istraživanja vezanih uz nanosrebro se još uvijek provodi na bakterijama, posebno *Escherichia coli* radi njegovog poželjnog antibakterijskog svojstva u svrhu primjene, a ne radi procjene rizika (Blinova i sur., 2013). Međutim,

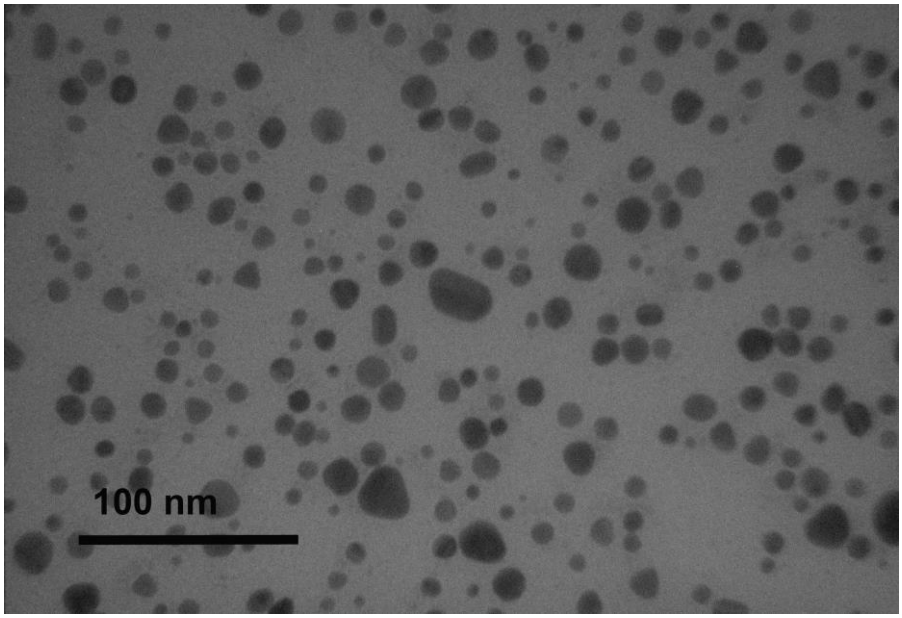
sve veći broj istraživanja usmjeren je prema ispitivanju učinka nanosrebra na različite organizme, posebno vodene kralješnjake, beskralješnjake i biljke (Ulm i sur., 2015).

Nakupljanje nanosrebra u okolišu uslijed sve veće primjene proizvoda koji sadrže srebrne nanočestice još je jedan razlog za brigu i potiče znanstvenike da proučavaju mehanizme njihove moguće toksičnosti. Pri ovakvim istraživanjima uobičajeno se toksičnost nanosrebra uspoređuje s toksičnosti ionskog oblika srebra. Razlog leži u činjenici da se antibakterijsko djelovanje nanosrebra temelji upravo na kontinuiranom otpuštanju iona srebra s površine nanosrebra. Do sada je u znanstvenoj literaturi opisano da nanosrebro izaziva genotoksičnost, potiče apoptoze (kontrolirane stanične smrti) te izaziva oksidativni stres. Značajan broj autora ovakvo djelovanje pripisuje ionima srebra koji se oslobađaju s površine nanosrebra te se taj mehanizam naziva mehanizmom „Trojanskog konja“. Međutim, još uvijek nema dovoljno znanstvenih podataka iz kojih se sa sigurnošću može utvrditi točan mehanizam toksičnosti nanosrebra.

U budućnosti, veći broj istraživanja na biološkim i okolišnim učincima nanočestica pomoći će razumijevanju njihovog akutnog kao i kroničnog učinka na zdravlje ljudi i ekološke sustave (Stensberg i sur., 2014).

1.2.2. Nanočestice zlata

Elementarno zlato odlikuje inertnost, mala toksičnost i biokompatibilnost. Na nanorazini se ovakva, pozitivna slika ipak mijenja. Nanočestice zlata (**Slika 3.)** predmet su kontradiktornih rezultata više istraživanja budući da velik broj studija pokazuje netoksičnost nanozlata, ali značajan broj govori u prilog njihovoj toksičnosti. Neovisno o varijabilnosti dostupnih podataka, općeprihvaćeno je mišljenje kako su nanočestice zlata toksične u *in vitro* i *in vivo* uvjetima (Fratoddi i sur., 2014).



Slika 3. Fotografija nanočestica zlata stabiliziranih citratom snimljena primjenom transmisijske elektronske mikroskopije.

Nanočestice zlata su vrlo stabilne metalne nanočestice što im daje određenu prednost u odnosu na druge metalne nanočestice (Daniel i Astruc, 2004). Uz stabilnost, mogućnost manipuliranja veličinom čestica omogućava stvaranje raznolikih oblika (npr. nanokapsula i nanoštapića) dok mogućnost površinske stabilizacije otvara put dizajna ovih nanočestica u različite svrhe (Fratoddi i sur., 2014). Nanočestice zlata nisu podložne otapanju ili značajnim promjenama veličine i oblika pri tipičnim okolišnim ili biološkim uvjetima (Bozich i sur., 2014). Zbog svih tih svojstava, nanočestice zlata se već uvelike koriste u raznim područjima znanosti, tehnologije te posebice u medicini, kako u terapijskim tako i u dijagnostičkim sustavima (Fratoddi i sur., 2014). Nalaze se i na Listi proizvedenih nanomaterijala (*„List of Representative Manufactured Nanomaterials "*) koji bi trebali izaći ili već jesu na tržištu, predstavljenoj od strane Organizacije za ekonomsku suradnju i razvoj (OECD - od eng. *Organisation for Economic Cooperation and Development*) (Skjolding i sur., 2014).

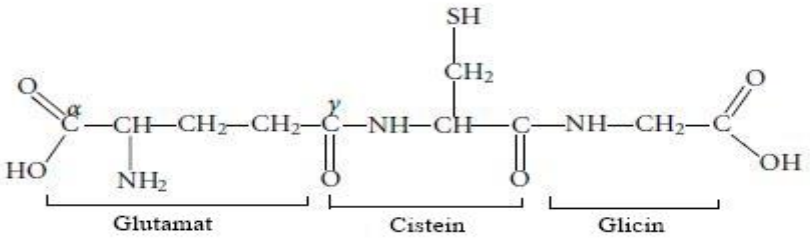
Zbog naglog rasta tržišta nanomaterijala, važno je povećati količinu znanja o njihovim biološkim učincima i mogućem toksičnom djelovanju (Alkilany i Murphy, 2010).

1.3. Stabilizacijski omotači nanočestica

Primijećeno je kako biološki i okolišni učinak metalnih nanočestica ovisi o prirodi stabilizacijskog omotača (Jurašin i sur., 2016). Stabilizacijski omotači označavaju modifikacije površine nanočestica tako što se površina nanočestica oblaže različitim molekulama koje onda određuju identitet i svojstva takvih modificiranih nanočestica (Bozich i sur., 2014). Osim što takva stabilizacija površine povećava stabilnost nanočestica kako ne bi došlo do njihova nakupljanja (aglomeracije), ona može doprinijeti i povećanju biokompatibilnosti nanočestica. U biološkim otopinama proteini se obično vežu za površinu nanočestica uslijed djelovanja elektrostatskih, raspršujućih i kovalentnih sila pa nastaje tzv. proteinska kruna (*korona*). Istraživanja pokazuju kako priroda i koncentracija tih proteina utječu na ulazak nanočestica u biološke sustave, na njihovu biodistribuciju, a može dovesti i do neželjenih nuspojava. Različiti omotači mogu čak utjecati na citotoksičnost i površinski naboj nanočestica (Jurašin i sur., 2016). Pomoću različitih tehnika, nanočestice se mogu stabilizirati različitim ligandima kao što su male molekule, surfaktanti (površinski aktivne tvari), dendrimeri, polimeri i biomolekule. Biomolekule su značajne, u odnosu na sintetičke materijale, zato što mogu služiti kao učinkovita dostava biomolekula na ciljano mjesto bez povećanja citotoksičnosti (Mout i sur., 2012).

1.3.1. Glutation

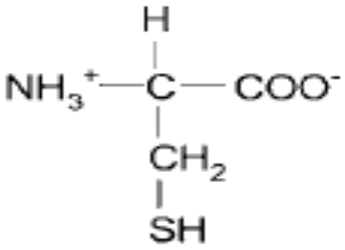
Glutation (GSH), čija je kemijska struktura prikazana na **Slici 4.**, je tripeptid sastavljen od glutaminske kiseline, cisteina i glicina. Najvažnija funkcija GSH je antioksidativna aktivnost u biljnim i životinjskim stanicama. Sintetizira se u citosolu stanica i prenosi u različite unutarstanične organele gdje je potreban (Lushchak, 2011). U molekuli glutationa, cistein sadrži vrlo reaktivnu tiolnu skupinu (-SH), koja omogućuje reduciranje metalnih soli. Uz -SH skupinu, glutation se sastoji i od amino ($-NH_2$) i karboksilnih (-COOH) funkcionalnih skupina preko kojih se ova molekula može povezivati s drugim molekulama. Već je ranije pokazano da se GSH može vrlo učinkovito primijeniti kao stabilizacijski omotač nanočestica (Balavandy i sur., 2014).



Slika 4. Kemijska struktura tripeptida glutationa (preuzeto i prilagođeno iz Lushchak, 2011).

1.3.2. Cistein

Cistein, čija je kemijska struktura prikazana na **Slici 5.**, je aminokiselina koja spada u skupinu aminokiselina koje sadrže sumpor. U toj skupini se nalaze još i metionin, taurin i hemocistein. Cistein i metionin su značajni, jer su jedine aminokiseline iz te skupine koje se ugrađuju u proteine. Aminokiseline koje sadrže sumpor su zanimljive, jer je sumpor elektronegativniji od kisika (s kojim dijeli pripadnost istoj skupini periodnog sustava elemenata) što takve aminokiseline čini manje hidrofobnima (Brosnan i Brosnan, 2006). Uz to, tiolna skupina cisteina doprinosi velikoj reaktivnosti ove molekule pa ona ima razne funkcije u organizmima: katalitička, regulacijska funkcija, stabilizacija struktura i vezanje kofaktora (Marino i Gladyshev, 2012). Uz već nabrojane povoljne karakteristike, otkriveno je i kako cistein bolje stabilizira površinu nanočestica nego druge korištene molekule s tiolnim skupinama što dovodi do povećane luminiscencije takvih nanočestica. K tome, njegove biološki aktivne, terminalne skupine imaju potencijal za ciljanje određenih stanica što ga čini povoljnom molekulom za istraživanje i stabilizaciju nanočestica (Chatterjee i sur., 2006).

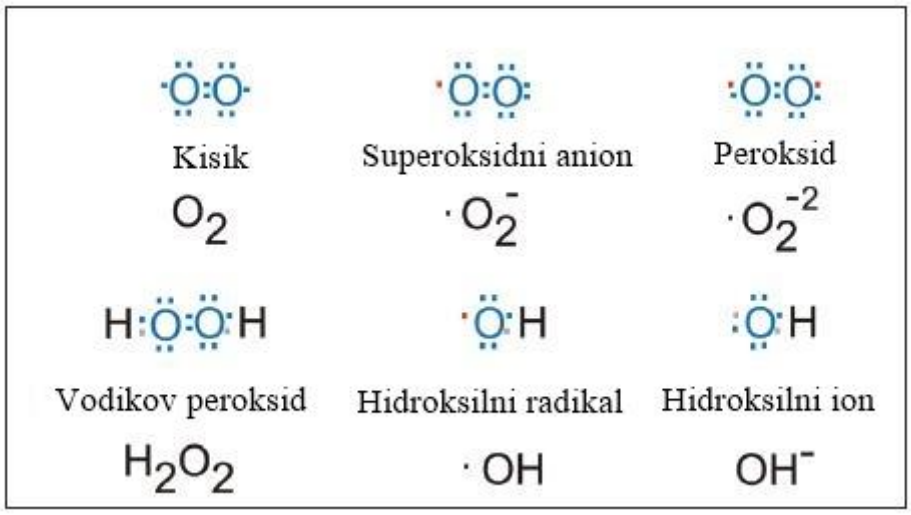


Slika 5. Kemijska struktura molekule cisteina (preuzeto iz Brosnan i Brosnan, 2006).

1.4. Oksidativni stres

Kisik omogućava odvijanje aerobnog metabolizma putem oksidativne fosforilacije u mitohondrijima što stanicama daje energiju. Međutim, naglom ili prevelikom potrošnjom kisika u stanicama nastaju slobodni radikali koji se još nazivaju i reaktivnim kisikovim vrstama (ROS, od eng. *Reactive Oxygen Species*), a u svojoj vanjskoj elektronskoj ljusci imaju barem jedan nespareni elektron. Takvi radikali su štetni, jer mogu reagirati s makromolekulama (npr. DNK) i izazvati štetne promjene u njihovoj strukturi ili pak dovesti do lipidne peroksidacije, tj. oksidacije polinezasićenih masnih kiselina u staničnim membranama što dovodi do smanjene fluidnosti staničnih membrana (Kerksick i Willoughby, 2005). U stanicama postoje zaštitni mehanizmi koji se bore protiv slobodnih radikala pa su pri normalnim fiziološkim uvjetima procesi u kojima nastaju radikali uravnoteženi s antioksidacijskim procesima koji sprečavaju njihovo stvaranje (Lushchak, 2011).

Najčešće ROS vrste su superoksidni radikal, hidroksilni radikal, vodikov peroksid, dušikov oksid, lipidni alkoksil i peroksilni radikal (**Slika 6.**). Superoksidni radikal često nastaje tijekom oksidativne fosforilacije, a za njegovo uklanjanje zaslužni su enzimi superoksid dismutaze. Vodikov peroksid nastaje iz superoksidnog radikala, a uvrštava se u ROS vrste, jer iz njega lako nastaje hidroksilni radikal. Glavna razlika između vodikovog peroksida i ostalih radikala je ta što on može prolaziti kroz staničnu membranu što ga čini još opasnijim. Međutim, enzim katalaza razgrađuje veliku količinu vodikovog peroksida koji se nađe unutar stanica stvarajući molekulu vode kao nusprodukt. Hidroksilni radikal, koji može nastati iz vodikovog peroksida, najopasniji je slobodni radikal zbog svoje velike reaktivnosti. U prisutnosti prijelaznih metala, poput iona bakra ili željeza, može napraviti izravnu štetu na proteinima, lipidima ili nukleinskim kiselinama (Kerksick i Willoughby, 2005).



Slika 6. Primjeri najčešćih vrsta radikala kisika (preuzeto i prilagođeno iz Held, 2015).

Razni enzimi i biomolekule unutar organizama imaju funkciju obrane od slobodnih radikala. Oni se još nazivaju i antioksidansima. Enzimi superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza i glutation S-transferaza primjeri su antioksidativnih enzima. Glutation je tripeptid koji ima važnu antioksidativnu ulogu zbog izravnih reakcija s različitim reaktivnim vrstama, ali i sa spojevima nastalim tijekom lipidne peroksidacije (Lushchak, 2011). Zaštitni mehanizmi vrlo uspješno brane organizam od ROS vrsta kada stanice nisu pod prevelikim stresom. Međutim, kada su stanice izložene previsokim koncentracijama štetnih kemikalija ili kroz duže vrijeme, antioksidativni obrambeni sustav u stanicama se nije u stanju oduprijeti stvaranju velikog broja radikala te nastaje stanje tzv. oksidativnog stresa (Kerksick i Willoughby, 2005).

1.5. Ekotoksikološka istraživanja nanočestica

Ekotoksikološka istraživanja nanočestica uglavnom se provode na jednostavnim modelnim sustavima kao što su stanične kulture ili jednostanični organizmi. Mnogo je manje istraživanja provedeno na višim organizmima poput vodozemaca, gmazova i ptica ili viših biljaka. Unatoč velikom broju objavljenih istraživanja na ekotoksikološkim učincima nanočestica još uvijek je mnogo nepoznanica o mehanizmu njihova djelovanja. Manjkavi su podaci o mehanizmima transporta i biodegradacije nanočestica ili njihova djelovanja s biološkim materijalima koji bi ih mogli eliminirati (Seetharam i Sridhar, 2006). Znanstvenici su ostavili otvorenom i mogućnost biomagnifikacije nanočestica u hranidbenom lancu (Nowack i Bucheli, 2007; Fabrega i sur., 2011). Iz do sada objavljenih

znanstvenih podataka očigledno je da sintetizirane nanočestice potiču oksidativni stres, štetno djeluju na stanične membrane i nukleinske kiseline, destabiliziraju i oksidiraju proteine i utječu na otpuštanje toksičnih tvari. U stanice mogu ući difuzijom, endocitozom ili adhezijom, no ne i ionskim transportom zbog svoje veličine (Bhatt i Tripathi, 2011).

Istraživanja na ekotoksikološkim učincima nanočestica srebra pokazuju kako one negativno utječu na razvoj riba u ranim stadijima i uzrokuju deformacije leđne moždine, aritmiju te nakupljanje čestica u škrgama i jetrenom tkivu (i time smanjuju sposobnost ribe da se odupre niskim koncentracijama kisika i dovode do oksidativnog stresa). Mlade jedinke zebrice (*Danio rerio* Hamilton, 1822) i japanske medake (*Oryzias latipes* Temminck i Schlegel, 1846) pokazale su veću toksičnost nano u odnosu na ionski oblik srebra. Mali broj istraživanja provedenih na algama pokazao je kako nanoAg nije toksično u koncentracijama koje se smatraju dovoljnima za onečišćenje vodenih sustava; i to na alge *Chlamydomonas reinhardtii* (P. A. Dangeard, 1888) i *Thalassiosira weissflogii* ((Grunow) G. Fryxell i Hasle, 1977). Drugo istraživanje je kod vrste *Chlamydomonas reinhardtii* ukazalo na to da je, za tu algu nanoAg toksičnije nego ista količina ionskog srebra. Vrsta *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1900) je podložna smanjenju reprodukcijskog potencijala i oksidativnom stresu kada je izložena nanoAg dok je ono za trepetljikaša-papučicu (*Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1833) toksično kada je stabilizirano neionskim surfaktantom Tween 80. Istraživanja na mikrobima su kontradiktorna. Jedna smatraju kako su veličina i oblik nanoAg zaslužni za toksičnost, a druga kako glavni toksični učinak potječe od otpuštenih iona srebra. S obzirom na brojne razlike između vrsta bakterija teško je donijeti općeniti zaključak iz dobivenih informacija. Još jedan primjer to predočava. Istraživanja Kima i sur. (2007) su pokazala da su gram pozitivne bakterije otpornije na nanoAg manjih veličina dok su Yoon i sur. (2007) pokazali upravo suprotno za nanoAg većih čestica. Također, nanoAg se pokazalo toksičnijim za autotrofne bakterije, a ioni srebra za heterotrofne. Nadalje, izloženost estuarijskog sedimenta povećanim koncentracijama nanoAg kroz 30 dana nije utjecala na bakterijske zajednice, bioraznolikost i brojnost mikroorganizama u vodenom stupcu (Fabrega i sur., 2011).

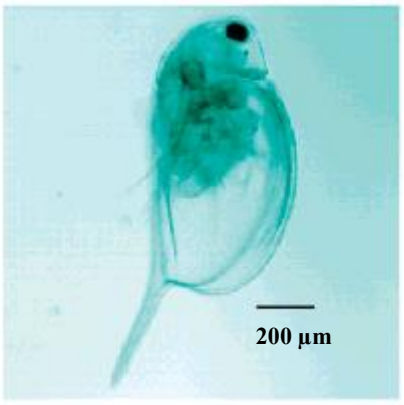
Podaci o toksičnosti nanočestica zlata (nanoAu) u istraživanju koje je je uspoređivalo učinke nanoAg i nanoAu na kalifornijsku pastrvu (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) pokazuju da je toksičnost bila ovisna o koncentraciji za obje vrste nanočestica. Plava dagnja (*Mytilus edulis* Linnaeus, 1758) nakupljala je nanoAu većinom u probavnom sustavu gdje je došlo i do lipidne peroksidacije. U algi *Scenedesmus subspicatus* (Chodat, 1926) nanoAu se pričvrstilo na staničnu membranu i uzrokovalo smetnje u protoku tvari kroz membranu. NanoAu primijenjeno na ovoj vrsti bioakumuliralo se nakon sedam dana u školjkašu krupnorebrastoj kotarici (*Corbicula fluminea* Müller, 1774), i to u škržnim i probavnim epitelnim stanicama gdje je došlo do povećanja razine metalotioneina i oksidativnog stresa

(Lapresta-Fernández i sur., 2012). Kako je vidljivo iz svega navedenog, ekotoksikološka istraživanja na metalnim nanočesticama često su kontradiktorna i nedostatna pa je nužno prikupiti što više dodatnih i sustavnih znanstvenih informacija o mogućim učincima nanomaterijala u ekosustavima.

1.5.1. Vodenbuha kao modelni organizam

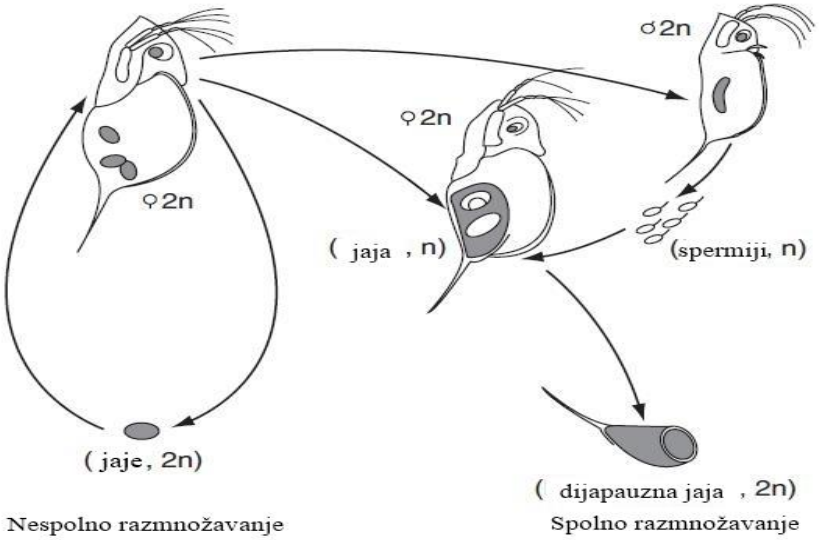
Modelni organizmi su sastavni dio većine znanstvenih istraživanja. Oni se odabiru zbog karakteristika poput lakoće manipuliranja, niske cijene, kratkog generacijskog vremena i velike dostupnosti kako bi se proučavali određeni biološki procesi. Proučavanjem ovih organizama možemo saznati mnogo o njihovom međudjelovanju s biološkim sustavima i prenijeti saznanja na srodne organizme (Edison i sur., 2016).

Vodenbuha (*Daphnia magna* Straus, 1820) (**Slika 7.**) je organizam koji pripada potkoljenu rakova (Crustacea), podredu rašljoticalaca (Cladocera). Ovaj podred čine prvenstveno slatkovodni organizmi vrlo bitni kao dio zooplanktona. Obično su malih veličina od 0.2 do 6 mm u prosjeku (Forró i sur., 2008). Nekoliko vrsta vodenbuha ima segmentirano tijelo koje se sastoji od dvodijelnog oklopa, nazvanog *karapaks*. Također, imaju nekoliko parova udova koji se nazivaju *filopodima* na čijim krajevima su dlačice ili *sete*. Pomoću filopoda stvaraju struju vode koja im pomaže da zatim setama uhvate čestice hrane i primaknu ih ustima (Reynolds, 2011). Hrane se česticama hrane u rasponu veličina od 0.4 do 40 μm; obično algama, bakterijama, ali i organskim i anorganskim česticama (Baun i sur., 2008). K tome, imaju jedno složeno oko (Forró i sur., 2008). Na glavi imaju jedno jednosegmentirano ticalo (*uniramnu antenu*) te jedno dvosegmentirano ticalo (*biramnu antenu*). Nadalje, usni aparat im se sastoji od donje čeljusti (*mandibule*) i gornje čeljusti (*maksile*) koja je podijeljena na dva dijela. Prva maksila je razvijena i sadrži par seta dok je druga zakržljala. Posljednji segment tijela (*telzon*) „nosi“ dvije kandže te se na kraju tijela nalazi i završna bodlja (*terminalna; apikalna bodlja*) (Mittmann i sur., 2014).



Slika 7. Fotografija vodenbuhe (preuzeto i prilagođeno iz Roberts i sur., 2007).

Vodenbuhe se mogu razmnožavati na dva načina - spolno i nespolno - ovisno o okolišnim uvjetima (**Slika 8.**). Najčešće se razmnožavaju *partenogenezom* što podrazumijeva da ženke nespolno stvaraju diploidna jajašca iz kojih se većinom razvijaju ženke. Pri spolnom razmnožavanju, a ono je karakteristično za nepovoljne okolišne uvjete, ženke stvaraju haploidna jajašca koja oplođuju mužjaci (Harris i sur., 2011). Jajašca se razvijaju u *ležnom prostoru* koji se nalazi na leđnom dijelu ženkina tijela podno karapaksa (Mittmann i sur., 2014). Spolnim razmnožavanjem nastaje par jajašca obavijenih modificiranim karapaksom te nastaje struktura koja se naziva *epifija*. U toj strukturi jajašca preživljavaju nepovoljne uvjete. S druge strane, nespolnim razmnožavanjem nastaju jajašca koja nakon potpune *embriogeneze* (razvitak jajašca nakon oplodnje) ženka izbacuje iz ležnog prostora u okoliš. Ona se nazivaju *neonatima* te dalje razvijaju u odrasle jedinke (Harris i sur., 2011).



Slika 8. Životni ciklus vodenbuha (preuzeto i prilagođeno iz Shaw i sur., 2008).

Razlozi zbog kojih je vodenbuha odabrana kao modelni organizam u ekotoksikološkim istraživanjima su brojni. Najvažniji su možda njena velika brojnost, uloga u prehrambenom lancu te geografska distribucija. Rod *Daphnia* se može naći u šarolikim vodenim sustavima širom svijeta. Upravo ovo im je odredilo sudbinu kao indikatorske vrste slatkovodnih rijeka i ribnjaka gdje pad brojnosti te populacije ukazuje na okolišne probleme. Činjenica da se mogu razmnožavati nespolno isto je vrlo bitna, jer omogućava održavanje populacije istovrsne genetske podloge koje se mogu uspoređivati neovisno o vrsti tretmana korištenog u istraživanjima (Shaw i sur., 2008). S obzirom na prehranu fitoplanktonom i kratko generacijsko vrijeme vodenbuhe imaju visok populacijski rast. Njihovu ulogu u prehrambenom lancu karakteriziraju prehrana fitoplanktonom, učinak na kruženje hranjivih tvari i uloga plijena za sekundarne konzumente. Dinamika između vodenbuha i njihove hrane – fitoplanktona - određuje sezonsku prozirnost vode dok prehrana mikrobima određuje biomasu i strukturu mikrobnih zajednica. Vodenbuha je vrlo hranjiva, jer ima visok udio fosfora pa je plijen predatornim beskralješnjacima (*invertebratima*) i ribama koje se prehranjuju planktonom (*planktivornim ribama*) (Miner i sur., 2012). Također, imaju i velik ekonomski značaj. Naime, vodenbuhe se koriste u akvakulturi za prehranu riba ili kontroliranje brojnosti fitoplanktona, a mogu biti i prijenosnici parazita koji predstavljaju prijetnju zdravlju ljudi (Forró i sur., 2008).

Prema REACH (od eng. *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) regulativi, za sve kemikalije koje se na godišnjoj razini proizvode u količini većoj od jedne tone nužno je provesti ekotoksikološka ispitivanja. Važan segment takvih istraživanja je utjecaj takvih kemikalija na vodene sustave. Jedan od standardnih testova za takva ispitivanja jest HRN EN ISO 6341:2013 test „Određivanje inhibicije pokretljivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Test akutne toksičnosti“ (ISO 6341:1996+Cor 1:1998; EN ISO 6341:1996+AC:1998).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Glavni cilj istraživanja provedenih tijekom izrade ovog diplomskog rada bio je istražiti učinak stabilizacije površine nanočestica zlata i srebra s tiolnim biomolekulama (glutation i cistein) na njihovu toksičnost u vodenom okolišu primjenom standardiziranog ekotoksikološkog modela vodenbuhe.

Za postizanje glavnog cilja, poslužili su nam specifični ciljevi istraživanja koji su uključivali:

1) odrediti efektivnu koncentraciju koja uzrokuje smrtnost 50% populacije (EC_{50}), najmanju koncentraciju koja uzrokuje odgovor testne populacije (LOAEL, od eng. *Lowest Observed Adverse Effect Level*) te najveću koncentraciju pri kojoj nema vidljivog odgovora (NOAEL, od eng. *No Observed Adverse Effect Level*) nakon 24 i 48 h za svaki pojedini ispitivani nano i ionski oblik srebra i zlata na testni organizam vodenbuhe;

2) utvrditi razinu oksidativnog stresa u vodenbuhama tretiranim s različito stabiliziranim nanočesticama srebra i zlata mjerenjem biomarkera oksidativnog stresa: razine peroksidnih radikala, razine superoksid radikala te razine glutationa u tretiranim u usporedbi na kontrolne neonate vodenbuha;

3) usporediti toksični učinak nano oblika srebra i zlata s njihovim ionskim oblicima primjenom tretmana pomoću srebrovog nitrata i zlatnog hidroklorida.

Rezultati ovog istraživanja doprinijet će boljoj procjeni potencijalnih rizika primjene i uporabe nanočestica srebra i zlata na okoliš.

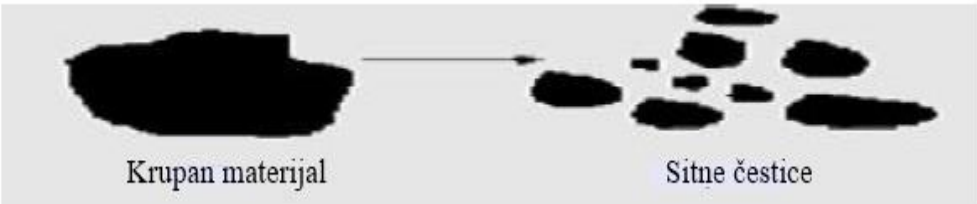
3. MATERIJALI I METODE

3.1. Metode sinteze nanočestica

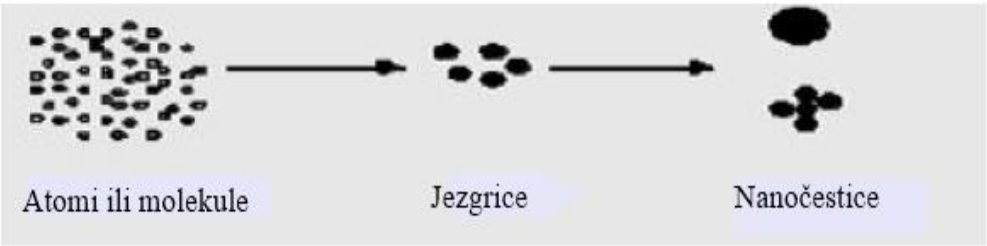
Sve korištene nanočestice sintetizirao je student Fran Ivanković s Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu. Sinteza nanočestica može se provesti pomoću dvije glavne metode. Nazivi tih metoda su *„top-down“* i *„bottom-up“*. Postoje i različite kategorije koje im se mogu pripisati ovisno o odabiru reaktanata pri sintezi, a to su konvencionalna ili nekonvencionalna metoda te zelena ili ne-zelena metoda (El-Badawy i sur., 2010).

„Top-down“ metoda (**Slika 9.**) uključuje stvaranje čestica ili materijala nanometarskih dimenzija iz veće količine istovrsnog materijala primjenom tehnika usitnjavanja (Daraio i Jin, 2012). Ovisno o materijalu, metode mogu biti mehaničke, kemijske, elektrokemijske (Singh i sur., 2010). Primjeri su fotolitografija i litografija elektronskim snopom (Daraio i Jin, 2012).

„Bottom-up“ metoda (**Slika 10.**) se temelji na stvaranju nanomaterijala preslagivanjem atoma ili molekula kroz nukleaciju i rast (El-Badawy i sur, 2010). Laserska piroliza te atomska ili molekularna kondenzacija primjeri su metoda koje se koriste u tu svrhu (Daraio i Jin, 2012).



Slika 9. Shematski prikaz „*top-down*“ metode (preuzeto i prilagođeno iz Singh i sur., 2010).

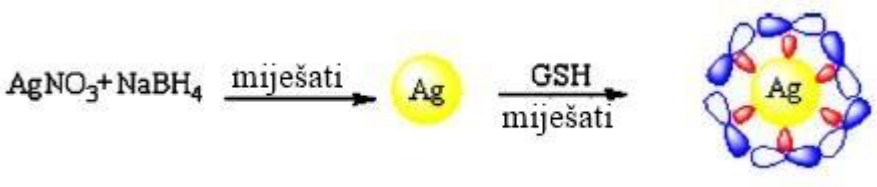


Slika 10. Shematski prikaz „*bottom-up*“ metode (preuzeto iz Singh i sur., 2010).

3.1.1. Sinteza nanočestica zlata i srebra

U istraživanju smo koristili nanočestica srebra i zlata obložene cisteinom i glutationom (CYS- i GSHnanoAg te CYS- i GSHnanoAu) koje su pripravljene prema modificiranom protokolu Anambige i sur. (2013), te Lia i sur. (2009). Sve nanočestice su pripravljene u laboratoriju Jedinice za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada, a pripravio ih je student Fran Ivanković.

U sintezama su korišteni $AgNO_3$, $HauCl_4$, $NaBH_4$, CYS, GSH i ultračista voda. $AgNO_3$ i $HAuCl_4$ služili su kao prekursori metalnih iona; $NaBH_4$ kao reducens; CYS i GSH kao stabilizatori te ultračista voda kao otapalo. Sinteza prikazana na **Slici 11.**, primjenjiva za sve ispitivane vrste, odvijala se na sljedeći način: u staklenu tikvicu koja je sadržavala 25 mL ultračiste vode postupno je dodavan prekursor metalnih iona ($AgNO_3$ ili $HAuCl_4$). Nakon dodatka prekursora dodan je reducens ($NaBH_4$) uz brzo miješanje tijekom 20 minuta. Sljedeći korak je bio postupno dodavanje stabilizatora. Reakcijska smjesa se neprekidno miješala na magnetskoj miješalici pri sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta (Ivanković, 2016).



Slika 11. Shematski prikaz sinteze nanočestica srebra (preuzeto i prilagođeno iz Li i sur., 2009).

3.2. Metode karakterizacije nanočestica

Sve korištene nanočestice okarakterizirao je student Fran Ivanković s Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu.

3.2.1. Atomska apsorpcijska spektroskopija

Atomska apsorpcijska spektroskopija (AAS-od eng. *Atomic Absorption Spectroscopy*) je instrumentalna metoda kojoj je cilj izmjeriti koncentraciju određenog kemijskog elementa u ispitivanom uzorku mjerenjem apsorbirane radijacije koju je kemijski element apsorbirao (García i Báez, 2012). Kako

bi bilo moguće izmjeriti koliko je svjetlosti kemijski element apsorbirao uzorak se prethodno mora atomizirati. Atomizacija se postiže dovođenjem toplinske energije uzorku koji se zatim razlaže na slobodne atome (Beaty i Kerber, 1993). Izvor toplinske energije je grafitna peć. Osnove metode temelje se na apsorpciji svjetlosti kemijskog elementa čiji elektroni prelaze iz osnovnog u pobuđeno stanje pri čemu emitiraju foton svjetlosti određene energije. Budući da atomi kemijskog elementa imaju specifičnu elektronsku strukturu samim time i apsorbiraju svjetlost točno određenih valnih duljina pa i imaju karakterističan spektar. Ovo svojstvo omogućava izračun koncentracije kemijskog elementa preko „Beer-Lambertovog zakona“, jer je apsorbancija proporcionalna koncentraciji elementa (García i Báez, 2012).

„Beer-Lambertov zakon“ je sljedeći:

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

gdje je I_0 intenzitet ulazne svjetlosti, I intenzitet izlazne svjetlosti, ε koeficijent molarne ekstinkcije, c molarna koncentracija te l duljina puta svjetlosti dok $\log (I_0/I)$ predstavlja apsorbanciju, A_λ, pri određenoj valnoj duljini, λ (Sheehan, 2009). Atomski apsorpcijski spektrometar naziv je uređaja koji se koristi pri ovoj metodi. Nakon što se uzorak atomizira plameno, izvor svjetlosti propušta svjetlost određenih valnih duljina preko monokromatora te se emitirana svjetlost detektira obično na fotomultiplikacijskoj cijevi. Ona pretvara svjetlosni signal u električni (García i Báez, 2012). Ova se metoda koristila za određivanje ukupne koncentracije Ag ili Au u pripravljenim suspenzijama nanoAg i nanoAu koje su korištene u ekotoksikološkim ispitivanjima na modelu vodenbuhe (Ivanković, 2016).

3.2.2. Dinamičko raspršenje svjetlosti

Dinamičko raspršenje svjetlosti - DLS (od eng. *Dynamic Light Scattering*) - je instrumentalna metoda koja se koristi kako bi se odredila veličina i distribucija veličina čestica u *koloidnim suspenzijama* (Xu, 2002; Hoo i sur., 2008). Fotonska korelacijska spektroskopija (od eng. *Photon Correlation Spectroscopy*), kako ovu metodu još i nazivaju, smatra se „hidrodinamičkom“ metodom, jer mjeri „hidrodinamičke“ parametre kao što su translacijski i/ili rotacijski difuzijski koeficijent pa se oni teorijski uspoređuju sa veličinom i oblicima čestica (Pecora, 2000). Čestice koje se nalaze u otapalima kreću se nasumično tzv. „Brownovim gibanjem“ (Hoo i sur., 2008). Ovakvo gibanje uzrokuje varijacije u intenzitetu raspršene svjetlosti koja prolazi kroz suspenziju (Pecora, 2000). Veličina čestica izračunava se pomoću „Stokes-Einstenove jednadžbe“ koja glasi:

$$D = kT/6\pi\eta R_h$$

gdje je D difuzijski koeficijent, k Boltzmannova konstanta, T temperatura, η viskozitet otapala i R_h hidrodinamički polumjer čestica u otopini. Mjerenja dinamičkog raspršenja svjetlosti provode se uz pomoć instrumenta s laserom koji usmjerava svjetlost na uzorak pa se izlazna svjetlost usmjerava na fotomultiplikacijsku cijev te dalje obrađuje digitalno. Moderni instrumenti koriste optička vlakna kako bi usmjerili ulaznu svjetlost te „prikupili" izlaznu svjetlost (Pecora, 2000). U ovom istraživanju je DLS metoda primijenjena za određivanje veličine CYS- i GSHnanoAg, te CYS- i GSHnanoAu (Ivanković, 2016).

3.2.3. Elektroforetsko raspršenje svjetlosti

Još jedna u nizu metoda, elektroforetsko raspršenje svjetlosti - ELS (od eng. *Electrophoretic Light Scattering*) služi za određivanje površinskog naboja koloidnih čestica u vodenom mediju. Zbog svojih malih dimenzija koloidne čestice imaju veliku specifičnu površinu što znači da postoji značajno međudjelovanje između njihove površine i okolnog medija. Raspršenje čestica i stabilnost suspenzije ovisni su o tom međudjelovanju. Uz kemijski sastav, površinski naboj i građa površine nabijenih čestica važni su za karakterizaciju površine tih čestica preko parametra koji se naziva *zeta potencijalom* (ζ). Nabijena čestica u suspenziji privlači čestice suprotnog naboja koje oko nje stvaraju tzv. *Sternov sloj*. No, čestica i dalje privlači na sebe ione suprotnog naboja, ali se one međusobno odbijaju kao što ih odbija i Sternov sloj. Time stvaraju još jedan sloj oko čestice-*difuzni sloj*. Dva sloja zajedno čine tzv. *električni dvostruki sloj*. Zamišljena ravnina između Sternovog sloja i vanjske granice difuznog sloja određuje zeta potencijal. Ovaj parametar nije lako izmjeriti pa se mjeri neizravno preko *elektroforetske mobilnosti* čestica (brzina kretanja čestica pod utjecajem električne energije) pomoću *Dopplerovog učinka*. On uzrokuje različite frekvencije raspršene svjetlosti s čestica nego što je bila frekvencija ulazne svjetlosti iz čega se može izračunati brzina čestica, a time i zeta potencijal (obično Henryjevom jednadžbom i Smoluchowskijevom aproksimacijom). ELS uređaj se sastoji od izvora svjetlosti, leća koje usmjeravaju svjetlost, komore s uzorkom na koju je priključen izvor struje, leća koje „skupljaju" izlaznu svjetlost, detektora, korelatora; nakon čega se podaci obrađuju digitalno (Xu, 2002). U ovom istraživanju je ELS metoda primjenjena za određivanje površinskog naboja CYS- i GSHnanoAg, te CYS- i GSHnanoAu (Ivanković, 2016).

3.2.4. Transmisijska elektronska mikroskopija

Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM) je instrumentalna metoda u kojoj se koristi međudjelovanje snopa elektrona i uzorka kako bi mogli dobiti fotografiju uvećanog uzorka u svrhu njegova proučavanja (Ma i sur., 2006). Metoda se zasniva na činjenici da se elektroni ponašaju poput valova pa se u vakuumu emitiraju i ubrzavaju. Ubrzavanjem dolazi do smanjenja njihove valne duljine i kao takvi mogu proći nekoliko μm kroz uzorak. U kristalima se oni ogibaju (difraktiraju) od atomskih ravnina te je moguće prikazati tzv. elektronski difrakcijski uzorak. Uređaj koji se koristi pri ovoj metodi naziva se transmisijskim elektronskim mikroskopom (Egerton, 2005). On za razliku od pretražnog elektronskog mikroskopa stvara fotografiju u dvije dimenzije (Stadtländer, 2007). Elektronski pištolj je zaslužan za emitiranje elektrona određene brzine u vakuum (Ma i sur., 2006). Ovdje elektroni prolaze kroz uzorak, ogibaju se te vizualiziraju pomoću leća i digitalne obrade (Egerton, 2005). U ovom istraživanju je ELS metoda primijenjena za vizualizaciju CYS- i GSHnanoAg te CYS- i GSHnanoAu (Ivanković, 2016).

3.3. Priprema otopina i fluorescentnih proba

U istraživanju smo koristili otopine nanočestica zlata (nanoAu) i srebra (nanoAg) stabilizirane tiolnim biomolekulama – glutationom (GSH) i cisteinom (CYS) - koje su bile sintetizirane i karakterizirane u Laboratoriju za analitičku toksikologiju i mineralni metabolizam Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu. U pripremi izvornih (*stock*) otopina nano i ionskih oblika srebra i zlata koristili smo svježe pripravljene CYS- i GSHnanoAg, CYS- i GSHnanoAu, $HauCl_4$ i $AgNO_3$ poznatih koncentracija te ultračistu vodu tipa I dobivenu pročišćavanjem iz Milli-Q uređaja (Merck Millipore, Njemačka). Alikvote testnih otopina poznatih koncentracija uzimali smo iz pripremljenih izvornih otopina pomoću automatskih pipeta. U prvom dijelu istraživanja smo radili triplikate za akutni test toksičnosti na vodenbuhama nakon 24 i 48 h dok smo u drugom dijelu radili devet replikata za akutni test toksičnosti na vodenbuhama nakon 24 h neposredno prije mjerenja razine biomarkera oksidativnog stresa. Mjerenja razine biomarkera oksidativnog stresa utvrđivali smo pomoću fluorescentnih proba diklorodihidrofluorescein diacetata (DCFH-DA, od eng. *dichlorodihydrofluorescein diacetate*), dihidroetidijuma (DHE, od eng. *dihydroethidium*), i monoklorobimana (mBCl, od eng. *monochlorobimane*) (Sigma-Aldrich, Njemačka) točno određenih

koncentracija koje smo pripremili razrjeđivanjem pojedine probe u 0.1 M fosfatnom slanom puferu (PBS, od eng. *Phosphate Buffer Saline*) pH 7.4.

3.4. Akutni test toksičnosti

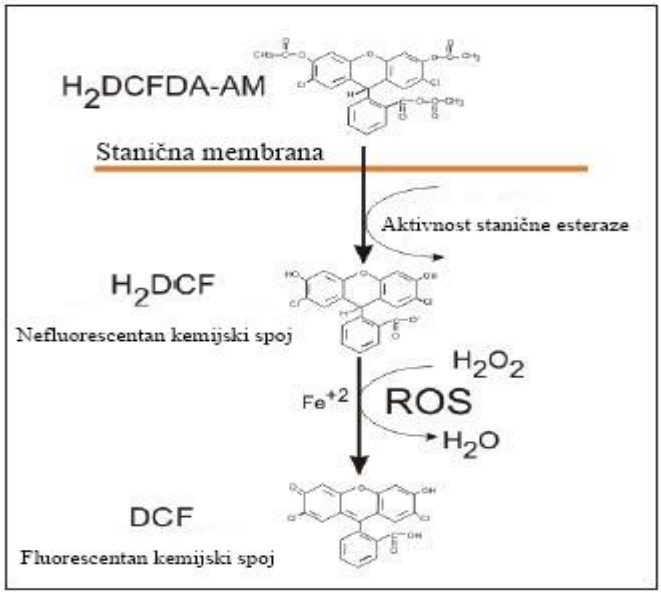
Akutni test toksičnosti prema standardiziranoj metodi HRN EN ISO 6341:2013 („Određivanje inhibicije pokretljivosti *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Test akutne toksičnosti“) proveli smo u Laboratoriju za ekotoksikologiju Nastavnog zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ u Zagrebu. Populacija vodenbuha (*Daphnia magna* Straus, 1820) kupljena je od tvrtke MicroBio-Tests Inc. (Mariakerke, Belgija). Vodenbuhe su bile uzgojene u standardnom mediju za kulture (SM) koji je sadržavao 294 mg/L $CaCl_2 \times 2H_2O$, 123.25 mg/L $MgSO_4 \times 7H_2O$, 64.75 mg/L $NaHCO_3$ i 5.75 mg/L KCl pri pH 7.8 ± 0.5. Temperatura medija održavana je na 20 ± 1 ˚C. Tretman neonata vodenbuha započeli smo 72 ± 2 h nakon njihova izlijeganja otopinama CYS- i GSHnanoAg, CYS- i GSHnanoAu, $HAuCl_4$, te $AgNO_3$. Tijekom tretmana vodenbuhe nisu dobivale hranu ni ikakve dodatke. Tretmane smo provodili u staklenim epruvetama. U svaku epruvetu smo stavili 10 mL otopine medija u koji smo zatim dodali određeni alikvot testnih otopina te 5 neonata vodenbuhe. Tretmane smo provodili primjenom različitih koncentracija nano i ionskog oblika srebra i zlata kako slijedi: CYSnanoAg u rasponu od 5 do 1000 µg Ag/L; GSHnanoAg u rasponu od 5 do 750 µg Ag/L; CYSnanoAu u rasponu od 5 do 5000 µg Au/L; GSHnanoAu u rasponu od 5 do 5000 µg Au/L; $AgNO_3$ u rasponu od 0.1 do 10 µg Au/L; te $HAuCl_4$ u rasponu od 0.5 do 50 µg Au/L. Nakon 24 i 48 h vizualnim opažanjem smo istražili imobilizaciju ili abnormalnosti ponašanja vodenbuha te smo zabilježili broj preživjelih vodenbuha normalnog ponašanja i broj mrtvih vodenbuha. Pokus smo ponovili šest puta u tri replikata.

3.5. Mjerenje razine biomarkera oksidativnog stresa

Mjerenja razine biomarkera oksidativnog stresa (razine peroksidnih radikala, razine superoksid radikala, te razine glutationa) radili smo pri onim koncentracijama tretirajućih otopina pri kojima su sve vodenbuhe preživjele.

3.5.1. Dikloro-dihidro-fluorescein diacetat

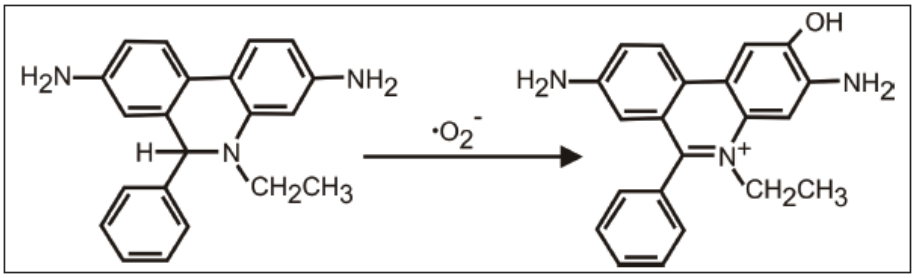
Dikloro-dihidro-fluorescein diacetat ili DCFH-DA je biomarker koji se koristi pri određivanju koncentracije vodikovog peroksida prilikom mjerenja razine oksidativnog stresa. DCFH-DA može ući u stanice gdje ga endogene esteraze cijepaju te nastaje nefluorescentni spoj-DCFH. Ovaj spoj ne može izaći iz stanice, a prilikom oksidacije reaktivnim vrstama kisika iz njega dalje nastaje vrlo fluorescentni spoj DCF (**Slika 12.**). Valne duljine su određene za ovaj spoj i iznose 498 nm za ekscitaciju i 522 nm za emisiju (Held, 2015) (Ulm i sur., 2015). Emitirana fluorescencija spoja DCF proporcionalna je koncentraciji vodikovog peroksida (Wang i Joseph, 1999).



Slika 12. Shematski prikaz reakcija kojima nastaje fluorescentni spoj DCF iz nefluorescentnog spoja DCFH-DA (preuzeto i prilagođeno iz Held, 2015).

3.5.2. Dihidroetidij

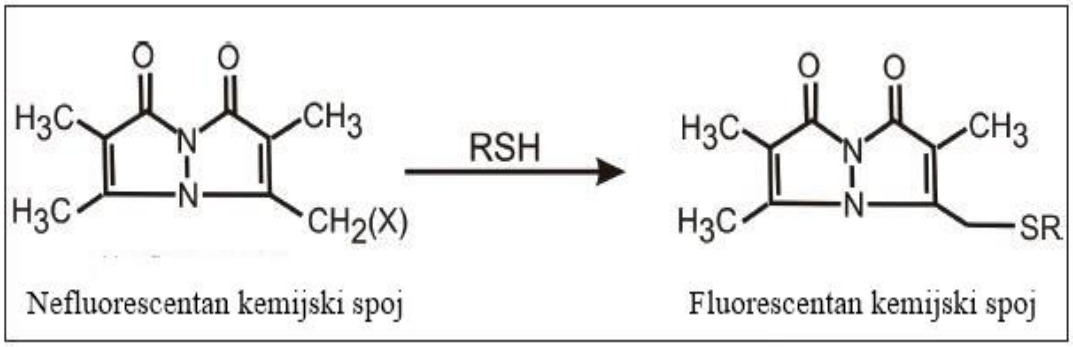
Poput spoja DCFH-DA i dihidroetidij ili DHE je nefluorescentan dok ne oksidira uslijed reakcije s reaktivnim vrstama kisika. U prisustvu superoksidnog radikala, DHE oksidira u fluorescentan spoj naziva 2-hidroetidij (Ulm i sur., 2015) (**Slika 13.**). Ovaj spoj fluorescira crvenom svjetlošću, a odgovaraju mu valne duljine od 535 nm za ekscitaciju i 635 nm za emisiju (Held, 2015).



Slika 13. Prikaz reakcije nastajanja 2-hidroetidija iz DHE uslijed oksidacije superoksidnim radikalom (preuzeto i prilagođeno iz Held, 2015).

3.5.3. Monoklorobiman

Slično spojevima DCFH-DA i DHE, spoj monoklorobiman ili mBCl je nefluorescentan prije nego što konjugira sa tiolnim molekulama male molekularne mase te stvara tzv. fluorescentne adukte (**Slika 14.**). Ovim molekulama pripada i glutation pa se mBCl često koristi kao biomarker koncentracije glutationa u stanicama. Fluorescentni adukti se nakupljaju u jezgri stanica te fluoresciraju plavu svjetlost. Pripadaju im valne duljine od 394 nm za ekscitaciju i 490 nm za emisiju (Held, 2015).



Slika 14. Prikaz nastanka fluorescentnog adukta konjugacijom mBCl-a s tiolnom molekulom (preuzeto i prilagođeno iz Held, 2015).

3.5.4. Postupak određivanja razine oksidativnog stresa u vodenbuhama

Promjenu u razini peroksidnih radikala u tretiranim u odnosu na netretirane vodenbuhe odredili smo primjenom DCFH-DA boje, promjenu u razini superoksid radikala primjenom DHE boje, a promjenu u razini glutationa primjenom mBCl boje. Staklenom pipetom smo premjestili preživjele vodenbuhe na tri mikrotitarske pločice s 96 jažica. Svaka pločica je bila namijenjena za jednu od tri mjerene fluorescentne probe: DCFH-DA, DHE i mBCl (Sigma-Aldrich, Njemačka). U svaku jažicu smo stavili po pet neonata vodenbuha za svaku koncentraciju u tri replikata. Mikropipetom smo izvukli medij u kojem su vodenbuhe tretirane, isprali smo vodenbuhe s 0.1 M PBS puferom pH 7.4 te uklopili konačno vodenbuhe u 200 μL istog pufera. Nakon toga smo uzorke homogenizirali pomoću ultrazvučne sonde Soniprep 150 (MSE Ltd, UK), dodali 20 μL određene fluorescentne probe u odgovarajuću mikrotitarsku pločicu te inkubirali na sobnoj temperaturi tijekom 30 minuta. Konačna koncentracija fluorescentnih boja u svakoj jažici bila je 20 μM za DCFH-DA i DHE te 50 mM za mBCl. Nakon inkubacije, fluorescenciju svake boje smo očitali na čitaču mikrotitarskih pločica Victor ™ (Perkin Elmer, Massachusetts, SAD). Akutni test toksičnosti za svrhu daljnjeg određivanja razine oksidativnog stresa smo ponovili tri puta u devet replikata.

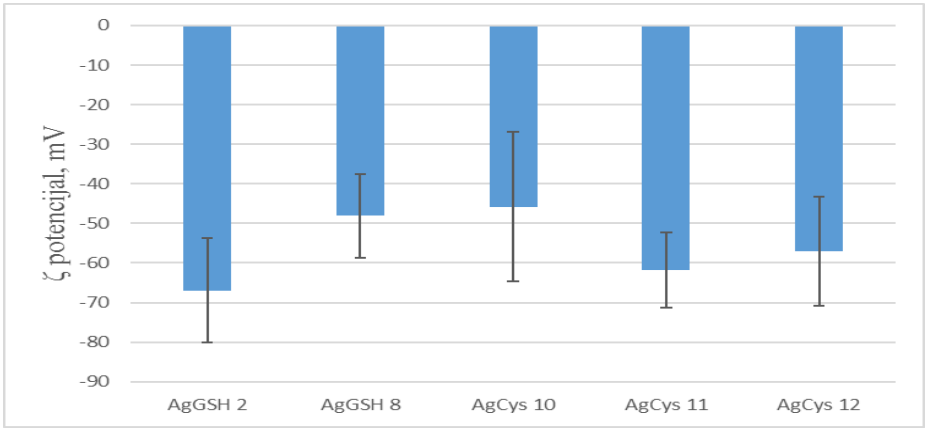
3.6. Statistička obrada podataka

Podatke dobivene istraživanjem obradili smo u programima Excel 2016 (Microsoft Corporation, Redmond, SAD) i STATISTICA v12 (StatSoft Inc., Tulsa, SAD). Istraživanje je provedeno u najmanje tri replikata te su rezultati obrađeni kao srednje vrijednosti ± standardna devijacija. EC_{50} vrijednosti smo odredili pomoću logit analize. Standardnu devijaciju i interval pouzdanosti određen na 95% dobili smo pomoću studentovog t - testa. Statističku značajnost smo odredili pri $P \leq 0.05$.

4. REZULTATI

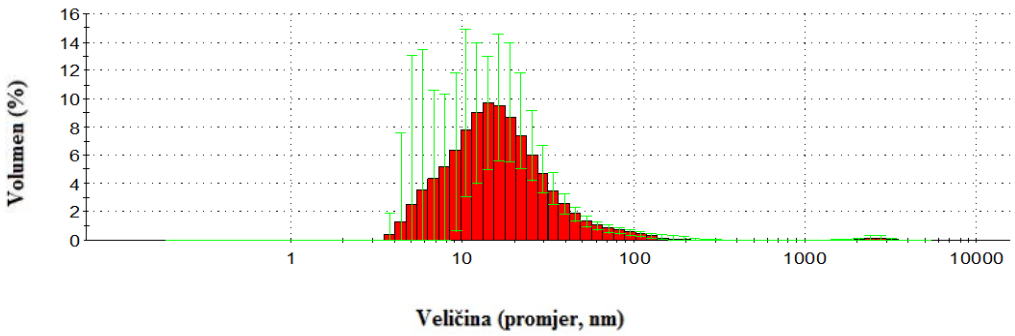
4.1. Karakteristike nanočestica srebra i zlata

Karakteristike nanočestica odredio je student Fran Ivanković s Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu. Metodom elektroforetskog raspršenja svjetlosti koloidne otopine nanočestica srebra i zlata su pokazale kako su stabilne, jer ih karakterizira ζ potencijal niži od -40 mV (**Slika 15**).



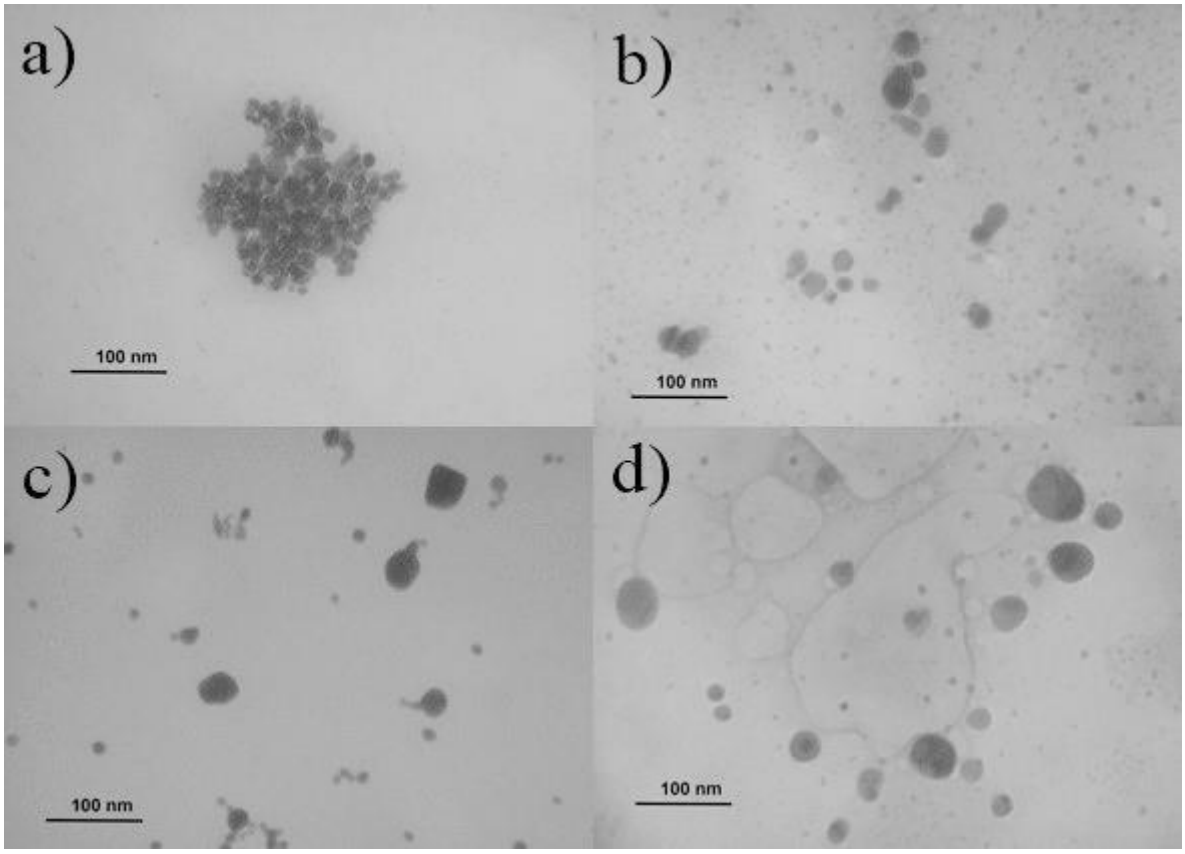
Slika 15. Grafički prikaz zeta (ζ)-potencijala nanočestica srebra u Milli-Q vodi (preuzeto iz Ivanković, 2016).

Metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti određena je distribucija veličina nanočestica s obzirom na volumen pomoću parametra - hidrodinamičkog promjera (dH): stabilne vrste nanoAg, stabilizirane s CYS i/ili GSH većinom su pokazale monomodalnu distribuciju veličina dok su ekvivalentne, stabilne vrste nanoAu pokazale bimodalnu distribuciju veličina (**Slika 16.**) (Ivanković, 2016).



Slika 16. Dijagram distribucije veličina GSHnanoAg 2 (preuzeto iz Ivanković, 2016).

Transmisijskom elektronskom mikroskopijom je određeno kako su sve vrste nanočestica zlata i srebra bile sfernog oblika (**Slika 17.**).



Slika 17. TEM fotografije korištenih nanočestica zlata i srebra: a) CYSnanoAg, b) GSHnanoAg, c)CYSnanoAu, d) GSHnanoAu (preuzeto iz Ivanković, 2016).

4.2. Akutni test toksičnosti nakon 24 i 48 h

Vrijednosti EC_{50} prikazane su u **Tablici 1**. Rezultati dobiveni akutnim testom toksičnosti ukazuju na drastično veću toksičnost ionskih oblika srebra i zlata pri puno manjim koncentracijama nego što su to pokazale nanoAg ili nanoAu stabilizirane cisteinom ili glutationom. Ionski oblik Ag^+ toksičan je već pri koncentraciji od 1.06 µg Ag/L, dok je EC50 za CYSnanoAg određen kod 347.6 µg Ag/L, za GSHnanoAg 152.5 µg Ag/L; sve unutar 24 h. Puno niže EC_{50} vrijednosti zabilježene su nakon 48 h za sve ispitivane vrste Ag i Au. Kada gledamo njihove odnose toksičnosti, možemo reći kako je Ag^+ toksičniji od Au^{3+} nakon 24 i nakon 48 h. Nadalje, GSHnanoAg oblik je toksičniji od CYSnanoAg.

Zanimljivi su rezultati koje smo dobili za nanoAu. Ove nanočestice nisu pokazale toksičnost na vodenbuhama niti pri najvećoj primijenjenoj koncentraciji od 5000 µg Au/L (5 mg Au/L). Stoga, za njih nismo uspjeli odrediti EC_{50} vrijednosti.

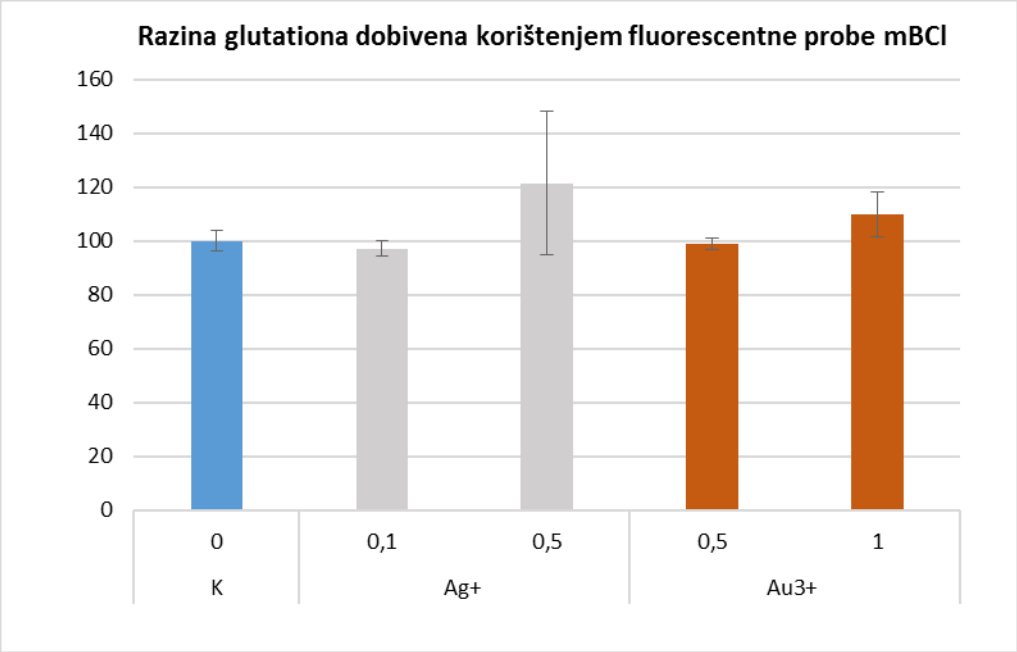
Tablica 1. Toksičnost nanočestica zlata i srebra stabiliziranih cisteinom i glutationom te ionskih oblika zlata i srebra na vodenbuhe. Vrijednosti EC_{50} su izražene kao srednje vrijednosti ± SD (s 95% CI u zagradama) i to u µg Ag ili Au/L. / označava kako EC_{50} vrijednosti nisu dobivene.

Ispitivana vrsta (raspon korištenih koncentracija)	**Vrijeme izloženosti (h)**	**EC_{50} (95% CI)**
CYSnanoAg (5 - 1000 µg/L)	24	347.6 ± 5.39 (344.19 - 364.39)
	48	193.1 ± 5.20 (192.73 - 206.39)
GSHnanoAg (5 - 750 µg/L)	24	152.5 ± 6.20 (150.76 - 166.14)
	48	119.0 ± 5.79 (116.92 - 131.31)
CYSnanoAu (5 - 5000 µg/L)	24	/
	48	/
GSHnanoAu (5 - 5000 µg/L)	24	/
	48	/
Ag^+ (0,1 - 10 µg/L)	24	1.06 ± 5.69 (0 - 12.75)
	48	0.97 ± 5.13 (0 - 11.74)
Au^{3+} (0,5 - 50 µg/L)	24	12.7 ± 6.23 (12.15 - 27.61)
	48	10.4 ± 6.19 (8.63 - 24.01)

4.3. Razine biomarkera oksidativnog stresa

4.3.1. Razina glutationa

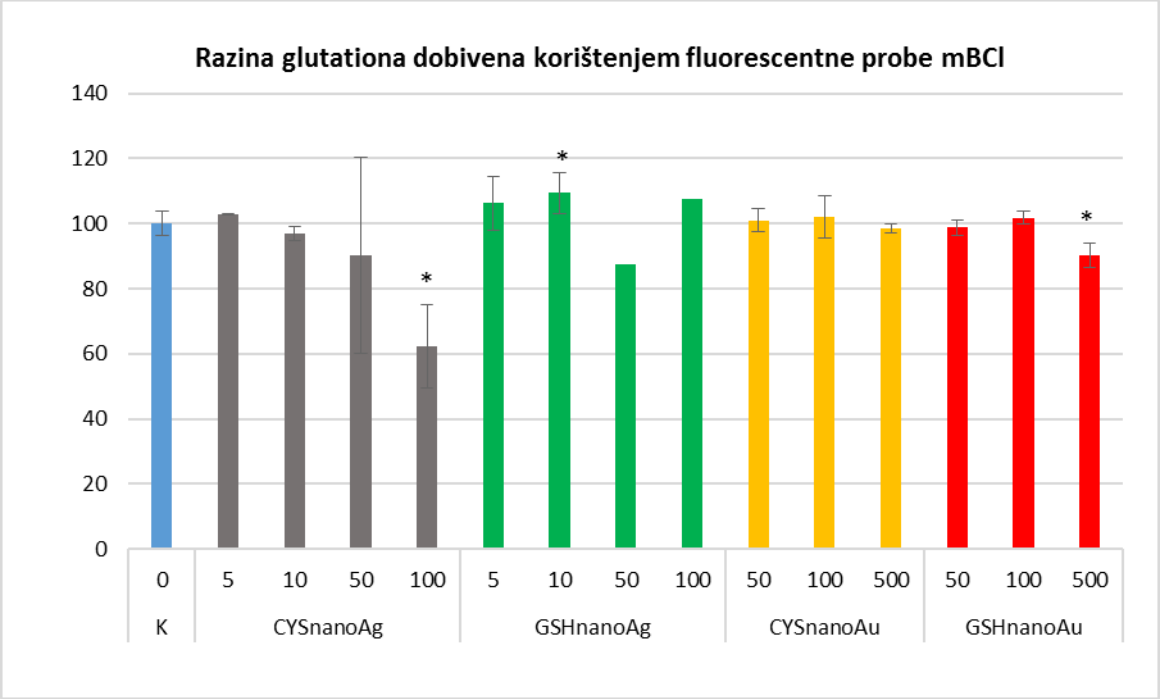
Upotreba monoklorobimana (mBCl) kao biomarkera razine glutationa dala je sljedeće rezultate: uz ionske vrste, Ag^{+} i Au^{3+}, i povećanje njihove koncentracije vezano je povećanje razine glutationa u vodenbuhama. Primjetno je kako je kod Ag^{+} znatno veće povećanje razine glutationa pri manjoj koncentraciji u odnosu na Au^{3+} (**Slika 18.**).



Slika 18. Grafički prikaz razine srednjih vrijednosti razine glutationa ± SD u ispitivanim vrstama dobiven korištenjem fluorescentne probe mBCl. Vrijednosti na y-osi su izražene kao postotak kontrole dok su na x-osi koncentracije ispitivanih vrsta u µg Ag ili Au /L. K označava kontrolnu vrijednost.

Vrijednosti razine glutationa u vodenbuhama kod CYSnanoAg pokazuju smanjenje s povećanjem koncentracije ove vrste. Rezultate koje smo dobili za vrstu GSHnanoAg (iz tri replikata)nije moguće interpretirati budući da pri koncentracijama od 50 µg Ag/L i 100 µg Ag/L nismo uspjeli dobiti reprezentativan uzorak. Samim time, nismo mogli izračunati standardnu devijaciju pa ćemo te rezultate izuzeti. Ako bismo zaključke temeljili samo na rezultatima koncentracija 5 µg Ag/L i 10 µg Ag/L mogli bismo reći kako ova ispitivana vrsta pokazuje trend

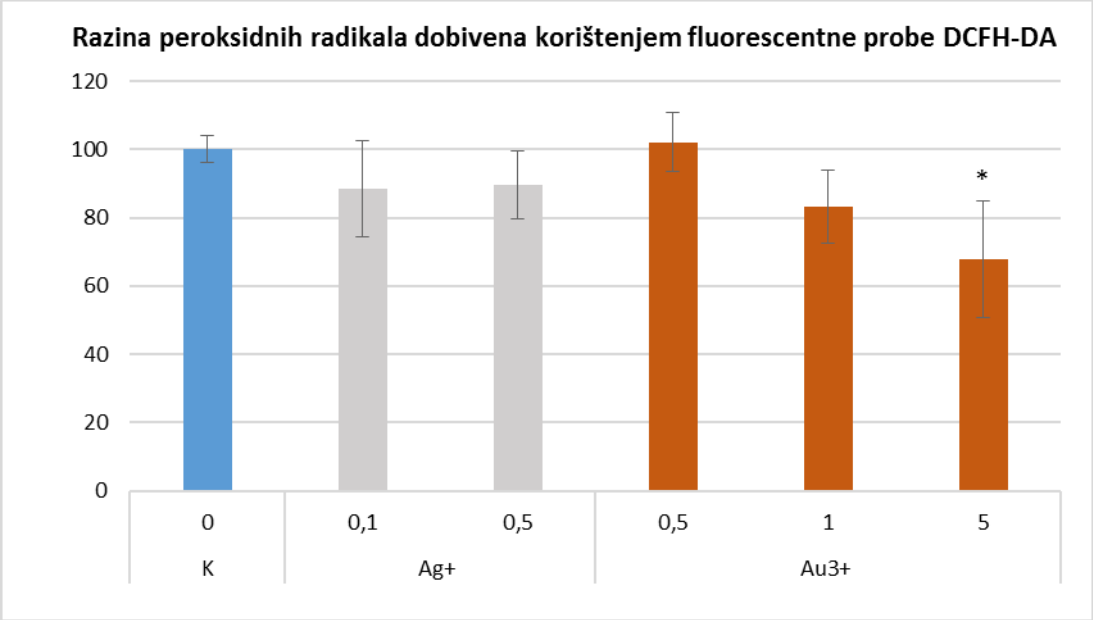
povećanja razine glutationa s povećanjem koncentracije (no ovakav zaključak nije reprezentativan za tu vrstu). Vrste CYSnanoAu i GSHnanoAu slijede sličan trend povećanja razine glutationa sa srednjom koncentracijom (100 µg Au/L), a zatim smanjenje s najvećom koncentracijom (500 µg Au/L). Gledajući cjelokupan graf, možemo zaključiti kako vrste CYSnanoAg i GSHnanoAg pojedinačno pokazuju različite trendove u odnosu jedan na drugoga dok vrste CYSnanoAu i GSHnanoAu pokazuju relativno slične trendove (**Slika 19.**).



Slika 19. Grafički prikaz srednjih vrijednosti razine glutationa ± SD (iz tri replikata) u ispitivanim vrstama dobiven korištenjem fluorescentne probe mBCl. Vrijednosti na y-osi su izražene kao postotak kontrole dok su na x-osi koncentracije ispitivanih vrsta u µg Ag ili Au /L. * označava statistički značajno različitu vrijednost u odnosu na kontrolu ($P \leq 0.05$). K označava kontrolnu vrijednost. * označava statistički značajno različitu vrijednost u usporedbi s kontrolnom vrijednosti.

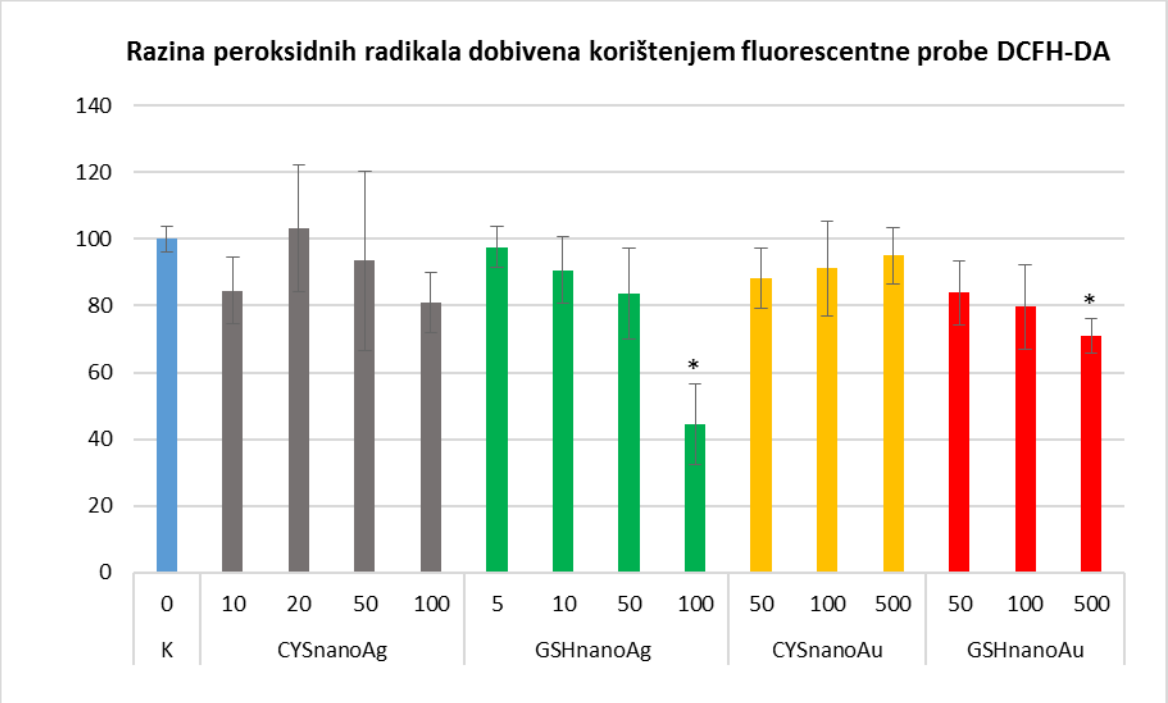
4.3.2. Razina peroksidnih radikala

Korištenjem diklorodihidroflourescein diacetata dobili smo podatke za razinu peroksidnih radikala u vodenbuhama. Kod vrste Ag^{+} možemo primijetiti neznatno povećanje razine peroksidnih radikala s povećanjem koncentracije dok se razina peroksidnih radikala kod vrste Au^{3+} smanjuje s povećanjem koncentracije (**Slika 20.**).



Slika 20. Grafički prikaz srednjih vrijednosti razine peroksidnih radikala ± SD (iz tri replikata) u ispitivanim vrstama dobiven korištenjem fluorescentne probe DCFH-DA. Vrijednosti na y-osi su izražene kao postotak kontrole dok su na x-osi koncentracije ispitivanih vrsta u µg Ag ili Au /L. K označava kontrolnu vrijednost. * označava statistički značajno različitu vrijednost u usporedbi s kontrolnom vrijednosti.

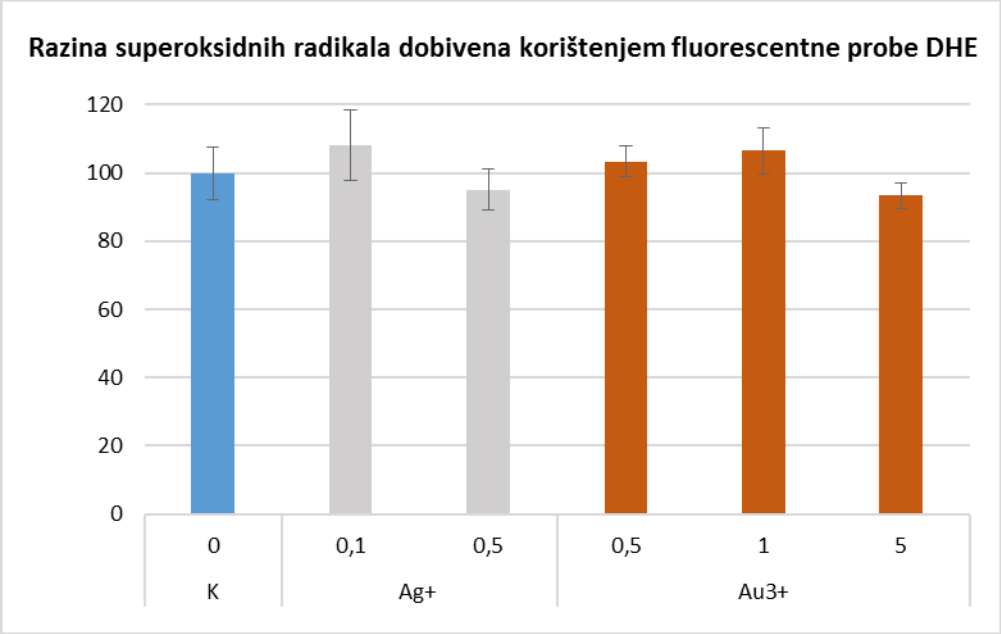
Rezultati koje smo dobili za vrste CYS- i GSHnanoAg, te CYS- i GSHnanoAu dovode do zaključka kako su s obzirom na razine peroksidnih radikala u odnosu na koncentracije one zasebni entiteti. Nijedna vrsta ne pokazuje sličan trend neovisno o njihovoj sličnosti tj. radi li se o istoj vrsti nanočestica s različitim stabilizatorom. Vrsta CYSnanoAg ima povećanu razinu peroksidnih radikala pri 20 µg Ag/L dok daljnjim povećanjem koncentracija pokazuje smanjenje razine istih radikala. Vrste GSHnanoAg i GSHnanoAu pokazuju smanjenje razine peroksidnih radikala s povećanjem koncentracije. Suprotno, vrsta CYSnanoAu pokazuje povećanje razine peroksidnih radikala s povećanjem koncentracije (**Slika 21.**)



Slika 21. Grafički prikaz srednjih vrijednosti razine peroksidnih radikala ± SD (iz tri replikata) u ispitivanim vrstama dobiven korištenjem fluorescentne probe DCFH-DA. Vrijednosti na y-osi su izražene kao postotak kontrole dok su na x-osi koncentracije ispitivanih vrsta u µg Ag ili Au /L. K označava kontrolnu vrijednost. * označava statistički značajno različitu vrijednost u usporedbi s kontrolnom vrijednosti.

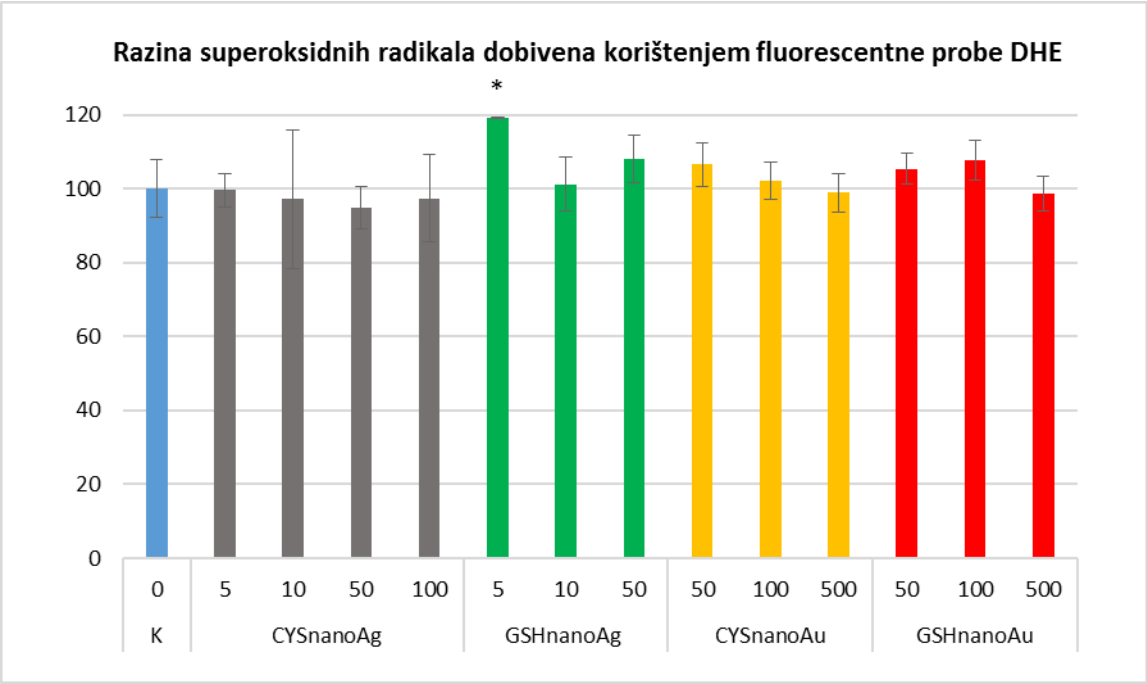
4.3.3. Razina superoksidnih radikala

Fluorescencijom probe DHE dobili smo rezultate razine superoksidnih radikala u vodenbuhama. Ionski oblik Ag^{+} pokazuje smanjenje razine superoksidnih radikala s povećanjem koncentracije. Vrsta Au^{3+} pokazuje povećanjem razine superoksidnih radikala sa srednjom koncentracijom (1 µg Au/L) koju slijedi smanjenje razine tih radikala pri većoj koncentraciji (**Slika 22.**)



Slika 22. Grafički prikaz srednjih vrijednosti razine superoksidnih radikala ± SD (iz tri replikata) u ispitivanim vrstama dobiven korištenjem fluorescentne probe DHE. Vrijednosti na y-osi su izražene kao postotak kontrole dok su na x-osi koncentracije ispitivanih vrsta u µg Ag ili Au /L. K označava kontrolnu vrijednost.

Rezultati razine superoksidnih radikala pokazuju sličnost s rezultatima razine peroksidnih radikala u tome što se ispitivane vrste i ovdje međusobno razlikuju. Vrsta CYSnanoAg održava relativno jednolike razine superoksidnih radikala s povećanjem koncentracije dok se kod vrste GSHnanoAg njihova razina drastično smanjuje sa srednjom koncentracijom (10 µg Ag/L) te ponovno povećava s posljednjom koncentracijom (50 µg Ag/L). Smanjenje razine superoksidnih radikala s povećanjem koncentracije možemo primijetiti kod vrste CYSnanoAu. Vrsta GSHnanoAu ima povećane razine ovih radikala pri srednjoj koncentraciji (100 µg Au/L) dok se kod posljednje koncentracije (500 µg Au/L) ona smanjuje (**Slika 23.**)



Slika 23. Grafički prikaz srednjih vrijednosti razine superoksidnih radikala ± SD (iz tri replikata) u ispitivanim vrstama dobiven korištenjem fluorescentne probe DHE. Vrijednosti na y-osi su izražene kao postotak kontrole dok su na x-osi koncentracije ispitivanih vrsta u µg Ag ili Au /L. * označava statistički značajno različitu vrijednost u odnosu na kontrolu ($P \leq 0.05$). K označava kontrolnu vrijednost. * označava statistički značajno različitu vrijednost u usporedbi s kontrolnom vrijednosti.

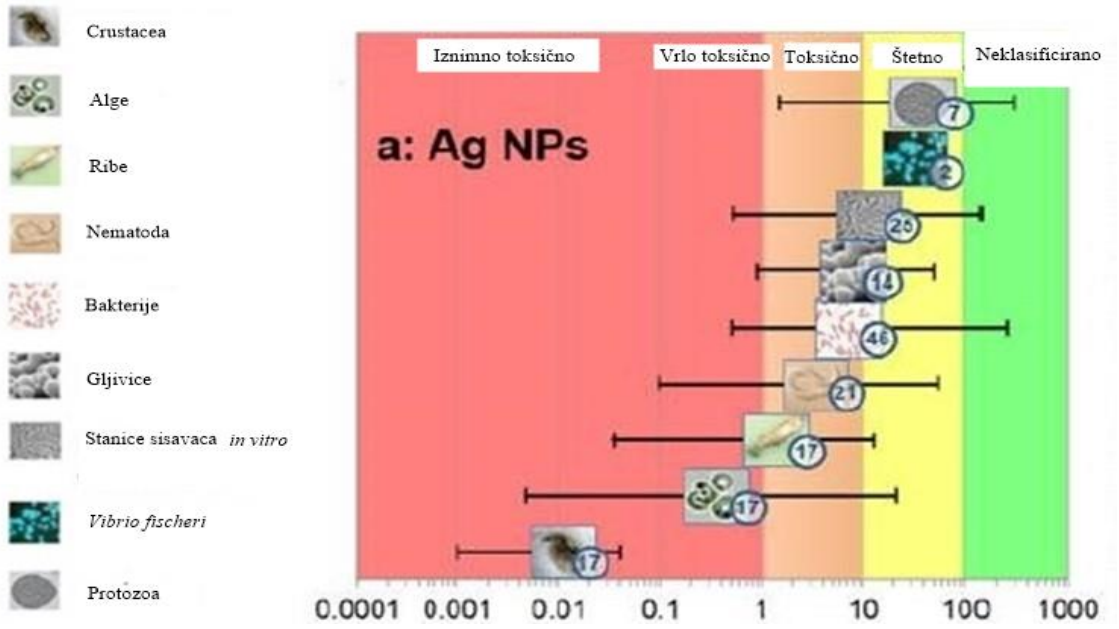
5. RASPRAVA

Rezultati koje smo dobili i koji jasno pokazuju veću toksičnost Ag^+ iona u odnosu na Au^{3+} ione, nanoAu i nanoAg u skladu su s prijašnjim istraživanjima (Li i sur., 2010). Kao što je prikazano u **Tablici 2**. vidljivo je kako medijan većeg broja istraživanja za akutni test toksičnosti na rakovima u prisustvu ionskog oblika Ag iznosi 0.85 µg Ag/L (Bondarenko i sur., 2013) što je vrlo slično našem rezultatu koji iznosi 0.97 µg Ag/L nakon 48 h.

Tablica 2. Medijan EC_{50} vrijednosti za akutni test toksičnosti na rakovima izražen u mg/L ili mg metala/L s brojem istraživanja, u zagradama, iz kojih su vrijednosti bile izračunate (preuzeto i prilagođeno iz Bondarenko i sur., 2013).

Grupa organizama	Medijan EC50 vrijednosti za određenu ispitivanu vrstu nanočestica u mg/L (broj podataka)			Medijan EC50 vrijednosti za određenu ispitivanu vrstu metala u L (broj podataka)		
	Ag NPs	CuO NPs	ZnO NPs	Ag salt	Cu salt	Zn salt
Crustacea	0.01 (17)	2.1 (8)	2.3 (10)	0.00085 (8)	0.024 (8)	1.3 (6)

U većem broju istraživanja vrijednosti EC_{50} za nanoAg na vodenbuhe se nalaze između 1 i 50 µg Ag/L (**Slika 24.**) (Bondarenko i sur., 2013) dok su naši rezultati za vrste CYSnanoAg i GSHnanoAg nešto viši; 193.1 i 119.0 µg Ag/L. Moguće je kako odabir stabilizacijskih omotača određuje, u ovom slučaju smanjuje toksičnost. Rezultati su pokazali i kako EC_{50} vrijednost za Au^{3+} ione iznosi 10.4 µg Au/L (0.0104 mg Au/L) nakon 48 h što je također slično vrijednosti 0.002 µg Au/L (2 mg Au/L) u istraživanju koje su proveli Li i sur. (2010). U akutnom testu toksičnosti nismo koristili koncentracije veće od 5000 µg Au/L (5 mg Au/L) za nanoAu koje se pokazalo vrlo netoksičnim. Istraživanje Pokhrel i sur. (2013) pokazalo je kako zbog afiniteta cisteina za Ag^+ ione, nastaju kompleksi cisteina s monovalentnim Ag^+ ionima u otopini $AgNO_3$ te su vodenbuhe tako bile zaštićene od potencijalnih toksičnih učinaka Ag^+ iona. Time bi se mogla objasniti i manja toksičnost CYSnanoAg u odnosu na GSHnanoAg.



Slika 24. Piktogram medijana EC_{50} vrijednosti ± minimalne i maksimalne vrijednosti (iz većeg broja istraživanja) za testne vrste s pripadajućom legendom. Na x-osi su koncentracije nanosrebra u mg Ag/L. Različite boje unutar piktograma predstavljaju kategorizaciju toksičnosti prema EU-Direktivi 93/67/EEC (preuzeto i prilagođeno iz Bondarenko i sur., 2013.).

Vodenbuhe pod utjecajem ionskih vrsta Ag^+ i Au^{3+} slično reagiraju na stres. Povećanje intenziteta fluorescencije s povećanjem koncentracije ukazuje na ubrzano stvaranje glutationa i potvrđuje prisutstvo oksidativnog stresa u vodenbuhama (**Slika 18.**). Rezultati dobiveni primjenom fluorescentne probe DCFH-DA ukazuju na malo drugačiju sliku. Povećanje intenziteta fluorescencije (peroksidnih radikala) povećava se s povećanjem koncentracije u vrste Ag^+ kao i kod probe mBCl dok se kod vrste Au^{3+} intenzitet fluorescencije smanjuje s povećanjem koncentracije (**Slika 20.**). Možemo pretpostaviti kako se vodenbuhe u prisustvu Au^{3+} vrste brže prilagođavaju što je u skladu s rezultatima koji je određuju kao manje toksičnu vrstu od vrste Ag^+ (**Tablica 1.**). Fluorescentna proba DHE (kao biomarker superoksidnih radikala) dala je sasvim drugačije rezultate nego već spomenute probe. Iz prikazanih rezultata je vidljivo kako se intenzitet DHE fluorescencije smanjuje s povećanjem koncentracije Ag^+, a kod Au^{3+} se intenzitet povećava sa srednjom koncentracijom (1 μg Au/L) te smanjuje s posljednjom koncentracijom (5 μg Au/L) (**Slika 22.**). Utjecaj Au^{3+} iona kao manje toksične vrste je i u ovom slučaju vidljiv kroz relativno brzo smanjenje superoksidnih radikala od strane organizma. Smanjenje razine superoksidnih radikala s povećanjem koncentracije vrste Ag^+ dovodi do pretpostavke kako je njihovo smanjenje rezultat neizravnog nastanka peroksidnih radikala iz superoksidnih radikala (Kerksick i Willoughby, 2005).

Intenzitet fluorescencije svih korištenih proba kod vrste CYSnanoAg smanjuje se s povećanjem koncentracije što je ekvivalentno smanjenju glutationa, peroksidnih radikala te superoksidnih radikala (**Slika 19., Slika 21., Slika 23.**). Ovakvo opažanje moglo bi biti rezultat kompleksacije cisteina s Ag^+ ionima i smanjenje toksičnosti (Pokhrel i sur., 2013.). Utjecaj vrste GSHnanoAg, pri korištenju proba DCFH-DA i DHE ponovno bi mogli objasniti dinamikom između superoksidnih i peroksidnih radikala (**Slika 21., Slika 23.**). Rezultati probe mBCl bi za vrstu CYSnanoAu i GSHnanoAu mogli označavati prisutnost jednolike razine stresa s povećanjem koncentracije (**Slika 19.**). S druge strane, dinamika superoksidnih i peroksidnih radikala vidljiva je u rezultatima proba DCFH-DA i DHE za iste vrste (**Slika 21., Slika 23.**).

Vodenbuhe su vrlo osjetljivi organizmi i teško je s njima rukovati. U istraživanjima se koriste vodenbuhe nastale nespolnim razmnožavanjem koje su genetski klonovi. Neovisno o tome moguće je da u ponovljenom nizu pokusa neke jedinke koje su manje otporne uginu pri određenim koncentracijama koje su se za njih u prethodnim serijama pokazale nesmrtonosnima. Stoga je potrebno napraviti veći broj serija pokusa s većim brojem jedinki kako bi se dobili reprezentativni uzorci (no i u velikom broju ponovljenih pokusa može se dogoditi da pojedine vodenbuhe uginu). Upravo je ovo razlog što pri mjerenju oksidativnog stresa pomoću fluorescentne probe mBCl nismo uspjeli dobiti reprezentativan uzorak za vrstu GSHnanoAg (**Slika 19.**). Nadalje, rezultate dobivene mjerenjem razine oksidativnog stresa napravili smo u triplikatima i izrazili ih kao postotak od kontrolne vrijednosti. Ovo smo napravili kako bi ujednačili razlike među podacima koje su u ovakvim istraživanjima neizbježne, jer proizlaze iz razlika između vodenbuha kao zasebnih jedinki. Rezultati mjerenja razine oksidativnog stresa mogu ukazati na biokemijske promjene unutar organizma, no za šire razumijevanje ekotoksikoloških učinaka na određeni organizam potrebna su daljnja ispitivanja. Za potpuniju sliku učinka stabilizacije nanočestica zlata i srebra tiolnim biomolekulama bilo bi dobro usporediti ih i s nestabiliziranim nanočesticama zlata i srebra.

6. ZAKLJUČAK

Ionska vrsta Ag^+ pokazala se najtoksičnijom vrstom od svih ispitivanih vrsta.

Ionska vrsta Au^{3+} manje je toksična od vrste Ag^+, no obje su vrste toksičnije od svih ostalih ispitivanih nano vrsta.

Vrste GSH- i CYSnanoAu pokazale su se netoksičnima.

Dobiveni rezultati jasno ukazuju da vrsta tiolnog stabilizacijskog omotača utječe na toksičnost nanočestica srebra i zlata. Glutationski omotač se pokazao toksičnijim od cisteinskog stabilizacijskog omotača.

Upotreba fluorescentnih proba je potvrdila prisutnost oksidativnog stresa u svim ispitivanim vrstama.

Rezultati korištenja probe mBCl, DCFH-DA i DHE ukazuju na manju razinu oksidativnog stresa u vrste Au^{3+} nego vrste Ag^+ što je u skladu s rezultatom njene toksičnosti dobivene akutnim testom toksičnosti.

Rezultati proba DCFH-DA i DHE ukazuju na dinamiku između peroksidnih i superoksidnih radikala.

Rezultati svih korištenih proba ukazuju na smanjenu razinu oksidativnog stresa u vrste CYSnanoAg. Pretpostavka je kako je moguća kompleksacija cisteina s Ag^+ ionima što smanjuje toksičnost.

Vrsta GSHnanoAg pokazuje najveću razinu oksidativnog stresa od svih nano vrsta što je u skladu s rezultatom njene toksičnosti dobivene akutnim testom toksičnosti.

7. LITERATURA

1. Ahlberg S., Antonopulos A., Diendorf J., Dringen R., Epple M., Flöck R., Goedecke W., Graf C., Haberl N., Helmlinger J., Herzog F., Heuer F., Hirn S., Johannes C., Kittler S., Köller M., Korn K., Kreyling W. G., Krombach F., Lademann J., Loza K., Luther E. M., Malissek M., Meinke M. C., Nordmeyer D., Pailliart A., Raabe J., Rancan F., Rothen-Rutishauser B., Rühl E., Schleh C., Seibel A., Sengstock C., Treuel L., Vogt A., Weber K., Zellner R. (2014): PVP-coated, negatively charged silver nanoparticles: A multi-center study of their physicochemical characteristics, cell culture and in vivo experiments. Beilstein Journal of Nanotechnology **5**: 1944-1965.

2. Alkilany A. M., Murphy C. J. (2010): Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? Journal of Nanoparticle Research **12**: 2313-2333.

3. Anambiga I. V., Suganthan V., Raj N. A. N., Buvaneswari G., Kumar T. S. S. (2013): Colorimetric Detection of Lead Ions Using Glutathione Stabilized Silver Nanoparticles. International Journal of Scientific & Engineering Research **4(5)**: 710-715.

4. Balavandy K. S., Shameli K., Biak D. R. B. A., Abidin Z. Z. (2014): Stirring time effect of silver nanoparticles prepared in glutathione mediated by green method. Chemistry Central Journal **8**:1-10.

5. Baun A., Hartmann N. B., Grieger K., Kusk K. O. (2008): Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. Ecotoxicology **17**: 387–395.

6. Beaty R. D., Kerber J. D. (1993): Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry. The Perkin-Elmer Corporation, Norwalk.

7. Bhatt I., Tripathi B. N. (2011): Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment. Chemosphere **82**: 308–317.

8. Blinova I., Niskanen J., Kajankari P., Kanarbik L., Käkinen A., Tenhu H., Penttinen O.-P., Kahru A. (2013): Toxicity of two types of silver nanoparticles to aquatic crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. Environmental Science and Pollution Research **20**:3456–3463.

9. Bondarenko O., Juganson K., Ivask A., Kasemets K., Mortimer M., Kahru A. (2013): Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. Archives of Toxicology **87**: 1181-1200.

10. Bozich J. S., Klaper R. D., Lohse S. E., Murphy C. J., Torelli M. D., Hamers R. J. (2014): Surface chemistry, charge and ligand type impact the toxicity of gold nanoparticles to *Daphnia magna*. Environmetal Science: Nano **1**: 260–270.

11. Brosnan J. T., Brosnan M. E. (2006): The Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview. The Journal of Nutrition **136**: 1636S-1640S.

12. Chatterjee A., Priyam A., Das S. K., Saha A. (2006): Size tunable synthesis of cysteine-capped CdS nanoparticles by γ -irradiation. Journal of Colloid and Interface Science **294**: 334–342.

13. Daniel M-C., Astruc D. (2004): Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. Chemical Reviews **104(1)**: 293-346.

14. Daraio C., Jin S. (2012): Synthesis and Patterning Methods for Nanostructures Useful for Biological Applications. U: Silva G. A., Parpura V. (ur.) Nanotechnology for Biology and Medicine: At the Building Block Level. New York, Springer Science+Business Media Inc., str. 27-44.

15. De M., Ghosh P. S., Rotello M. Vincent (2008): Applications of Nanoparticles in Biology. Advanced Materials **20**: 4225-4241.

16. Edison A. S., Hall R. D., Junot C., Karp P. D., Kurland I. J., Mistrik R., Reed L. K., Saito K., Salek R. M., Steinbeck C., Sumner L. W., Viant M. R. (2016): The Time Is Right to Focus on Model Organism Metabolomes. Metabolites **6**: 1-7.

17. Egerton R. F. (2005): Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM. Springer Science+Business Media, Inc., New York.

18. El-Badawy A., Feldhake D., Venkatapathy R. (2010): State of the Science Literature Review: Everything Nanosilver and More. U.S. Environmental Protection Agency, Washington.

19. Fabrega J., Tyler C. R., Galloway T. S., Luoma S. N., Lead J. R. (2011): Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. Environment International **37**: 517–531.

20. Feldmann C., Goesmann H. (2010): Nanoparticulate Functional Materials. Angewandte Chemie International Edition **49**: 1362 – 1395.

21. Forró L., Korovchinsky N. M., Kotov A. A., Petrusek A. (2008): Global diversity of cladocerans (Cladocera; Crustacea) in freshwater. Hydrobiologia **595**: 177–184.

22. Fratoddi I., Venditti I., Russo V. M., Cametti C. (2014): How toxic are gold nanoparticles? the state-of-the-art. Nano Research **8**: 1771-1799.

23. García R., Báez A. P. (2012): Atomic Absorption Spectrometry (AAS). U: Farrukh M. A. (ur.) Atomic Absorption Spectroscopy. Shangai, InTech, str. 1-12.

24. Handy R. D., Owen R., Valsami-Jones E. (2008): The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. Ecotoxicology **17(5)**: 315-325.

25. Harris K. D. M., Bartlett N. J., Lloyd V. K. (2011): *Daphnia* as an Emerging Epigenetic Model Organism. Genetics Research International **2012**: 1-8.

26. roberts

27. Hoo C. M., Starostin N., West P., Mecartney M. L. (2008): A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. Journal of Nanoparticle Research **10**: 89-96.

28. Ivanković F. (2016): Sinteza i karakterizacija tiolno funkcionaliziranih nanočestica srebra i zlata. Diplomski rad, Zagreb: Farmaceutsko-biokemijski fakultet.

29. Jurašin D. D., Ćurlin M., Lovrić M., Gajović S., Capjak I., Crnković T., Babič M., Horák D., Vinković V. I. (2016): Surface coating affects behavior of metallic nanoparticles in a biological environment. Beilstein Journal of Nanotechnology **7**: 246–262.

30. Kerksick C., Willoughby D. (2005): The Antioxidant Role of Glutathione and N-Acetyl-Cysteine Supplements and Exercise-Induced Oxidative Stress. Journal of the International Society of Sports Nutrition **2(2)**: 38-44.

31. Kim J. S., Kuk E., Yu K. N., Kim J. H., Park S. J., Lee H. J., Kim S. H., Park Y. K., Park Y. H., Hwang C. Y., Kim Y. K., Lee Y. S., Jeong D. H., Cho M. H. (2007): Antimicrobial effects of silver nanoparticles. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine **3**: 95-101.

32. Kumar P. S., Pastoriza-Santos I., Rodríguez-González B., García de Abajo F. J., Liz-Marzán L. (2008): High-yield synthesis and optical response of gold nanostars. Nanotechnology **19(1)**: 1-12.

33. Lapresta-Fernández A., Fernández A., Blasco J. (2012): Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms. Trends in Analytical Chemistry **32**: 40-58.

34. Li H., Cui Z., Han C. (2009): Glutathione-stabilized silver nanoparticles as colorimetric sensor for Ni2+ ion. Sensors and Actuators B **143**: 87–92.

35. Li T., Albee B., Alemayehu M., Diaz R., Ingham L., Kamal S., Rodriguez M., Bishnoi S.W. (2010): Comparative toxicity study of Ag, Au, and Ag–Au bimetallic nanoparticles on *Daphnia magna.* Analytical and Bioanalytical Chemistry **398**: 689–700.

36. Lushchak V.I. (2011): Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. Journal of Amino Acids **2012**: 1-26.

37. Ma H., Shieh K-J., Qiao T. X. (2006): Study of Transmission Electron Microscopy (TEM) and Scanning Electron Microscopy (SEM). Nature and Science **4(3)**: 14-22.

38. Marino S. M., Gladyshev V. N. (2012): Analysis and Functional Prediction of Reactive Cysteine Residues. The Journal of Biological Chemistry **287(7)**: 4419-4425.

39. Maynard A. D., Aitken R. J., Butz T., Colvin V., Donaldson K., Oberdörster G., Philbert M. A., Ryan J., Seaton A., Stone V., Tinkle S. S., Tran L., Walker N. J., Warheit D. B. (2006): Safe handling of nanotechnology. Nature **444**: 267-269.

40. Miner B. E., Meester L. D., Pfrender M. E., Lampert W., Hairston N. G. Jr. (2012): Linking genes to communities and ecosystems: *Daphnia* as an ecogenomic model. Proceedings of the Royal Society B **279(1735)**: 1873-1882.

41. Mittmann B., Ungerer P., Klann M., Stollewerk A., Wolff C. (2014): Development and staging of the water flea *Daphnia magna* (Straus, 1820; Cladocera, Daphniidae) based on morphological landmarks. EvoDevo **5(1)**: 1-19.

42. Mout R., Moyano D. F., Rana S., Rotello V. M. (2012): Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine. Chemical Society Reviews **41(7)**: 2539–2544.

43. Nowack B., Bucheli T. D. (2007): Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. Environmental Pollution **150**: 5-22.

44. Pecora R. (2000): Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. Journal of Nanoparticle Research **2:** 123–131.

45. Pokhrel R. L., Dubey B., Scheuerman P. (2013): Impacts of Select Organic Ligands on the Colloidal Stability, Dissolution Dynamics, and Toxicity of Silver Nanoparticles. Environmental Science & Technology **47**: 12877−12885.

46. Poole C. P. Jr., Owens F. J. (2003): Introduction to Nanotechnology. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.

47. Reynolds C. S. (2011): *Daphnia*: development of model organism in ecology and evolution. Freshwater Reviews **4(1)**: 85-87.

48. Roberts A. P., Mount A. S., Seda B., Souther J., Qiao R., Lin S., Ke P. C., Rao A. M., Klaine S. J. (2007): In vivo Biomodification of Lipid-Coated Carbon Nanotubes by *Daphnia magna*. Environmental Science & Technology **41(8)**: 3025–3029.

49. Roco C. M. (1999): Nanoparticles and nanotechnology research. Journal of Nanoparticle Research **1:** 1–6.

50. Seetharam R. N., Sridhar K. R. (2007): Nanotoxicity: Threat posed by nanoparticles. Current Science. **93(6)**: 769-770.

51. Shaw J. R., Pfrender M. E., Eads B. D., Klaper R., Callaghan A., Sibly R. M., Colson I., Jansen B., Gilbert D., Colbourne J. K. (2008): *Daphnia* as an emerging model for toxicological genomics. Advances in Experimental Biology **2**: 165-219.

52. Sheehan D. (2009): Physical Biochemistry: Principles and Applications. John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex.

53. Singh M., Manikandan S., Kumaraguru K. A. (2010): Nanoparticles: A New Technology with Wide Applications. Research Journal of Nanoscience and Nanotechnology **1(1)**: 1-11.

54. Singh S., Nalwa H. S. (2007): Nanotechnology and Health Safety –Toxicity and Risk Assessments of Nanostructured Materials on Human Health. Journal of Nanoscience and Nanotechnology **7**: 3048-3070.

55. Skjolding M. L., Kern K., Hjorth R., Hartmann N., Overgaard S., Ma G., Veinot J. G. C., Baun A. (2014): Uptake and depuration of gold nanoparticles in *Daphnia magna*. Ecotoxicology **23**: 1172–1183.

56. Stadtländer C. T. K-H. (2007): Scanning Electron Microscopy and Transmission Electron Microscopy of Mollicutes: Challenges and Opportunities. U: Méndez-Vilas A., Díaz J. (ur.) Modern Research and Educational Topics in Microscopy. Badajoz, Formatex, str. 122-131.

57. Stensberg M. C., Madangopal R., Yale G., Wei Q., Ochoa-Acuña H., Wei A., Mclamore E. S., Rickus J., Porterfield D. M., Sepúlveda M. S. (2014): Silver nanoparticle-specific mitotoxicity in *Daphnia magna*. Nanotoxicology **8(8)**: 833-842.

58. Ulm L., Krivohlavek A., Šikić S., Jurašin D., Ljubojević M., Šinko G., Vinković Vrček I., Crnković T., Žuntar I. (2015): Response of biochemical biomarkers in the aquatic crustacean *Daphnia magna* exposed to silver nanoparticles. Environmental Science and Pollution Research **22**: 19990–19999.

59. Wang H., Joseph J. A. (1999): Quantifying Cellular Oxidative Stress by Dichlorofluorescein Assay Using Microplate Reader. Free Radical Biology & Medicine **27**: 612–616.

60. Xu R. (2002): Particle Characterization: Light Scattering Methods. Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow.

61. Yoon K-Y., Hoon B. J., Park J-H., Hwang J. (2007): Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. Science of the Total Environment **373**: 572–5

8. ŽIVOTOPIS

Moje ime je Ema Pasariček. Rođena sam 1. siječnja 1993. god. u Zagrebu. U Zagrebu sam završila OŠ „Ivana Cankara“ i XVI. gimnaziju (dvojezični smjer). Iako sam pohađala jezičnu gimnaziju, oduvijek me interesirala biologija; posebno ekologija. Stoga sam i upisala studij Znanosti o okolišu na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Tijekom studija sudjelovala sam, uz kolege, na „Noćima biologije“ s radionicama na temu „Prehrane životinja“ i „Životinje-superjunaci“ te na radionici u Zoološkom vrtu grada Zagreba. Kroz ova događanja pokušali smo mlađim populacijama približiti znanost na zanimljiv i zabavan način. Preddiplomski studij završila sam 2014. god. s radom na temu „Utjecaj rijeke Po na riblje populacije Sjevernog Jadrana“ pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Petra Kružića.

Tijekom diplomskog studija Znanosti o okolišu probudilo se moje zanimanje za područje ekotoksikologije nakon jednog od predavanja Izv. prof. dr. sc. Domagoja Đikića na kolegiju Toksikologija okoliša. Pretpostavljam kako je moj interes potaknulo općenito razmišljanje o povezanosti čovjeka i okoliša kroz osjetljivu mrežu kojom su isprepleteni. Ona je vrlo ranjiva pa ju treba zaštiti, a prije svega probuditi svijest ljudi kako imamo velik utjecaj na prirodu koje smo i mi mali dio i koja nas održava na životu. Ksenobiotici koji se sve češće mogu pronaći u čovjeku i okolišu većinom su rezultat upravo antropogenog djelovanja. Čovjek mora zauzvrat pokušati očuvati to bogatstvo koje nije nepresušno pa tako i ja smatram da moram dati svoj doprinos. Nakon odabira ekotoksikologije, stručnu praksu sam odradila u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ u Zagrebu pod mentorstvom mr. sc. Lee Ulm, prof. biolog. i kem. u Laboratoriju za ekotoksikologiju, no bila sam i gost u raznim drugim Laboratorijima istog Zavoda. Zahvalna sam što je vođenje mog rada prihvatila dr. sc. Ivana Vinković Vrček i postala mi mentorica koja se između ostalog bavi istraživanjima ekotoksikologije nanočestica, vrlo popularne teme u današnje vrijeme. Nanočestice imaju široku primjenu, ali procjene rizika njihovog utjecaja na okoliš su rijetke i trebaju se još istražiti. Upravo zato želim biti dio ovakvih istraživanja kako bismo spriječili odnosno pravovremeno otkrili potencijalne, neželjene posljedice. Također, bila sam sudionik konferencije MODENA (“Modelling Nanomaterial Toxicity”) u Zagrebu koja se održala na temu istraživanja nanomaterijala koju je organizirala mentorica. Prijavila sam se i na Simpozij o biologiji slatkih voda u organizaciji Hrvatskog udruženja slatkovodnih ekologa gdje će biti i teme iz područja ekotoksikologije čemu se veselim.

9. PRILOZI

Prilog 1. T-test srednjih vrijednosti ispitivanih vrsta s intervalom pouzdanosti (SV-srednja vrijednost, SD-standardna devijacija, N-broj vrijednosti, SE-standardna pogreška, CI_L-donja granica intervala pouzdanosti, CI_U-gornja granica intervala pouzdanosti, DF-stupnjevi slobode).

Ispitivana vrsta	SV	SD	N	SE	CI_L (95%)	CI_U (95%)	t - vrijednost	DF	p-vrijednost
CYSAgNP 24h	10,100	5,390	5	2,410	3,408	16,792	4,190	4	0,014
CYSAgNP 48h	6,833	5,201	5	2,326	0,375	13,292	2,938	4	0,042
GSHAgNP 24h	5,950	6,196	5	2,771	-1,743	13,643	2,147	4	0,098
GSHAgNP 48h	5,117	5,794	5	2,591	-2,077	12,311	1,975	4	0,120
Ag^+ 24h	4,633	5,687	5	2,543	-2,428	11,694	1,822	4	0,143
Ag^+ 48h	4,400	5,128	5	2,293	-1,968	10,768	1,918	4	0,127
Au^{3+} 24h	7,180	6,226	5	2,784	-0,550	14,910	2,579	4	0,061
Au^{3+} 48h	5,920	6,191	5	2,769	-1,767	13,607	2,138	4	0,099

Prilog 2. Srednje vrijednosti izražene kao postotak kontrole s pripadajućim vrijednostima standardne devijacije dobivene, u istraživanju, korištenjem fluorescentne probe mBCl (SD-standardna devijacija, K-kontrola).

Ispitivana vrsta	Koncentracije (µg/L)	% kontrole	SD
K	0	100.00	3.74
CYSnanoAg	5	102.80	0.22
	10	96.87	2.28
	50	90.24	29.97
	100	62.24	12.90
GSHnanoAg	5	106.25	8.34
	10	109.39	6.21
	50	87.52	
	100	107.62	
CYSnanoAu	50	100.95	3.56
	100	101.92	6.56
	500	98.42	1.43
GSHnanoAu	50	98.79	2.31
	100	101.76	1.92
	500	90.15	3.70
Ag^+	0,1	97.17	2.93
	0,5	121.52	26.74
Au^{3+}	0,5	98.90	2.26
	1	109.96	8.35

Prilog 3. Srednje vrijednosti izražene kao postotak kontrole s pripadajućim vrijednostima standardne devijacije dobivene, u istraživanju, korištenjem fluorescentne probe DCFH-DA (SD-standardna devijacija, K-kontrola).

Ispitivana vrsta	Koncentracije (µg/L)	% kontrole	SD
K	0	100.00	3.96
CYSnanoAg	10	84.57	9.81
	20	103.37	19.00
	50	93.44	27.06
	100	80.96	9.01
GSHnanoAg	5	97.63	6.14
	10	90.67	9.91
	50	83.71	13.58
	100	44.46	12.20
CYSnanoAu	50	88.22	9.15
	100	91.14	14.18
	500	95.02	8.52
GSHnanoAu	50	83.95	9.60
	100	79.67	12.76
	500	71.07	5.13
Ag^{+}	0,1	88.37	14.15
	0,5	89.55	9.86
Au^{3+}	0,5	102.12	8.62
	1	83.03	10.71
	5	67.77	17.05

Prilog 4. Srednje vrijednosti izražene kao postotak kontrole s pripadajućim vrijednostima standardne devijacije dobivene, u istraživanju, korištenjem fluorescentne probe DHE (SD-standardna devijacija, K-kontrola).

Ispitivana vrsta	Koncentracije (µg/L)	% kontrole	SD
K	0	100.00	7.73
CYSnanoAg	5	99.57	4.59
	10	97.14	18.78
	50	94.68	5.71
	100	97.42	11.76
GSHnanoAg	5	119.09	0.29
	10	101.21	7.36
	50	108.00	6.28
CYSnanoAu	50	106.53	5.99
	100	102.03	5.05
	500	98.85	5.27
GSHnanoAu	50	105.29	4.15
	100	107.74	5.37
	500	98.55	4.63
Ag^{+}	0,1	108.16	10.26
	0,5	95.15	6.03
Au^{3+}	0,5	103.36	4.42
	1	106.57	6.81
	5	93.33	3.71