

Fitotoksični učinci nanočestica srebra stabiliziranih s različitim omotačima na duhan (*Nicotiana tabacum* L.)

Matić, Dajana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:602621>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Dajana Matić

FITOTOKSIČNI UČINCI NANOČESTICA SREBRA STABILIZIRANIH S RAZLIČITIM OMOTAČIMA NA
DUHAN (*Nicotiana tabacum* L.)

Diplomski rad

Zagreb, 2018.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Biljane Balen. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

U prvom redu zahvaljujem mentorici dr. sc. Biljani Balen, izv. prof. na ukazanom povjerenju, brojnim savjetima, uloženom vremenu i stručnoj pomoći tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem i neposrednoj voditeljici dr. sc. Petri Cvjetko na stručnim savjetima i pomoći tijekom provođenja eksperimenata.

Također zahvaljujem mag. educ. biol. et chem. Renati Bibi na velikoj pomoći u provođenju eksperimentalnog dijela rada te statističkoj obradi rezultata.

Zahvaljujem cijelom osoblju laboratorija na ugodnoj i poticajnoj radnoj atmosferi.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji na pruženoj potpori tijekom studiranja. Ovaj rad posvećujem njima.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

FITOTOKSIČNI UČINCI NANOČESTICA SREBRA STABILIZIRANIH S RAZLIČITIM OMOTAČIMA NA DUHAN (*Nicotiana tabacum* L.)

Dajana Matić

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Zbog jedinstvenih i korisnih svojstava nanočestica srebra (AgNP) povećava se njihova upotreba u različitim industrijskim i znanstvenim područjima te komercijalnim proizvodima, što neizbježno dovodi do njihovog otpuštanja u okoliš s nepoznatim posljedicama za žive organizme. Iako mehanizmi toksičnosti AgNP nisu posve razjašnjeni, jasno je da fizikalno-kemijska svojstva AgNP utječu na njihove biološke učinke. U ovom radu istraženi su učinci AgNP stabiliziranih s tri različita omotača (citrat, PVP ili CTAB), samih omotača te ionskog srebra (AgNO_3) na isključavanje i rast klijanaca duhana (*Nicotiana tabacum* L.) te na pojavu oksidacijskog stresa. Najizraženiji negativan učinak na rast klijanaca duhana je zabilježen nakon tretmana s AgNP-CTAB te omotačem CTAB, dok tretmani s AgNO_3 nisu značajno utjecali na isključavanje i rast klijanaca. Promjene u parametrima oksidacijskog stresa i aktivnosti antioksidacijskih enzima pokazale su da i AgNP i AgNO_3 izazivaju pojavu oksidacijskog stresa, ali djelovanjem različitih mehanizama. Dobiveni rezultati upućuju na zaključak da omotači koji se koriste za stabilizaciju AgNP uvelike utječu na njihovu toksičnost te da toksičnost AgNP nije posljedica otpuštanja iona Ag^+ , već djelovanja samih nanočestica.

(77 stranica, 19 slika, 2 tablice, 90 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

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

Voditelj: dr. sc. Biljana Balen, izv. prof.

Neposredni voditelj: dr. sc. Petra Cvjetko

Ocjenitelji: dr. sc. Biljana Balen, izv. prof.; dr. sc. Tatjana Bakran-Petricioli, izv. prof.; dr. sc. Sunčica Bosak, doc.

Rad prihvaćen: 1. 3. 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

PHYTOTOXIC EFFECTS OF DIFFERENTLY COATED SILVER NANOPARTICLES ON TOBACCO (*Nicotiana tabacum* L.)

Dajana Matic
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Due to their unique and beneficial properties, silver nanoparticles (AgNP) have been increasingly used in various industrial and scientific fields and commercial products. That makes environmental exposure to nanoparticles inevitable with unknown consequences on living organisms. Although the mechanisms of AgNP toxicity have not been fully elucidated, it is evident that physicochemical properties of AgNP affect their biological impacts. In this work, the effects of AgNP with three different coatings (citrate, PVP or CTAB), pure coatings and ionic silver (AgNO₃) on germination and growth of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seedlings as well as on the appearance of oxidative stress were investigated. The most prominent negative effect on tobacco seedling growth was detected in plants treated with AgNP-CTAB and CTAB coating, whereas AgNO₃ treatments had no significant impact on the germination and seedling growth. Observed changes in the parameters of oxidative stress and activity of antioxidant enzymes demonstrated that both AgNP and AgNO₃ induce oxidative stress, although by different mechanisms. The obtained results indicate that the toxicity of AgNP is greatly influenced by coatings used for their stabilization and that nanoparticles themselves account for their toxicity rather than released Ag⁺ ions.

(77 pages, 19 figures, 2 tables, 90 references, original in: Croatian language)

Thesis deposited in the Central Biological Library

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

Supervisor: dr. sc. Biljana Balen, Assoc. Prof.

Cosupervisor: dr. sc. Petra Cvjetko

Reviewers: dr. sc. Biljana Balen, Assoc. Prof.; dr. sc. Tatjana Bakran-Petricioli, Assoc. Prof.; dr. sc. Sunčica Bosak, Asst. Prof.

Thesis accepted: 1. 3. 2018.

POPIS KRATICA I SIMBOLA

AA - akrilamid

AgNP - nanočestice srebra

APS - amonijev peroksodisulfat

APX - askorbat peroksidaza

BFB - bromfenol plavo

Bis - bisakrilamid

BSA - albumin goveđeg seruma

CAT - katalaza

CBB - Coomassie Brilliant Blue

CTAB - cetiltrimetilamonijev bromid

DNPH - 2,4-dinitrofenilhidrazin

EDTA - etilendiamintetraoctena kiselina

MDA - malondialdehid

NBT - nitro-plavi tetrazolijski klorid

PAGE - poliakrilamid gel elektroforeza

PPX - pirogalol peroksidaza

PVP - polivinilpirolidon

ROS - reaktivni oblici kisika

SOD - superoksid dismutaza

TBA - tiobarbituratna kiselina

TCA - trikloroctena kiselina

TEMED - tetrametiletildiamin

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

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Nanomaterijali.....	1
1.1.1. Toksičnost nanočestica.....	2
1.1.2. Nanočestice srebra.....	5
1.2. Oksidacijski stres.....	8
1.2.1. Lipidna peroksidacija.....	9
1.2.2. Oksidacija proteina.....	10
1.2.3. Antioksidacijski enzimi.....	11
1.3. Duhan (<i>Nicotiana tabacum</i> L.).....	12
2. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	14
3. MATERIJALI I METODE.....	15
3.1. Materijal.....	15
3.1.1. Nanočestice srebra i omotači.....	15
3.1.2. Biljni materijal.....	15
3.1.2.1. Sjemenke i klijanci duhana (<i>Nicotiana tabacum</i> L.).....	15
3.2. Metode.....	18
3.2.1. Određivanje parametara rasta klijanaca duhana.....	18
3.2.1.1. Klijavost sjemenki.....	18
3.2.1.2. Morfometrija.....	18
3.2.1.3. Prirast svježe mase klijanaca.....	18
3.2.2. Ekstrakcija ukupnih topivih proteina.....	18
3.2.3. Određivanje koncentracije proteina.....	19
3.2.4. Ekstrakcija lipida i određivanje sadržaja malondialdehida.....	19
3.2.5. Određivanje sadržaja proteinskih karbonila.....	20
3.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima.....	21
3.2.6.1. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti superoksid dismutaze.....	21
3.2.6.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti pirogalol peroksidaze.....	22
3.2.6.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze.....	22
3.2.6.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze.....	23
3.2.7. Razdvajanje proteina poliakrilamid gel elektroforezom (PAGE) u nativnim uvjetima.....	24
3.2.7.1. Određivanje aktivnosti i broja izoformi antioksidacijskih enzima u gelu.....	26
3.2.7.1.1. Određivanje aktivnosti i broja izoformi superoksid dismutaze.....	26
3.2.7.1.2. Određivanje aktivnosti i broja izoformi pirogalol peroksidaze.....	26
3.2.7.1.3. Određivanje aktivnosti i broja izoformi askorbat peroksidaze.....	26
3.2.7.1.4. Određivanje aktivnosti i broja izoformi katalaze.....	27

3.3. Statistička obrada podataka.....	27
4. REZULTATI.....	28
4.1. Određivanje parametara rasta klijanaca duhana.....	28
4.1.1. Klijavost sjemenki.....	28
4.1.2. Morfometrija.....	31
4.1.3. Prirast svježe mase klijanaca.....	32
4.2. Koncentracija proteina.....	34
4.3. Sadržaj malondialdehida.....	35
4.4. Sadržaj proteinskih karbonila.....	37
4.5. Aktivnost antioksidacijskih enzima.....	39
4.5.1. Aktivnost superoksid dismutaze.....	39
4.5.2. Aktivnost pirogalol peroksidaze.....	40
4.5.3. Aktivnost askorbat peroksidaze.....	42
4.5.4. Aktivnost katalaze.....	43
4.6. Aktivnost antioksidacijskih enzima u gelu.....	45
4.6.1. Aktivnost superoksid dismutaze.....	45
4.6.2. Aktivnost pirogalol peroksidaze.....	47
4.6.3. Aktivnost askorbat peroksidaze.....	50
4.6.4. Aktivnost katalaze.....	52
5. RASPRAVA.....	53
6. ZAKLJUČAK.....	69
7. LITERATURA.....	70
8. ŽIVOTOPIS.....	77

UVOD

1. UVOD

1.1. Nanomaterijali

Nanotehnologija je multidisciplinarna grana znanosti koja obuhvaća dizajn, proizvodnju, karakterizaciju te primjenu struktura i sustava na nanometarskoj skali (Miralles i sur., 2012). Nanomaterijali su strukture čije su dimenzije ≤ 100 nm, a fizikalno-kemijska svojstva različita od istovjetnih materijala većih dimenzija (Mody i sur., 2010). Na nanorazini omjer površine prema volumenu značajno raste, što može rezultirati većom reaktivnošću materijala budući da do izražaja dolazi utjecaj površinskih atoma i kvantnog učinka na električna, optička, termalna, magnetska i biološka svojstva (Zuin i sur., 2011). Nanočestice (eng. *nanoparticles*, NP) metala su poseban tip nanomaterijala, a moguće ih je sintetizirati fizikalnim, kemijskim i biološkim metodama. Biološka metoda koja primjenjuje mikroorganizme, biljke ili biljne ekstrakte u sintezi ima znatne prednosti nad drugim metodama jer omogućuje sintezu veće količine stabilnijih nanočestica i ekološki je prihvatljiva budući da u proizvodnji ne nastaju toksični nusprodukti (Keat i sur., 2015). Osim dizajniranih nanočestica, postoje i prirodne nanočestice koje nastaju geološkim i biološkim procesima (vulkanska aktivnost, šumski požari, erozija tla itd.) te nanočestice koje su nenamjerna posljedica antropogenih aktivnosti, poput sagorijevanja tvari, vađenja ruda, različitih industrijskih procesa itd. (Rana i Kalaichelvan, 2013). Posljednjih godina znatno je porasla upotreba nanomaterijala u brojnim znanstvenim i industrijskim sektorima te u različitim komercijanim proizvodima. Nanočestice se koriste u energetici (proizvodnja, kataliza), u proizvodnji raznih materijala (abrazivi, boje, gume, tekstil), u elektronici (čipovi, ekrani), optici, remedijaciji okoliša, prehrambenoj industriji (aditivi, pakiranja), kozmetici i medicini (dijagnostika i terapija nekih bolesti, ciljani unos lijeka) (Rana i Kalaichelvan, 2013). Primjeri potencijalne primjene u agrikulturi uključuju reguliranje nutrijenata, tretman biljnih bolesti i poticanje rasta biljaka (de la Rosa i sur., 2017). Kontinuirano se razvijaju nove nanostrukture i pronalaze nove primjene, zbog čega se razvoj nanotehnologije smatra "sljedećom industrijskom revolucijom" (Rana i Kalaichelvan, 2013).

Za bilo koju primjenu nanočestica, ključan je razvoj tehnika kojima se kontrolira njihova disperzija/agregacija (Behra i sur., 2013). Nanočestice imaju tendenciju aglomerirati i u suhom i

u vlažnom mediju, što je značajan tehnički izazov u njihovoj primjeni. Fenomen aglomeracije uključuje adheziju među nanočesticama, većinom zbog Van der Waalsovih sila, koje postaju izraženije na nanorazini. Različiti parametri mogu utjecati na status aglomeracije, primjerice zeta potencijal, karakteristike fluida, pH ili koncentracija nanočestica (aglomeracija se povećava pri visokim koncentracijama zbog povećane interakcije čestica) (Dhawan i sur., 2009). Jedna od metoda kojom se sprječava aglomeracija i postiže stabilizacija nanočestica je dodavanje omotača. Omotači su osnovna komponenta u sintezi nanočestica metala kontrolirane veličine i dobro definiranog oblika, a osim deaglomeracije pružaju i dodatne funkcionalnosti česticama. Kao omotači uspješno se koriste surfaktanti, mali ligandi, polimeri, dendrimeri, ciklodekstrini i polisaharidi (Campisi i sur., 2016). Stabilizacija nanočestica ostvaruje se s tri mehanizma: elektrostatički, sterički ili kombinacijom. U slučaju elektrostatičke stabilizacije, anioni i kationi od početnih materijala ostaju u otopini i asociiraju s nanočesticama. Čestice bivaju okružene električnim dvoslojem, što rezultira Coulombovim odbijanjem koje sprječava aglomeraciju. U steričkoj stabilizaciji agregacija je sprječena zbog adsorpcije velikih molekula. Treća opcija, koja spaja steričke i elektrostatičke učinke, naziva se elektrosteričkom stabilizacijom (Jia i Schüth, 2011).

1.1.1. Toksičnost nanočestica

Povećana proizvodnja i upotreba nanočestica neizbježno dovodi do njihovog otpuštanja u okoliš, što može imati neželjene posljedice i predstavlja sigurnosni rizik za žive organizme upravo zbog specifičnih svojstava, male veličine i velike reaktivnosti nanočestica. Unatoč brojnim pogodnostima koje pruža nanotehnologija, procjena sigurnosti upotrebe nanomaterijala postaje prioritet. Potencijalni toksični učinci nanočestica na biološke sustave i okoliš moraju biti detaljno istraženi prije širenja njihove upotrebe, a to je zadaća posebne znanstvene discipline, nanotoksikologije. Općenito, u većini istraživanja koja su provedena u uvjetima *in vitro* i *in vivo*, primjenom animalnih modela, demonstrirani su značajni simptomi toksičnosti nanočestica (Jain i sur., 2017). Zbog male veličine, nanočestice mogu lako proći kroz stanične membrane, migrirati u stanicu i doprijeti do organela te promijeniti stanični metabolizam i izazvati staničnu smrt. Ako nisu dovoljno male veličine da uđu u stanicu,

nanočestice mogu interferirati sa staničnom membranom ometajući njene funkcije kao što su transport iona ili prijenos signala. Zbog određenog kemijskog sastava i fizikalnih svojstava, nanočestice mogu biti citotoksične. Naime, zbog pozitivnog električnog naboja nanočestice mogu uništiti lipidne dvosloje membrana, a omotači nanočestica također mogu interferirati sa staničnim strukturama (Fröhlich, 2012; Leroueil i sur., 2007). U organizmima nanočestice predstavljaju strane elemente s jedinstvenim fizikalno-kemijskim svojstvima, zbog kojih mogu interferirati s normalnim fiziološkim mehanizmima životinjskih embrija, životinja u razvoju i odraslih oblika (Exbrayat i sur., 2015). Netopljive nanočestice imaju potencijal proći kroz različite zaštitne barijere, prenositi se kroz organizam i akumulirati u više organa, uključujući mozak. Toksični učinci su zabilježeni na staničnoj razini, u dišnom sustavu, srčanom, reproduktivnom, bubrežnom te kožnom sustavu (Park i sur., 2010; Cohen i sur., 2013). Posebna karakteristika nanočestica je povezanost toksičnosti s površinom. Zbog njihove velike površine, male količine nanočestica mogu prouzročiti značajne toksične učinke (Rana i Kalaihelvan, 2013). Pri određivanju toksičnosti nanočestica značajne teškoće proizlaze iz razlika u veličini, obliku i formulaciji nanočestica, što bi moglo predstavljati poseban rizik kojeg se mora uzeti u obzir (Jain i sur., 2017).

U nanotoksikološkim istraživanjima od posebne je važnosti proučavanje interakcije biljaka i nanočestica. Biljke su esencijalna temeljna komponenta u ekosustavima i imaju važnu ulogu u sudbini i transportu dizajniranih nanočestica u okolišu kroz njihov unos i bioakumulaciju (Ma i sur., 2010). Budući da su biljke primarni proizvođači, ugradnja nanočestica u biljnu biomasu može rezultirati njihovim uključenjem u prehrambeni lanac, što predstavlja rizik za konzumente (Jain i sur., 2017). U biljkama se toksični učinci mogu određivati na makro (isključavanje i rast) ili mikro/molekularnoj razini (npr. morfologija stanice, stvaranje metabolita, genotoksičnost) (de la Rosa i sur., 2017). Posljedice izloženosti biljaka nanočesticama ovise o učinkovitom transportu i akumulaciji nanočestica u biljnim tkivima i organelima. Kada su nanočestice metala prisutne u mediju ili tlu, mogu se kretati kroz simplastnu ili apoplastnu regiju i proći kroz epidermu korijena i korteks te se prenijeti u izdanke i listove kroz ksilem i floem. Nanočestice nanijete preko površine listova mogu biti prenesene do korijena i drugih biljnih tkiva kroz floem. Proces translokacije i akumulacije nanočestica u biljkama nisu posve

jasni, ali očito je da ovise o više faktora, među kojima su karakteristike nanočestica, razlike među biljnim vrstama i uvjeti uzgoja biljaka (Ma i sur., 2015). Nanočestice čija je veličina unutar veličine pora stanične stijenke mogu lako prodrijeti do stanične membrane. Manje nanočestice stoga lakše ulaze u biljne stanice, dok veće mogu proći samo kroz hidatode, cvjetne stigme i puči (Hossain i sur., 2015). Međutim, neka istraživanja sugeriraju da i nanočestice veće od pora stanične stijenke mogu prodrijeti u stanicu, ovisno o njihovim svojstvima te da mogu povećati propusnost stanične stijenke oštećivanjem njezine strukture (Miralles i sur., 2012). Nanočestice mogu izazvati promjene u biljkama na morfološkoj, fiziološkoj, biokemijskoj i molekularnoj razini. Predloženi mehanizmi toksičnosti nanočestica uključuju promjene u unosu minerala u biljke, genotoksičnost, indukciju stvaranja reaktivnih oblika kisika (ROS), promjene aktivnosti antioksidacijskih enzima te smanjenje fotosinteze i izmjene plinova s negativnim posljedicama za isključivanje, rast, morfologiju i prinose u biljkama (Rizwan i sur., 2017). Dosadašnja istraživanja su pokazala pozitivne, negativne ili neutralne učinke različitih tipova nanočestica u različitim biljnim vrstama. Primjerice, u jednom istraživanju je nakon izlaganja klijanaca duhana nanočesticama aluminijskog oksida ($\text{Al}_2\text{O}_3\text{NP}$) utvrđeno znatno smanjenje prosječne duljine korijena, prosječne biomase i broja listova (Burklew i sur., 2012). Slično, tretman klijanaca vrste *Brassica napus* L. nanočesticama bakrovog oksida (CuONP) rezultirao je značajnim smanjenjem rasta korijena i izdanka te biomase; primijećen je i porast stvaranja ROS, akumulacija malondialdehida te smanjenje udjela mikronutrijenata (Nair i Chung, 2017). Suprotno tome, primjena nanočestica silicijevog oksida (SiO_2NP) na klijanca vrste *Zea mays* L. za posljedicu je imala povećanje duljine izdanka i korijena (Suriyaprabha i sur., 2012). Stimulacija rasta klijanaca i razvoja korijena zabilježena je uklijancima kikirikija nakon izlaganja nanočesticama nula-valentnog željeza pri nižim primijenjenim koncentracijama (Li i sur., 2015). Larue i sur. (2011) nisu primijetili značajne učinke nanočestica titanijevog oksida (TiO_2NP) na isključivanje vrste *Triticum aestivum*, dok su Tumburu i sur. (2015) zabilježili povećanje isključivanja vrste *Arabidopsis thaliana* nakon tretmana istom vrstom nanočestica. Značajno smanjenje udjela klorofila je utvrđeno u vrsti *Pisum sativum* L. nakon izlaganja nanočesticama cinkovog oksida (ZnONP) (Mukherjee i sur., 2014), dok su nanočestice zlata (AuNP) povećale udio klorofila u vrsti *Brassica juncea* (Arora i sur., 2012). Nanočestice niklovog oksida (NiONP) uzrokovale su

značajan porast stvaranja ROS u korijenju klijanaca rajčice (Faisal i sur., 2013). Aktivnosti antioksidacijskih enzima u klijancima pšenice izloženim $\text{Al}_2\text{O}_3\text{NP}$ povećale su se pri nižim koncentracijama, dok su pri višoj koncentraciji aktivnosti ostale podjednake ili smanjene u usporedbi s kontrolom (Riahi-Madvar i sur., 2012). Indirektni učinak na promjene u biljnom metabolizmu mogu izazvati i nanočestice koje ne ulaze u biljku, a prisutne su u hranjivom mediju ili su nakupljene na površini biljke (Miralles i sur., 2012). Nakupljanje nanočestica na površini korijenja može ometati transport vode i inhibirati transpiraciju (Asli i Neumann, 2009). Upotreba nanomaterijala različitih veličina, tipova, koncentracija te različitih biljnih vrsta u istraživanjima otežava potpuno razumijevanje složenih procesa uključenih u izazivanje fitotoksičnog odgovora. Čak i onda kada se koriste nanomaterijali iste veličine, koncentracije, s istim omotačima, razlike među biljnim vrstama i različite starosti biljaka te parametri uzgoja, poput duljine tretmana i hranjivog medija, mogu utjecati na rezultate (Montes i sur., 2017).

1.1.2. Nanočestice srebra

Srebro se koristi tisućama godina kao dragocjen metal za raznolike primjene, primjerice u izradi nakita, alata, novca, fotografskog materijala i eksploziva. Jedna od najznačajnijih primjena srebra je u medicinske svrhe kao dezinficijensa. Od antičkih vremena srebro se koristi kao antimikrobno sredstvo zbog snažnog protubakterijskog i protugljivičnog učinka. U prošlosti su se srebrne posude koristile za čuvanje vode i vina jer se vjerovalo da ovaj metal sprječava njihovo "kvarenje". Hipokrat je opisao upotrebu srebrnog praha za zacjeljivanje rana i u tretmanu čireva. U 17. i 18. stoljeću srebrov nitrat se koristio za tretman čireva, a njegova antimikrobna aktivnost je utvrđena u 19. stoljeću. Danas, srebrove soli i spojevi srebra imaju različite primjene u medicini, posebno za tretmane opekline (García-Barrasa i sur., 2011). S razvojem nanotehnologije počinje sinteza nanočestica srebra (AgNP) s fizikalno-kemijskim svojstvima različitim od srebra u izvornom obliku. Veličina AgNP je između 1 i 100 nm s oko 20-15000 atoma srebra, a mogu biti različitih oblika primjerice sferične, oktagonalne, štapićaste, cilindrične, oblika žice itd. (Tripathi i sur., 2017a). AgNP su među najviše korištenim nanomaterijalima, ponajviše zbog njihove antimikrobne učinkovitosti, poboljšane provodljivosti i optičkih funkcija. AgNP se uključuju u različite potrošačke proizvode primjerice kućanske

uređaje, filtere za vodu, kozmetiku i odjeću, a osobito je važna primjena u proizvodima koji se koriste u medicini kao što su oblozi za rane, kateteri i vaskularne proteze (Riaz Ahmed i sur., 2017). AgNP se sve više upotrebljavaju i u katalizi, elektrokemiji, bioinženjeringu, u obradi otpadnih voda, u dezinfekciji vode, u prehrambenim pakiranjima, a pokazuju i potencijal za primjenu u dijagnozi i terapiji tumora, u ciljanom unosu lijekova te *imaging*-u (Keat i sur., 2015).

Iznimno antimikrobno djelovanje AgNP dokazano je na brojnim patogenim mikroorganizmima. Baktericidni učinak AgNP ovisi o više parametara uključujući veličinu, oblik i površinski naboj. Utvrđeno je da manje i pozitivno nabijene AgNP imaju veću baktericidnu učinkovitost protiv gram-pozitivnih (*Staphylococcus aureus*) i gram-negativnih bakterija (*Escherichia coli*) (Abbaszadegan i sur., 2015). Nanosrebro se također koristi kao učinkoviti fungicid protiv nekoliko sojeva gljivica primjerice *Aspergillus fumigatus*, *Mucor*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Candida tropicalis*. AgNP imaju i antiviralna svojstva koja se mogu upotrijebiti protiv virusa HIV-a, hepatitisa B i virusa *Herpes simplex* (Tripathi i sur., 2017a). Iako antimikrobna djelotvornost čini AgNP odličnom alternativom konvencionalnim antibioticima zbog sve učestalije pojave bakterijske otpornosti na antibiotike, postoji rizik od ozbiljnih negativnih posljedica za korisne bakterije u okolišu. AgNP mogu inhibirati rast mikrobnih zajednica u tlu. Zabilježeni su toksični učinci na mikrobe kao što su heterotrofne (dušik-fiksirajuće i amonificirajuće bakterije) i kemolitotrofne bakterije u tlu. Navedene bakterije stvaraju simbiotske odnose s mahunarkama, što osigurava glavni izvor fiksanog dušika za ove, ali i druge biljke. Zbog potencijalnog toksičnog učinka za denitrificirajuće bakterije, srebro ometa procese denitrifikacije dovodeći do neravnoteže u ekosustavu (Rana i Kalaiichelvan, 2013).

Sve je više studija koje pokazuju da su AgNP toksične za različite životinjske i biljne vrste. Veliki broj istraživanja provedenih u uvjetima *in vitro* ukazuje da su AgNP toksične za stanične kulture dobivene od stanica kože, jetre, pluća, mozga, vaskularnog sustava i reproduktivnih organa sisavaca (Antony i sur., 2015). AgNP imaju potencijal inducirati ekspresiju gena povezanih s napredovanjem staničnog ciklusa te izazvati oštećenje molekule DNA i apoptozu pri dozama koje nisu citotoksične (Kawata i sur., 2009). Nadalje, toksikološka istraživanja na štakorima provedena *in vivo* pokazala su da su AgNP, unijete inhalacijom, ingestijom ili intra-peritonealnim injektiranjem, otkrivene u krvi te su pokazale toksične učinke na više organa,

uključujući mozak (Takenaka i sur., 2001; Tang i sur., 2009; Kim i sur., 2008). Dodatno, AgNP su prouzročile razvojne i strukturne deformacije u modelnim organizmima koji nisu sisavci, a koji se uobičajeno koriste za otkrivanje humanih bolesti i razvojnih abnormalnosti, kao što je vrsta *Danio rerio* (Asharani i sur., 2008; Ahamed i sur., 2010). Iako mehanizmi toksičnosti AgNP još nisu posve razjašnjeni, mnogi predloženi mehanizmi mogu se naći u literaturi. Ti mehanizmi uključuju otpuštanje iona Ag^+ s površine AgNP, interakciju AgNP sa staničnim membranama koja može rezultirati fizičkim oštećenjem te prodiranje u stanicu, što dovodi do stanične disfunkcije, stimulacije stvaranja ROS i interakcije sa specifičnim proteinima i/ili enzimima s inhibicijom njihove aktivnosti (El Badawy i sur., 2011). Toksičnost AgNP se može pripisati ili nespecifičnim interakcijama, zbog njihovih fizičkih svojstava poput veličine i oblika ili specifičnim interakcijama sa stanicama zbog kemijskog sastava, površinskog omotača ili otpuštanja iona Ag^+ (Riaz Ahmed i sur., 2017). Glavno pitanje vezano uz toksičnost AgNP je: (i) je li ona posljedica otpuštenih iona Ag^+ , (ii) samih čestica ili (iii) je posljedica njihove kombinacije. I AgNP i ioni Ag^+ mogu inducirati ROS, ali to čine drugačijim mehanizmom (Li i sur., 2017).

Biljke su primarni organizmi koji trebaju biti uključeni u nanotoksikološka istraživanja zbog svoje ključne uloge u ekosustavima. Dosadašnja istraživanja su pokazala i pozitivne i negativne učinke AgNP na različitim biljnim vrstama. Primjerice, tretman klijanaca vrste *Eruca sativa* s AgNP rezultirao je povećanjem duljine korijenja (Vannini i sur., 2013). Sličan stimulirajući učinak zabilježen je i na rast korijena i svježju masu vrste *Arabidopsis thaliana* pri određenim subletalnim koncentracijama AgNP (Wang i sur., 2013). Nasuprot tome, izlaganje klijanaca riže (*Oryza sativa* L.) nanočesticama srebra dovelo je do značajnog smanjenja duljine korijena, svježje mase korijena i izdanka te ukupnog udjela klorofila i karotenoida (Nair i Chung, 2014). U tom istraživanju zabilježen je i značajan porast stvaranja vodikovog peroksida (H_2O_2) te povećana lipidna peroksidacija u korijenju i izdancima. Kumari i sur. (2009) pokazali su citotoksični i genotoksični učinak AgNP na stanicama vrška korijena vrste *Allium cepa*. Musante i White (2012) utvrdili su fitotoksični učinak AgNP na klijanje vrste *Cucurbita pepo*; tretman je uzrokovao smanjenje biomase i transpiracije za 66 - 84%. Suprotno tome, Yasur i Rani (2013) nisu zabilježili značajne učinke na rast klijanaca vrste *Ricinus communis* L. čak ni pri visokoj koncentraciji AgNP od 4000 mg L^{-1} , dok je tretman s $AgNO_3$ inhibirao klijanje sjemenki.

Međutim, u istom istraživanju primjena AgNP i AgNO₃ na sjemenke izazvala je porast stvaranja ROS i aktivnosti antioksidacijskih enzima u klijancima. Varijabilnost rezultata posljedica je više faktora koji su povezani s karakteristikama (npr. veličina, oblik, omotači) i primijenjenim koncentracijama AgNP te razlikama među biljnim vrstama i eksperimentalnim metodama (Cox i sur., 2016).

Termodinamička stabilizacija nanočestica postiže se dodatkom omotača koji se vežu za površinu čestica (de Lima i sur., 2012). Za stabilizaciju AgNP najčešće se primjenjuju citrat, polivinilpirolidon (PVP) i cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB) (Mikac i sur., 2014). Citrat je niskomolekularni anionski omotač, PVP je neionski polimer, a CTAB kationski surfaktant. Citrat i CTAB elektrostatički stabiliziraju nanočestice, dok PVP pruža steričku stabilizaciju (Silva, 2011; Sivera i sur., 2014). Biološki učinci samih omotača nisu dovoljno istraženi i uvelike je nepoznat njihov doprinos ukupnoj toksičnosti nanočestica. Budući da potencijalno mogu povećati ili smanjiti toksičnost nanočestica, njihovo zanemarivanje u istraživanjima može dovesti do pogrešnih zaključaka.

1.2. Oksidacijski stres

Evolucija aerobnih metaboličkih procesa, kao što su respiracija i fotosinteza, za neizbježnu posljedicu imala je stvaranje ROS među kojima se ističu singletni kisik (¹O₂), superoksidni radikal (O₂⁻), H₂O₂ i hidroksilni radikal (⁻OH). Mjesta stvaranja ROS u biljnim stanicama su kloroplasti, mitohondriji, peroksisomi, stanična membrana, stanična stijenka, apoplast i endoplazmatski retikulum. Povećana razina ROS je izrazito toksična za stanice jer oni imaju sposobnost oksidacijom oštetiti ključne biološke molekule. Iako se ROS stvaraju kontinuirano u stanicama, različiti antioksidacijski mehanizmi održavaju njihovu razinu niskom što sprječava nastanak oštećenja (Das i Roychoudhury, 2014). Međutim, okolišni stresni čimbenici (suša, ekstremne temperature, UV zračenje, teški metali, patogeni organizmi itd.) pospješuju stvaranje ROS u biljkama zbog narušavanja stanične homeostaze. Kada razina ROS premaši uspješnost obrambenih mehanizama, stanica je u stanju oksidacijskog stresa. Takvo stanje je kritično za stanicu jer ROS uzrokuju lipidnu peroksidaciju, oksidaciju proteina, oštećuju

nukleinske kiseline, inhibiraju enzime i aktiviraju programiranu staničnu smrt. Unatoč toksičnom djelovanju ROS, pri umjerenj koncentraciji oni su važni sekundarni glasnici u raznim staničnim procesima, uključujući toleranciju na okolišni stres. Na koji će način ROS djelovati ovisi o osjetljivoj ravnoteži između stvaranja i uklanjanja ROS. Zbog multifunkcionalne uloge ROS, stanice moraju njihovu razinu držati pod kontrolom, ali ih ne smiju u potpunosti ukloniti. Detoksikacija viška ROS postiže se učinkovitim antioksidacijskim sustavom kojeg čine enzimski (superoksid dismutaza, katalaza, peroksidaze i dr.) i neenzimski (askorbat, glutation, karotenoidi, fenoli i dr.) antioksidansi. Porast aktivnosti antioksidacijskih enzima u biljaka izloženih stresu čini važnu komponentu obrambenog mehanizma kojim se biljke štite od oksidacijskog oštećenja (Sharma i sur., 2012a). Mjerenje sadržaja ROS u živim organizmima nije jednostavno. Budući da su ROS veoma reaktivni i imaju kratko vrijeme poluživota ne mogu se nakupiti do visokih razina, pa ih je teško mjeriti direktno, stoga se mjeri nakupljanje biomolekula ili egzogeno dodanih indikatora promijenjenih pod utjecajem ROS (Shulaev i Oliver, 2006).

1.2.1. Lipidna peroksidacija

Kada razina ROS prijeđe antioksidacijski kapacitet stanice dolazi do povećanja lipidne peroksidacije u membranama, što mijenja normalno funkcioniranje stanice. Lipidna peroksidacija pojačava oksidacijski stres kroz stvaranje lipidnih radikala koji mogu oštetiti proteine i molekulu DNA. Razina lipidne peroksidacije koristi se kao indikator oksidacijskog oštećenja membrana stanica pod stresnim uvjetima. Povećanje peroksidacije (degradacije) lipida se uočava u biljkama koje su izložene okolišnom stresu i podudara se s povećanim stvaranjem ROS. Malondialdehid (MDA) je jedan od krajnjih produkata peroksidacije nezasićenih masnih kiselina u fosfolipidima i odgovoran je za oštećenje stanične membrane. Dva glavna mjesta djelovanja ROS na molekulama fosfolipida su nezasićena (dvostruka) veza između atoma ugljika te esterska veza između glicerola i masnih kiselina (Sharma i sur., 2012a). Polinezasićene masne kiseline (PNMK) važna su komponenta stanične membrane i posebno su podložne oštećenju ROS. Hidroksilni radikal je najviše reaktivan i toksičan te ima sposobnost pokrenuti cikličnu kaskadu reakcija i uzrokovati peroksidaciju više PNMK. Proces lipidne

peroksidacije se može podijeliti u tri različite faze: inicijaciju, propagaciju i terminaciju. Inicijacija uključuje aktivaciju O_2 pri čemu nastaju radikali kao što su O_2^- i $\cdot OH$. Takvi ROS reagiraju s metilnim skupinama PNMK stvarajući konjugirane diene, lipidne peroksilne radikale i hidroperoksidi. Peroksilni radikali imaju sposobnost dalje potaknuti propagaciju lipidne peroksidacije oduzimanjem atoma vodika od susjednih bočnih lanaca PNMK. Lipidni hidroperoksidi reakcijom s reduciranim metalima, kao što je Fe^{2+} , prolaze cijepanje. Različiti reaktivni oblici, među kojima su lipidni alkoksilni radikali, aldehidi, alkani, lipidni epoksidi i alkoholi, mogu nastati raspadom lipidnih hidroperoksida. Lipidna peroksidacija završava formiranjem različitih lipidnih dimera koji nastaju djelovanjem lipidnih radikala. Lipidna peroksidacija povećava fluidnost membrane i oštećuje membranske proteine i ionske kanale (Das i Roychoudhury, 2014). Krajnji produkti lipidne peroksidacije, kao što su 4-hidroksinonenal (4-HNE) i MDA, generalno su prihvaćeni kao indikatori oksidacijskog stresa. Količina MDA može se odrediti spektrofotometrijski na temelju reakcije MDA i tiobarbituratne kiseline (TBA), nakon čega se produkti reakcije mjere pri valnoj duljini od 532 nm (Shulaev i Oliver, 2006).

1.2.2. Oksidacija proteina

ROS mogu modificirati proteine na različite direktne i indirektne načine. Direktne promjene koje utječu na proteinsku aktivnost uključuju nitrozilaciju ili nitraciju tirozinskih ostataka, karbonilaciju specifičnih aminokiselinskih ostataka, stvaranje unakrsnih disulfidnih mostova i glikoksidacijskih adukata te glutationilaciju. Indirektna oksidacija proteina može biti uzrokovana njihovom reakcijom s produktima lipidne peroksidacije npr. s 4-HNE ili interakcijom ROS s metalnim kofaktorima. Oksidacijske promjene proteina su uglavnom ireverzibilne. Karbonilacija proteina uključuje oksidaciju (a) proteinske okosnice, dovodeći do stvaranja proteinskih fragmenata s N-terminalnim α -ketoacilnim aminokiselinskim ostatkom te (b) nekih aminokiselinskih bočnih lanaca (posebno histidina, arginina i lizina), čime nastaju ketoni ili aldehidi. Proteinska karbonilacija može biti uzrokovana i reakcijom proteina s produktima lipidne peroksidacije ili konjugacijom proteina s reducirajućim šećerima (glikacija) ili njihovim oksidacijskim produktima (glikoksidacija). Udio proteinskih karbonila često je korišten pokazatelj proteinske oksidacije inducirane ROS-om u biljaka izloženih stresnim čimbenicima.

Spektrofotometrijsko određivanje količine hidrazona, produkta reakcije proteinskih karbonilnih grupa s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH), uobičajen je način određivanja udjela karboniliranih tj. oksidiranih proteina (Anjum i sur., 2015).

1.2.3. Antioksidacijski enzimi

Superoksid dismutaza (SOD) ima središnju ulogu u obrani od oksidacijskog stresa u svim aerobnim organizmima. Ovaj enzim pripada grupi metaloenzima i katalizira dismutaciju O_2^- u O_2 i H_2O_2 , a prisutan je u većini substancičnih odjeljaka u kojima se odvija aktivacija kisika. U biljkama postoje tri izoenzima SOD, koji se razlikuju prema metalnom ionu kojeg vežu: bakar/cink SOD (Cu/Zn-SOD), mangan SOD (Mn-SOD) i željezo SOD (Fe-SOD). Mn-SOD se nalazi u mitohondrijima, Fe-SOD u kloroplastima, a Cu/Zn-SOD se može naći u citoplazmi, kloroplastima, peroksisomima i mitohondrijima. Eukariotski izoenzim Cu/Zn-SOD je dimer, dok druga dva izoenzima mogu biti dimeri ili tetrameri. Povećana aktivnost SOD obično je povezana s porastom tolerancije biljaka na okolišni stres (Sharma i sur., 2012a).

Nespecifične peroksidaze (POX) kataliziraju pretvorbu H_2O_2 u H_2O oksidacijom različitih supstrata koji služe kao donori elektrona. Enzimi POX se nazivaju prema supstratu kojeg oksidiraju; primjerice pirogalol peroksidaza (PPX) kao donor elektrona koristi pirogalol. Ove peroksidaze pripadaju peroksidazama klase III i imaju ključne uloge u razvojnem ciklusu biljaka. POX su uključene u razne fiziološke procese poput metabolizma stanične stijenke, lignifikacije, suberinizacije, metabolizma auksina, zarastanja rana, rasta i sazrijevanja plodova, obrane od patogena itd. Postoji više izoformi POX koje su prisutne na raznim mjestima u stanici. Peroksidaze se svrstavaju u indikatore stresa u biljkama jer se njihova razina znatno povećava pod utjecajem stresnih čimbenika (Pandey i sur., 2017).

Askorbat peroksidaza (APX) je ključna komponenta askorbat-glutationskog ciklusa i ima esencijalnu ulogu u kontroli razine ROS u stanici. APX koristi dvije molekule askorbinske kiseline za redukciju H_2O_2 u H_2O što je združeno s nastankom dvije molekule monodehidroaskorbinske kiseline. Enzim APX pripada klasi I iz superobitelji hem peroksidaza, a njegova aktivnost regulirana je redoks signalima i H_2O_2 . Prema aminokiselinskim sekvencama, postoji pet kemijski

i enzimski različiti izoenzima APX u višim biljkama. To su citoplazmatska, stromalna, tilakoidna, mitohondrijska i peroksisomalna izoforma. APX je jedan od najviše zastupljenih antioksidacijskih enzima u biljnim stanicama i izoforme APX imaju mnogo veći afinitet za H_2O_2 od CAT zbog čega je APX veoma učinkovita pod stresnim uvjetima. Mnoga istraživanja ukazuju na povećanu aktivnost APX u odgovoru biljaka na razne abiotičke stresne čimbenike (Sharma i sur., 2012a).

Katalaza (CAT) je tetramerni enzim koji sadrži skupinu hem, a odgovoran je za kataliziranje dismutacije dvije molekule H_2O_2 u H_2O i O_2 . Ima veliku specifičnost za H_2O_2 , ali manju za organske perokside. Biljke imaju više enzima za uklanjanje H_2O_2 , ali CAT je jedinstvena jer ne zahtijeva stanični reducirajući ekvivalent. Peroksisomi su glavna mjesta nastajanja H_2O_2 . Iako postoje naznake o prisutnosti CAT u citoplazmi, kloroplastima i mitohondrijima, značajna aktivnost na tim mjestima još nije ustanovljena (Sharma i sur., 2012a). Kritosjemenjače imaju tri gena CAT. Gen CAT1 je eksprimiran u peludu i sjemenkama (prisutan u peroksisomima i citoplazmi), CAT2 je predominantno eksprimiran u fotosintetskim tkivima, ali i u korijenju i sjemenkama (prisutan u peroksisomima i citoplazmi), dok je gen CAT3 eksprimiran u listovima i vaskularnim tkivima (prisutan u mitohondrijima) (Das i Roychoudhury, 2014). Okolišni stresni čimbenici uzrokuju ili porast ili smanjenje aktivnosti CAT ovisno o intenzitetu, trajanju i tipu stresa (Sharma i sur., 2012a).

1.3. Duhan (*Nicotiana tabacum* L.)

Ovo istraživanje je provedeno na sjemenkama i klijancima duhana (*Nicotiana tabacum* L.). Duhan pripada porodici pomoćnica (Solanaceae), a podrijetlo biljke se veže za Južnu Ameriku. Danas se *Nicotiana* uzgaja širom svijeta zbog listova koji se koriste u duhanskim proizvodima. Kemijski sastav listova duhana je veoma složen, a od brojnih alkaloida u njemu ističe se nikotin koji je odgovoran za indukciju ovisnosti u ljudi. Nikotin se sintetizira u korijenu i prenosi do listova kroz ksilem. Drugi tipovi alkaloida iz duhana, primjerice nornikotin i miosmin, imaju štetne učinke za ljudsko zdravlje zbog karcinogenih svojstava (Sun i sur., 2013). *Nicotiana tabacum* L. je izvrsna modelna biljka za primjenu u kulturama *in vitro*, genetičkom inženjerstvu i biotehnologiji zbog jednostavnosti uzgoja, kratkog životnog ciklusa i lake transformacije.

Radeći na kulturi tkiva duhana, Murashige i Skoog (1962) su razvili sastav hranjivog medija za kulture *in vitro* koji se i danas primjenjuje za brojne druge biljne vrste (Ganapathi i sur., 2004).

CILJ ISTRAŽIVANJA

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Posljednjih godina znatno je porasla upotreba različitih tipova nanomaterijala u industriji, biotehnologiji, biomedicini, brojnim komercijalnim proizvodima, pa čak i u agrikulturi i pročišćavanju otpadnih voda. Neizbježno će doći do njihovog otpuštanja u okoliš, što može imati neželjene posljedice za žive organizme prvenstveno zbog njihovih malih dimenzija i velike reaktivnosti. Nanotoksikološka istraživanja provedena na biljkama ne daju jednoznačne rezultate. Nanočestice srebra (AgNP) su jedan od najviše korištenih tipova nanomaterijala, a radi njihove stabilizacije često im se dodaju različiti omotači. Stoga je ovo istraživanje bilo usmjereno na učinke primjene AgNP stabiliziranih s tri tipa omotača (citrata, PVP ili CTAB), ionskog srebra (AgNO_3) te samih omotača na klijance duhana (*Nicotiana tabacum* L.), a ciljevi su bili utvrditi:

1. Utječu li ispitane koncentracije AgNP na isključivanje sjemenki duhana, duljinu korjenčića i promjenu mase klijanaca,
2. Uzrokuju li ispitane koncentracije AgNP promjenu ukupne količine proteina,
3. Utječu li ispitane koncentracije AgNP na pojavu oksidacijskog stresa u klijancima duhana,
4. Postoje li razlike u istraženim parametrima s obzirom na omotač za stabilizaciju AgNP,
5. Usporediti učinak ispitanih koncentracija AgNP na navedene parametre s učinkom istih koncentracija AgNO_3 te s učinkom kojeg izazivaju sami omotači primijenjeni u dvije koncentracije.

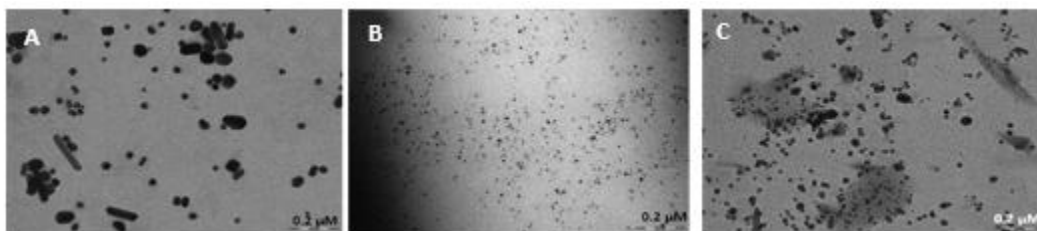
MATERIJALI I METODE

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijal

3.1.1. Nanočestice srebra i omotači

Nanočestice srebra su priređene redukcijskim postupkom iz AgNO_3 te stabilizirane s tri tipa omotača: citratom, polivinilpirolidonom (PVP) i cetiltrimetilamonijevim bromidom (CTAB). Time su dobivena tri tipa nanočestica: AgNP-citrat (negativno nabijene), AgNP-PVP (neutralne) i AgNP-CTAB (pozitivno nabijene). Sve nanočestice su bile približno jednake veličine (promjer oko 50 nm). Nanočestice je priredila dr. sc. Ivana Vinković Vrček s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.



Slika 1. Nanočestice srebra (AgNP) priređene iz AgNO_3 i stabilizirane s tri tipa omotača: A) citratom (AgNP-citrat), B) polivinilpirolidonom (PVP; AgNP-PVP) te C) cetiltrimetilamonijevim bromidom (CTAB; AgNP-CTAB). AgNP je priredila dr. sc. Ivana Vinković Vrček, a snimila doc. dr. sc. Petra Peharec Štefanić.

3.1.2. Biljni materijal

3.1.2.1. Sjemenke i klijanci duhana (*Nicotiana tabacum* L.)

Sjemenke duhana sam sterilizirala inkubacijom u 50%-tnoj (v/v) otopini natrijevog hipoklorita (NaOCl) 15 min na miješalici, nakon čega sam ih isprala autoklaviranom deH_2O tri puta. Potom sam mikropipetom nasadila po 50 sjemenki na sterilizirane krute hranjive podloge koje su sadržavale upola manju koncentraciju soli podloge po Murashige i Skoog-u (1962; $\frac{1}{2}$ MS) (Tablica 1) u petrijevim zdjelicama s dodatkom odgovarajućih volumena otopina: (i) AgNP (AgNP-citrat, AgNP-PVP ili AgNP-CTAB), kako bi se postigle koncentracije od 25, 50, 75, 100 i 150 μM , (ii) AgNO_3 (istovjetne koncentracije) i (iii) samih omotača (citrat, PVP ili CTAB), kako bi se postigle koncentracije od 10 i 25 μM . Sjemenke sam također nasadila i na kontrolne podloge. Za svaki tretman napravila sam dvije replike. Petrijeve zdjelice zatvorila sam parafilmom te ih

stavila u komoru za uzgoj biljaka (intenzitet svjetlosti $90 \text{ mE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura $24 \text{ }^\circ\text{C}$). Broj iskljalih sjemenki sam bilježila svaki dan tijekom 5 dana. Tri tjedna nakon postavljanja sjemenki na pokuse, klijance sam uzorkovala za analize utjecaja navedenih tretmana na duljinu korjenčića i prirast svježe mase klijanaca.

Sjemenke duhana sterilizirala sam na prethodno opisan način, a zatim sam ih nasadila u sterilizirane tekuće podloge $\frac{1}{2}$ MS u Erlenmeyerovim tikvicama od 100 mL. Sjemenke su uzgajane dva tjedna na tresilici u komori (intenzitet svjetlosti $90 \text{ mE m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, temperatura $24 \text{ }^\circ\text{C}$) dok nisu proklijale. Dva tjedna stare klijance tretirala sam 7 dana u tekućim podlogama s već navedenim koncentracijama sva tri tipa AgNP, AgNO_3 te s dvije koncentracije samih omotača. Postavila sam i odgovarajuće kontrole. Za svaki tretman nasadila sam sjemenke u dvije tikvice. Nakon završetka tretmana, klijance sam uzorkovala, liofilizirala i analizirala parametare oksidacijskog stresa.

Tablica 1. Sastav hranjive podloge ½ MS pH 5.6 (Murashige i Skoog, 1962)

MAKROELEMENTI	mg L⁻¹
KNO ₃	950
NH ₄ NO ₃	825
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	220
KH ₂ PO ₄	85
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	185
MIKROELEMENTI	mg L⁻¹
H ₃ BO ₃	6.2
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0.025
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0.25
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0.025
MnSO ₄ × 4 H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	8.6
ŽELJEZO	mg L⁻¹
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	27.8
Na ₂ EDTA	37.3
ORGANSKI DODACI	mg L⁻¹
m-inozitol	50
tiamin-HCl	0.05
saharoza	1500
MES-kalijeva sol	500

3.2. Metode

3.2.1. Određivanje parametara rasta klijanaca duhana

3.2.1.1. Klijavost sjemenki

Broj iskljajalih sjemenki bilježila sam svaki dan u periodu od 5 dana, za svaki tretman pojedinačno. Postotak klijavosti za sve tretmane i kontrolu sam izračunala prema formuli: postotak klijavosti (%) = (broj iskljajalih sjemenki/ukupan broj nasađenih sjemenki) × 100.

3.2.1.2. Morfometrija

Tri tjedna nakon postavljanja sjemenki na pokuse, ravnalom sam izmjerila duljinu korjenčića 10 nasumično odabranih klijanaca u 6 replika za svaki tretman i kontrole.

3.2.1.3. Prirast svježe mase klijanaca

Svježu masu tri tjedna starih klijanaca sa svih tretmana i kontrola izvagala sam na elektroničkoj vagi. Uzela sam po 10 nasumično odabranih klijanaca u 6 replika za svaki tretman i kontrole.

3.2.2. Ekstrakcija ukupnih topivih proteina

Klijance sam pincetom izvadila iz tikvica, isprala ih s deH₂O i posušila na papirnatom ručniku. Nakon toga sam ih zapakirala u aluminijske folije i označila. Paketići su držani na -80 °C do liofilizacije, prije koje sam iglicom na više mjesta probušila površinu paketića. Nakon liofilizacije u trajanju od 24 h, a prije daljnjih postupaka, paketići su čuvani u eksikatoru. Za ekstrakciju proteina izvagala sam 0.06 g liofiliziranog tkiva klijanaca, po 6 replika od svake koncentracije AgNP, AgNO₃ i omotača. Tkivo sam zatim prebacila u tarionik na ledu, dodala 1.5 mL hladnog 0.1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7.0 i polivinilpirolidona na vrhu spatule (oko 10 mg) te homogenirala tkivo pomoću tučka. Homogenat sam zatim prebacila u tubicu. Svi uzorci su prije centrifugiranja držani na ledu. Homogenati su prvo centrifugirani 15 min na 20817 g pri 4 °C, nakon čega sam supernatante prebacila u čiste tubice te ponovo stavila na centrifugiranje 60

min na 20817 g pri 4 °C. Supernatante sam ponovo prebacila u čiste tubice i spremila ih na -20 °C za daljnje analize.

3.2.3. Određivanje koncentracije proteina

Koncentracije proteina u uzorcima odredila sam metodom po Bradfordu (1976). Pripremila sam Bradford matičnu otopinu (0.01% boja *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250; 31.35% (v/v) etanol; 58.6% (v/v) H₃PO₄), a potom ju upotrijebila za pripremu Bradford radne otopine (2.58% (v/v) etanol; 5.28% (v/v) H₃PO₄; 6% (v/v) Bradford matična otopina), koju sam dalje koristila za određivanje koncentracije proteina. Standardnu krivulju napravila sam mjerenjem apsorbancija otopina albumina goveđeg seruma (eng. *bovine serum albumin*, BSA) poznatih koncentracija (0.2 - 2.0 mg mL⁻¹), koje su bile pripremljene u 0.1 M kalij-fosfatnom puferu pH 7.0. Za mjerenje sam u tubicu pipetirala 20 µL uzorka i 980 µL Bradford radne otopine, a zatim sam sadržaj kratko vorteksirala te izlila u kivetu. Apsorbancije sam mjerila spektrofotometrom ATI/Unicam UV/Vis UV4-100 (Cambridge, UK) na valnoj duljini od 595 nm. Koncentraciju (mg mL⁻¹) proteina u uzorcima odredila sam ekstrapolacijom prema standardnoj krivulji.

3.2.4. Ekstrakcija lipida i određivanje sadržaja malondialdehida

Za ekstrakciju lipida izvagala sam 0.045 g liofiliziranog tkiva klijanaca, po 6 replika od svake koncentracije AgNP, AgNO₃ i omotača. Zatim sam tkivo homogenirala u tarioniku u 1500 µL ekstrakcijske smjese (0.3% (w/v) tiobarbituratna kiselina (TBA) u 10% (w/v) trikloroctenoj kiselini (TCA)). Ekstrakte sam potom prebacila u tubice za daljnje postupke.

Za određivanje sadržaja malondialdehida (MDA), kao pokazatelja razine lipidne peroksidacije, koristila sam metodu prema autorima Heath i Packer (1968). Ekstrakte sam zagrijavala 30 min na 95 °C u termomikseru pri čemu sam tubice držala otvorene jer smjesa vrije. Nakon toga ekstrakte sam ohladila na ledu nekoliko minuta te ih stavila na centrifugiranje 30 min na 20817 g pri 4 °C. Supernatante sam zatim prebacila u kivete i spektrofotometrijski izmjerila apsorbancije na 532 i 600 nm, jer je potrebno izvršiti korekciju za nespecifično

zamućenje ($\Delta A = A_{532} - A_{600}$). Za slijepe probe koristila sam smjesu od 200 μL 0.1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7.0 i 1500 μL ekstrakcijske smjese. Sadržaj MDA (u $\mu\text{mol g}^{-1}$ svježe tvari) sam odredila prema jednadžbi:

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

pri čemu je:

A_{532} - apsorbancija mjerena na 532 nm

A_{600} - apsorbancija mjerena na 600 nm

m - masa tkiva (g)

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

l - duljina optičkog puta (1 cm)

Rezultati su iskazani kao srednja vrijednost 6 replika \pm standardna pogreška.

3.2.5. Određivanje sadržaja proteinskih karbonila

Sadržaj proteinskih karbonila, kao pokazatelja oksidacije proteina, odredila sam metodom prema Levinu i sur. (1994), koja se temelji na reakciji karbonilnih skupina s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH). Prvo sam pripremila dva seta tubica: u jedan set sam pipetirala po 20 μL proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.2.2.), 180 μL 0.1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7.0 i 300 μL 10 mM DNPH u 2 M HCl. U drugi, kontrolni set sam pipetirala 20 μL proteinskog ekstrakta, 180 μL 0.1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7.0 i 300 μL 2 M HCl. Oba seta sam potom vorteksirala te ostavila na sobnoj temperaturi 1 sat u mraku, uz povremeno protresanje. Nakon toga, u sve tubice sam dodala po 500 μL 10% (w/v) TCA za precipitaciju proteina te ih ostavila 5 min na -20°C . Uzorke sam potom stavila na centrifugiranje 10 min na 20817 g pri 4°C . Nakon što sam odlila supernatant, nastali talog sam isprala tri puta s po 500 μL otopine etanol/etilacetat (1:1) radi uklanjanja nevezanog reagensa. Taloge sam otapala u 1 mL 6 M uree u 20 mM kalij-fosfatnom puferu pH 2.4 na vorteksu. ApSORBANCije uzoraka sam mjerila spektrofotometrijski na 370 nm, pri čemu je svaki uzorak imao svoju slijepu probu (bez dodatka DNPH). Sadržaj proteinskih karbonila ($\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteina) odredila sam prema jednadžbi:

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

pri čemu je:

A_{370} - apsorbancija mjerena na 370 nm

m - koncentracija proteina ($\text{mg proteina mL}^{-1}$)

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

l - duljina optičkog puta (1 cm)

Rezultati su iskazani kao srednja vrijednost 6 replika \pm standardna pogreška.

3.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima

3.2.6.1. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti superoksid dismutaze

Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) odredila sam metodom prema Beauchampu i Fridovichu (1971). Prvo sam pripremila reakcijsku smjesu koja je sadržavala 13 mM metionina, 75 μM nitro-plavi tetrazolijski klorid (eng. *nitroblue tetrazolium*, NBT) i 0.1 M etilendiamintetraoctenu kiselinu (EDTA). U kivete sam dodala 800 μL reakcijske smjese, 190 μL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7.8 i 10 μL 1 mM riboflavina. Neposredno nakon dodatka riboflavina, sadržaj kiveta sam promiješala te ih stavila na 8 min pod svjetlost transiluminatora (15 W) u zamračenoj prostoriji. NBT se reducira u prisutnosti O_2^- u netopljivi, plavo obojeni formazan čiji je maksimum apsorbancije na 560 nm. Redukciju NBT inhibira prisutnost SOD. Za slijepu probu sam koristila navedenu smjesu koja nije bila na svjetlosti. Nakon toga sam na isti način koristila navedenu smjesu, ali sa smanjenim volumenom kalij-fosfatnog pufera i proporcionalnim volumenom svakog proteinskog uzorka (poglavlje 3.2.2.), tako da se pri mjerenju postigne smanjenje apsorbancije od 50%. Osim s proteinskim uzorcima, postupak sam provela i sa SOD standardima (otopine poznatih koncentracija SOD u rasponu 0.025 - 1 U μL^{-1}), na temelju kojih sam napravila standardnu krivulju prema kojoj sam odredila aktivnost SOD u svakom uzorku. Rezultati mjerenja apsorbancija su linearizirani tako što su vrijednosti neinhibirane kontrole (maksimum apsorbancije) podijeljene s vrijednostima uzoraka odnosno SOD standarda. Aktivnost SOD je izražena kao $\mu\text{mol produkta min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteina}$. Rezultati su iskazani kao srednja vrijednost 6 replika \pm standardna pogreška.

3.2.6.2. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti pirogalol peroksidaze

Za određivanje aktivnosti PPX koristila sam metodu prema autorima Nakano i Asada (1981). Reakcijsku smjesu sam pripremila otapanjem 0.126 g pirogalola u 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7.0. Neposredno prije mjerenja dodala sam 5.5 μL H_2O_2 . Reakcijska smjesa je držana u tamnoj bočici. Za slijepu probu u kivetu sam dodala 980 μL reakcijske smjese i 20 μL 0.1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7.0. Za mjerenje aktivnosti PPX u kivetu sam dodala 980 μL reakcijske smjese i 20 μL proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.2.2.). Mjerila sam porast apsorbancije svakih 15 sekundi tijekom 1 min pri 430 nm. Aktivnost PPX sam izrazila kao količinu nastalog produkta u jedinici $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteina prema jednadžbama:

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

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

pri čemu je:

$\Delta A(s.v.)$ - srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 430 nm u 15 s

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

$V(r.s.)$ - volumen reakcijske smjese (1 mL)

F.R. - faktor razrjeđenja uzorka (1)

$V(uz)$ - volumen uzorka (0.02 mL)

ϵ - molarni apsorpcijski koeficijent ($2.47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

l - duljina optičkog puta (1 cm)

Rezultati su iskazani kao srednja vrijednost 6 replika \pm standardna pogreška.

3.2.6.3. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti askorbat peroksidaze

Aktivnost APX odredila sam metodom prema Nakanu i Asadi (1981). Na početku sam pripremila otopine 10 mM EDTA, 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7.0, 10 mM askorbinske kiseline te pufer 1 (50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7.0 i 500 μL 10 mM EDTA). Otopinu

12 mM H₂O₂ sam pripremila neposredno prije mjerenja. Za pripremu slijepa probe u UV-kivetu dodala sam 800 µL pufera 1, 180 µL 0.1 M kalij-fosfatnog pufera, 10 µL 10 mM askorbinske kiseline i na kraju 10 µL 12 mM H₂O₂. Za mjerenje aktivnosti APX u uzorcima, u UV-kivete dodala sam 800 µL pufera 1, 180 µL proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.2.2.), 10 µL 10 mM askorbinske kiseline i 10 µL 12 mM H₂O₂. Mjerila sam pad apsorbancije (zbog smanjivanja količine askorbata) svake sekunde tijekom 15 s pri 290 nm. Aktivnost APX sam izrazila kao smanjenje količine askorbata u jedinici µmol_{produkta} min⁻¹ mg⁻¹_{proteina} prema jednadžbama:

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

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

pri čemu je:

ΔA(s.v.) - srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 290 nm u 15 s

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

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

F.R. - faktor razrjeđenja uzorka (1)

V(uz) - volumen uzorka (0.18 mL)

ε - molarni apsorpcijski koeficijent (2.8 mM⁻¹ cm⁻¹)

l - duljina optičkog puta (1 cm)

Rezultati su iskazani kao srednja vrijednost 6 replika ± standardna pogreška.

3.2.6.4. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti katalaze

Za određivanje aktivnosti katalaze (CAT) koristila sam metodu prema Aebi (1984). Prvo sam pripremila reakcijsku smjesu koja je sadržavala 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7.0 i 51 µL H₂O₂. Za slijepu probu sam u UV-kivetu odpipetirala 980 µL reakcijske smjese i 20 µL 0.1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7.0. Za mjerenje aktivnosti CAT u uzorcima, u UV-kivete sam

pipetirala 980 μL reakcijske smjese i 20 μL proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.2.2.). Mjerila sam pad apsorbancije (zbog smanjivanja količine H_2O_2) svakih 10 s tijekom 2 min na 240 nm. Aktivnost CAT je izražena kao smanjivanje količine H_2O_2 u jedinici $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{proteina}}$ prema jednadžbama:

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

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A \mu\text{mol} / \text{min mL}}{\text{mg}(\text{proteina}) / \text{mL}} [\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg}^{-1}_{\text{proteina}}]$$

pri čemu je:

$\Delta A(s.v.)$ - srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 240 nm u 10 s

6 - faktor korekcije za $\Delta A(s.v.)$ za izražavanje rezultata u minuti

$V(r.s.)$ - volumen reakcijske smjese (1 mL)

$F.R.$ - faktor razrjeđenja uzorka (1)

$V(uz)$ - volumen uzorka (0.02 mL)

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

l - duljina optičkog puta (1 cm)

Rezultati su iskazani kao srednja vrijednost 6 replika \pm standardna pogreška.

3.2.7. Razdvajanje proteina poliakrilamid gel elektroforezom (PAGE) u nativnim uvjetima

Za analizu i razdvajanje različitih izoformi enzima može se koristiti gel elektroforeza u nativnim uvjetima tijekom koje pokretljivost proteina u poliakrilamidnom gelu ovisi o njihovoj gustoći naboja, molekulskoj masi i izoelektričnoj točki (Balen i sur., 2011).

Radila sam prema postupku koji je opisan u Balen i sur. (2011). Na početku sam sastavila aparaturu za vertikalnu elektroforezu. Staklene ploče sam očistila 96%-tnim etanolom, a prilikom njihovog sastavljanja između ploča sam stavila razmaknice pazeći da su svi rubovi poravnati. Stakla sam umetnula u postolje aparature i učvrstila pomoću vijaka. Smjese za gelove sam pripremila prema Tablici 2. Amonijev peroksodisulfat (APS) inducira reakciju polimerizacije gela, a tetrametiletilendiamin (TEMED) je katalizator, pa se oni dodaju zadnji u smjesu. Pipetom

sam ulila otopinu gela za razdvajanje između staklenih ploča, pazeći pri tome da se ne naprave mjehurići zraka te da razina otopine gela bude nekoliko cm ispod vrha nižeg stakla. Gel sam nadsvodila mješavinom 20%-tnog etanola i nekoliko kapljica boje bromfenol plavo (eng. *BromoPhenol Blue*, BFB) kako bi se spriječio kontakt sa zrakom te zakrivljenje rubova gela. Nakon polimerizacije sam odlila smjesu etanola i boje, isprala prazan prostor između ploča s deH₂O te na polimerizirani gel za razdvajanje nanijela otopinu gela za koncentriranje te utisnula češalj za oblikovanje jažica za nanošenje uzoraka. Po završetku polimerizacije, pažljivo sam uklonila češalj kako ne bih oštetila jažice. Nakon toga sam gelove postavila na elektrodni nosač i u kadicu za elektroforezu te ulila elektrodni pufer koji je sadržavao 0.25 M Tris i 1.92 M glicin. Uzorke sam, prije nanošenja na gel, priredila tako što sam proteinske ekstrakte pomiješala s 10 µL 0.5%-tne otopine saharoze i boje BFB čime se omogućuje ravnomjernije smještanje uzoraka u jažice te njihova vizualizacija dok putuju kroz gel. Nanosila sam 90 µg proteina po jažici koristeći iglu *Hamilton* (Reno, Nevada, SAD). Gornji prostor sam nadopunila s elektrodnim puferom, stavila poklopac i priključila elektrode s izvorom struje. Elektroforeza se provodila u kadici *PROTEAN® II xi Cell* (Bio-Rad, SAD) na 4 °C (u hladnjaku); prvih 45 min pri naponu od 100 V (dok uzorci ne dođu do gela za razdvajanje), a zatim pri 220 V do kraja elektroforeze. Nakon zaustavljanja elektroforeze, rastavila sam aparaturu i pažljivo odvojila gelove od stakala. Daljnji tretman gelova je ovisio o analiziranom enzimu.

Tablica 2. Sastav gelova za elektroforezu u nativnim uvjetima

otopine	gel za razdvajanje (10%)	gel za koncentriranje (4%)
redestilirana H ₂ O (reH ₂ O)	16.8 mL	6.1 mL
Tris-HCl	10 mL (1.5 M; pH 8.8)	2.5 mL (0.5 M; pH 6.8)
akrilamid/bisakrilamid (AA/Bis)	13.2 mL	1.3 mL
10% APS	200 µL	50 µL
TEMED	20 µL	10 µL

3.2.7.1. Određivanje aktivnosti i broja izoformi antioksidacijskih enzima u gelu

3.2.7.1.1. Određivanje aktivnosti i broja izoformi superoksid dismutaze

Nakon završetka elektroforeze, gel sam prvo inkubirala 25 min u otopini koju sam pripremila otapanjem 100 mg NBT u 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7.8. Nakon toga sam pomiješala 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7.8, 100 μ L 2 mM riboflavina i 425 μ L TEMED te u toj otopini inkubirala gel 15 min u mraku na sobnoj temperaturi. Gel sam zatim izložila svjetlosti transiluminatora dok se na ljubičastoj podlozi nisu pojavile akromatske vrpce koje predstavljaju izoforme SOD (Beauchamp i Fridovich, 1971). Gel sam izvadila iz otopine i skenirala.

3.2.7.1.2. Određivanje aktivnosti i broja izoformi pirogalol peroksidaze

Za detekciju izoformi PPX, gelove sam tretirala prema protokolu Chance i Maehly (1955). Nakon završetka elektroforeze, gel sam inkubirala 30 min u 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7.0, a potom u 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7.0 u koji sam dodala 0.252 pirogalola (20 mM) i 40 μ L H₂O₂ (4 mM), u trajanju od oko 10 min ili dok se nisu pojavile žuto-smeđe vrpce. Neposredno nakon pojave vrpce gel sam skenirala jer obojenje brzo nestaje.

3.2.7.1.3. Određivanje aktivnosti i broja izoformi askorbat peroksidaze

Za elektroforetsko razdvajanje izoformi APX bilo je potrebno otopiti 1.761 g askorbinske kiseline u 5 L elektrodnog pufera. Nakon elektroforeze gel sam inkubirala tri puta po 10 min u otopini koju sam pripremila otapanjem 0.106 g askorbinske kiseline u 300 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7.0. Zatim sam gel inkubirala 20 min u 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7.0 s dodatkom 0.07 g askorbinske kiseline i 41 μ L H₂O₂. Gel sam ispirala 1 min u 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7.0, nakon čega je uslijedila inkubacija u 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7.8 u koji sam dodala 430 μ L TEMED i 0.035 g NBT, u trajanju od 10 - 15 min (Mittler i Zilinskas, 1993). Nakon što su se na ljubičastoj podlozi pojavile akromatske vrpce, gel sam skenirala.

3.2.7.1.4. Određivanje aktivnosti i broja izoformi katalaze

Gel sam isprala u deH₂O tri puta po 15 min, a potom sam ga inkubirala 10 min u 100 mL deH₂O u koju sam dodala 51 µL H₂O₂. U međuvremenu sam pripremila dvije otopine: otopinu A (0.5 g K₃Fe(CN)₆ otopljeno u 50 mL deH₂O) i otopinu B (0.5 g FeCl₃ otopljeno u 50 mL deH₂O). Gel sam nakon inkubacije kratko isprala u deH₂O. Otopine A i B sam pomiješala neposredno prije upotrebe i u toj smjesi inkubirala gel oko 1 h ili dok se na zelenoj podlozi nisu pojavile žute vrpce koje predstavljaju izoforme CAT (Woodbury i sur., 1971). Nakon toga sam gel skenirala.

3.3. Statistička obrada podataka

Svi rezultati su iskazani kao srednja vrijednost 6 replika ± standardna pogreška. Podaci su statistički obrađeni računalnim programom *Statistica 13.0* (Stat Soft Inc., SAD) za analizu varijance (eng. *ANalysis Of VAriance* - ANOVA), nakon čega je proveden post-hoc Duncan test. Pri tumačenju rezultata značajnim sam smatrala razliku $p \leq 0.05$.

REZULTATI

4. REZULTATI

4.1. Određivanje parametara rasta klijanaca duhana

4.1.1. Klijavost sjemenki

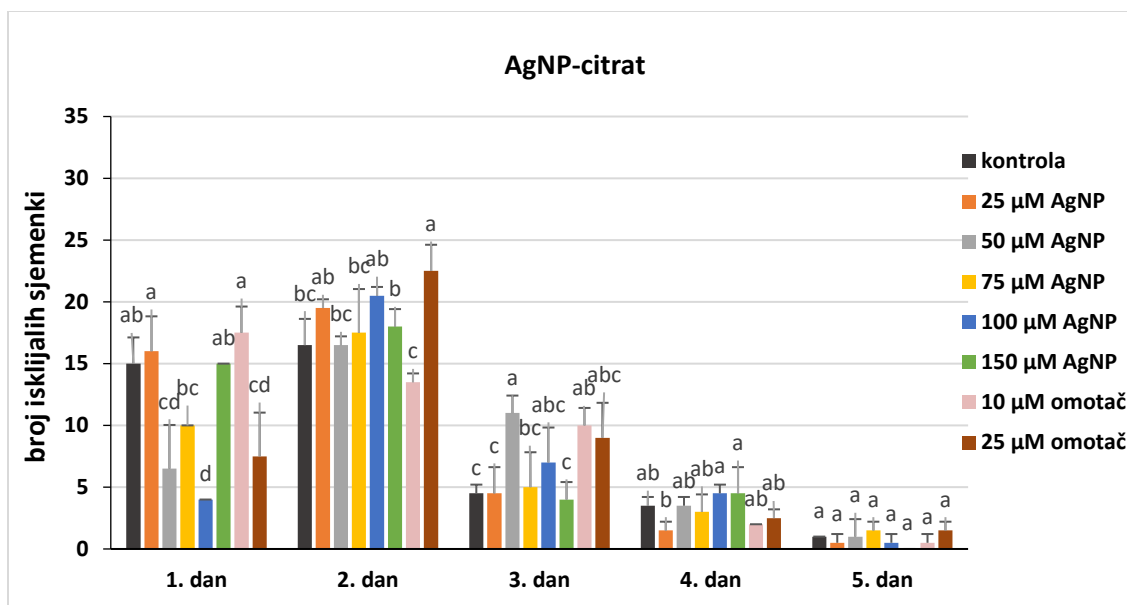
U periodu od 5 dana praćena je dinamika iskljavanja sjemenki duhana nasađenih na podloge s dodatkom AgNP-citrat (Slika 2.), AgNP-PVP (Slika 3.), AgNP-CTAB (Slika 4.), AgNO₃ (Slika 5.) te omotača citrat (Slika 2.), PVP (Slika 3.) i CTAB (Slika 4.).

Primjena nanočestica AgNP-citrat kao i samog citratnog omotača nije znatno utjecala na klijavost sjemenki. Međutim, u 1. danu postignuta je statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu pri koncentracijama 50 i 100 μM AgNP-citrat te pri koncentraciji 25 μM citratnog omotača. U 2. danu zabilježen je porast iskljavanja u odnosu na kontrolu pri koncentraciji 25 μM citratnog omotača, a u 3. danu pri koncentraciji 50 μM nanočestica i pri koncentraciji 10 μM citratnog omotača (Slika 2.).

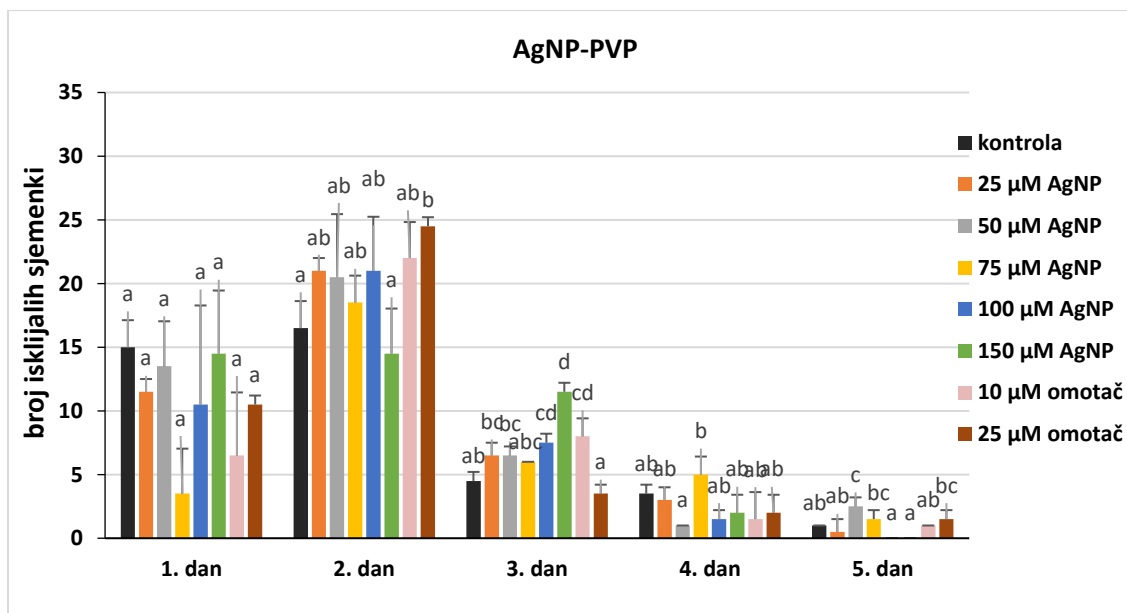
Na podlogama s različitim koncentracijama AgNP-PVP te omotača PVP nije došlo do velike promjene u dinamici iskljavanja sjemenki u usporedbi s kontrolom. Ipak, u 2. danu je postignut statistički značajan porast iskljavanja pri koncentraciji 25 μM omotača PVP. U 3. danu je znatan porast klijavosti zabilježen pri koncentracijama 100 i 150 μM nanočestica te pri 10 μM omotača, a u 5. danu pri koncentraciji 50 μM AgNP-PVP (Slika 3.).

Sve primijenjene koncentracije AgNP-CTAB te omotača CTAB su statistički značajno inhibirale iskljavanje sjemenki u 1. danu, dok je u 2. danu statistički značajno smanjenje iskljavanja utvrđeno pri koncentracijama 100 i 150 μM nanočestica te pri obje ispitane koncentracije omotača (Slika 4.). Negativan učinak je bio izraženiji s povećanjem koncentracije nanočestica. Posljedica toga je odgođeno i usporeno iskljavanje sjemenki koje su nešto značajnije počele iskljavati tek od 3. dana.

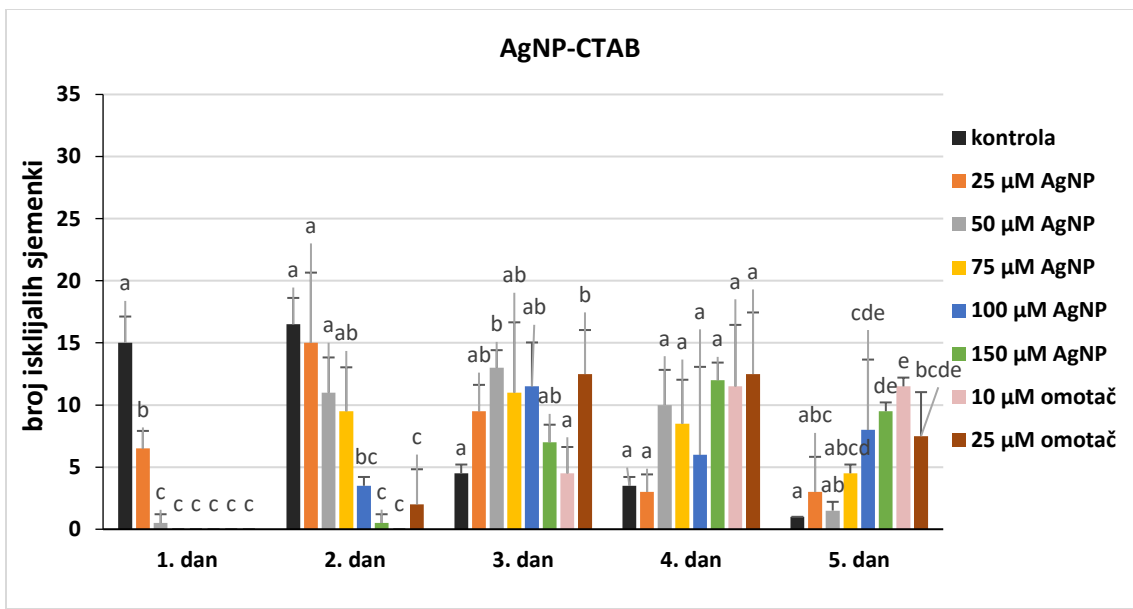
Izloženost sjemenki duhana ionskom srebru nije značajno utjecala na njihovo iskljavanje, osim što je 5. dana pri koncentraciji od 75 μM postignuto statistički značajno povećanje u odnosu na kontrolu (Slika 5.).



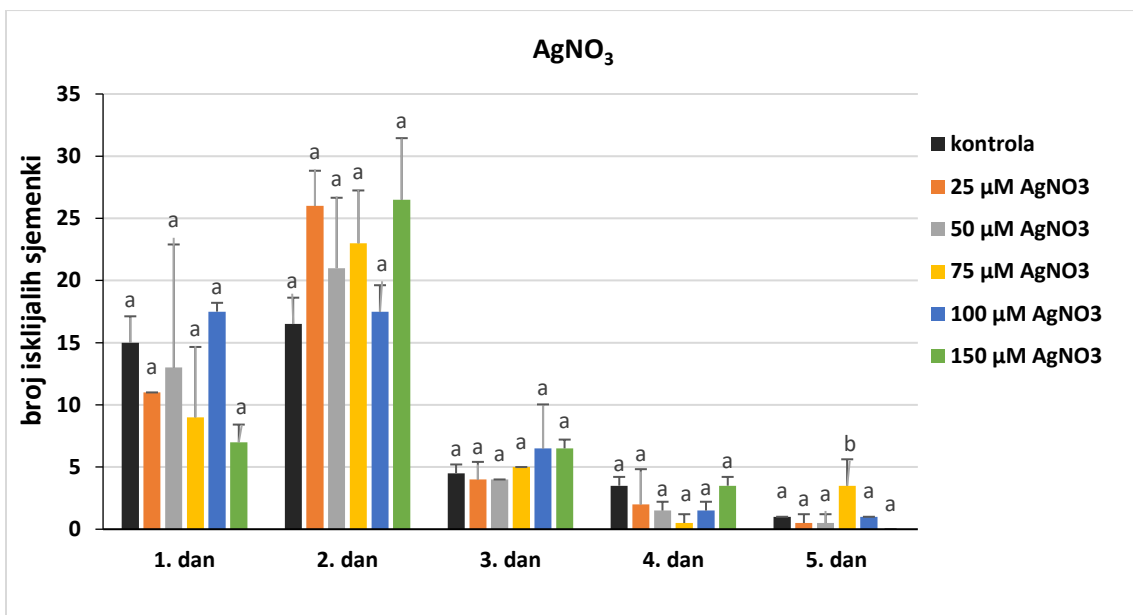
Slika 2. Broj iskljajalih sjemenki duhana na podlogama s različitim koncentracijama AgNP-citrat te citratnog omotača po svakom danu u periodu od 5 dana. Početni broj nasađenih sjemenki za svaki tretman i kontrole bio je 100. Stupci označeni različitim slovima označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0.05$; Duncan test).



Slika 3. Broj iskljajalih sjemenki duhana na podlogama s različitim koncentracijama AgNP-PVP te omotača PVP po svakom danu u periodu od 5 dana. Početni broj nasađenih sjemenki za svaki tretman i kontrole bio je 100. Stupci označeni različitim slovima označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0.05$; Duncan test).

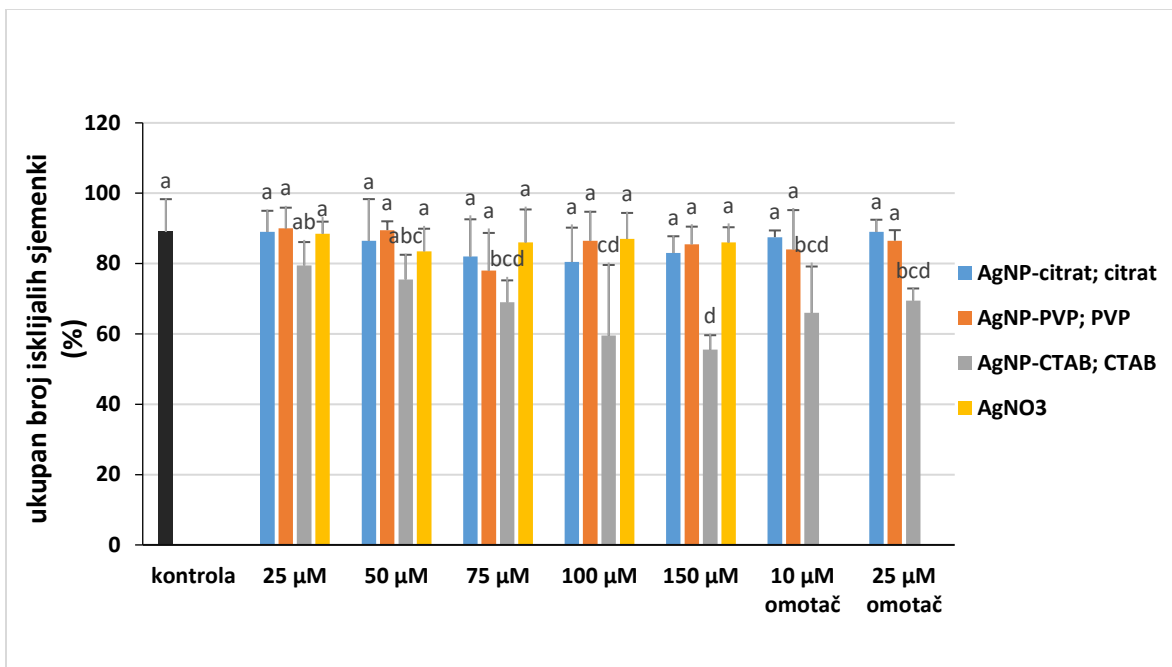


Slika 4. Broj iskljajalih sjemenki duhana na podlogama s različitim koncentracijama AgNP-CTAB te omotača CTAB po svakom danu u periodu od 5 dana. Početni broj nasađenih sjemenki za svaki tretman i kontrole bio je 100. Stupci označeni različitim slovima označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0.05$; Duncan test).



Slika 5. Broj iskljajalih sjemenki duhana na podlogama s različitim koncentracijama AgNO₃ po svakom danu u periodu od 5 dana. Početni broj nasađenih sjemenki za svaki tretman i kontrole bio je 100. Stupci označeni različitim slovima označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0.05$; Duncan test).

Na slici 6. prikazan je učinak svih tretmana na ukupan broj iskljajalih sjemenki nakon pet dana. Vidljivo je da se značajna inhibicija iskljajavanja postiže pri većim koncentracijama AgNP-CTAB te pri obje koncentracije omotača CTAB, dok druge nanočestice i omotači nisu imali znatan učinak na klijavost sjemenki pri ispitanim koncentracijama.

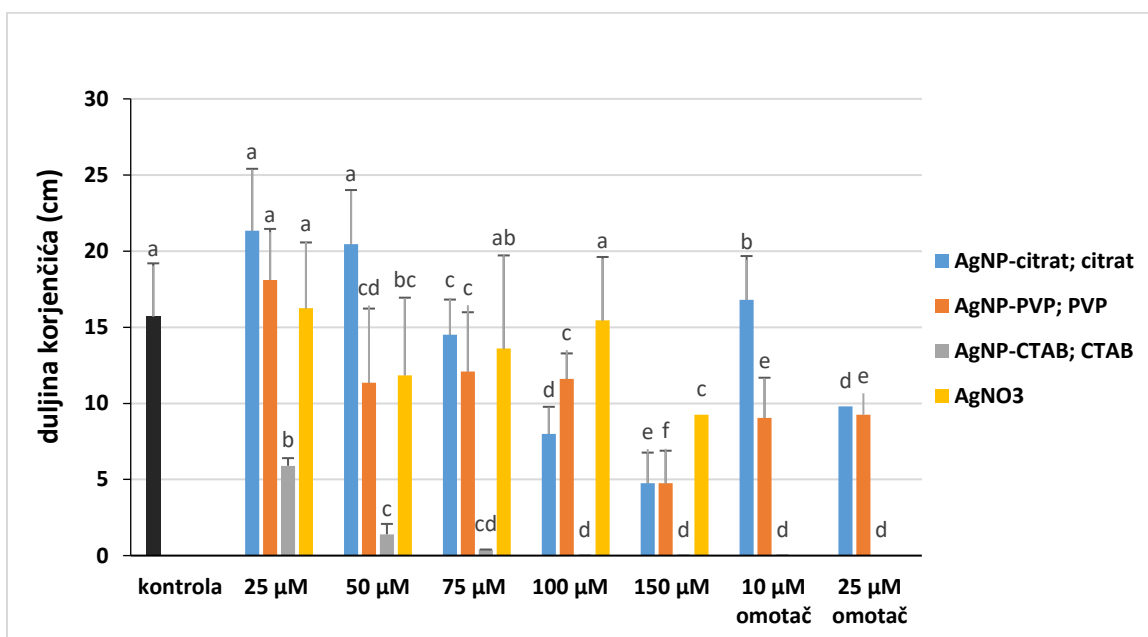


Slika 6. Ukupan broj iskljajalih sjemenki duhana na podlogama s različitim koncentracijama tri tipa AgNP (AgNP-citrat, AgNP-PVP, AgNP-CTAB), ionskog srebra (AgNO₃) te omotača (citrat, PVP, CTAB) nakon 5 dana (izražen postotkom). Početni broj nasađenih sjemenki za svaki tretman i kontrole bio je 100. Stupci označeni različitim slovima označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0.05$; Duncan test).

4.1.2. Morfometrija

Tri tjedna nakon nasađivanja sjemenki duhana na podloge s dodatkom tri tipa AgNP, AgNO₃ te samih omotača izmjerena je duljina korjenčića (cm) klijanaca, a na slici 7. se može vidjeti učinak različitih tretmana. S porastom koncentracije AgNP-citrat primjećuje se smanjenje prosječne duljine korjenčića koje je statistički značajno pri koncentracijama 75, 100 i 150 µM u odnosu na kontrolu. Primjena omotača citrata u koncentraciji 10 µM je uzrokovala statistički značajno povećanje duljine korjenčića u usporedbi s netretiranim klijancima, dok je pri koncentraciji od 25 µM zabilježen statistički značajan inhibitorni učinak na rast korjenčića.

Tretman klijanaca s AgNP-PVP je pri svim koncentracijama, osim najniže, rezultirao značajnom inhibicijom rasta korijena. Također, obje koncentracije samog omotača PVP imale su značajan inhibitorski učinak u odnosu na kontrolu. Najizraženiji inhibitorski učinak na rast korijena klijanaca je zabilježen u tretmanima s AgNP-CTAB te samim omotačem CTAB. Nakon tretmana s najvećim primijenjenim koncentracijama AgNP-CTAB te obje koncentracije omotača duljinu korjenčića nije bilo moguće izmjeriti. Ionsko srebro je značajno inhibitorski djelovalo na rast korijena samo pri koncentracijama 50 μM i 150 μM u odnosu na kontrolu.

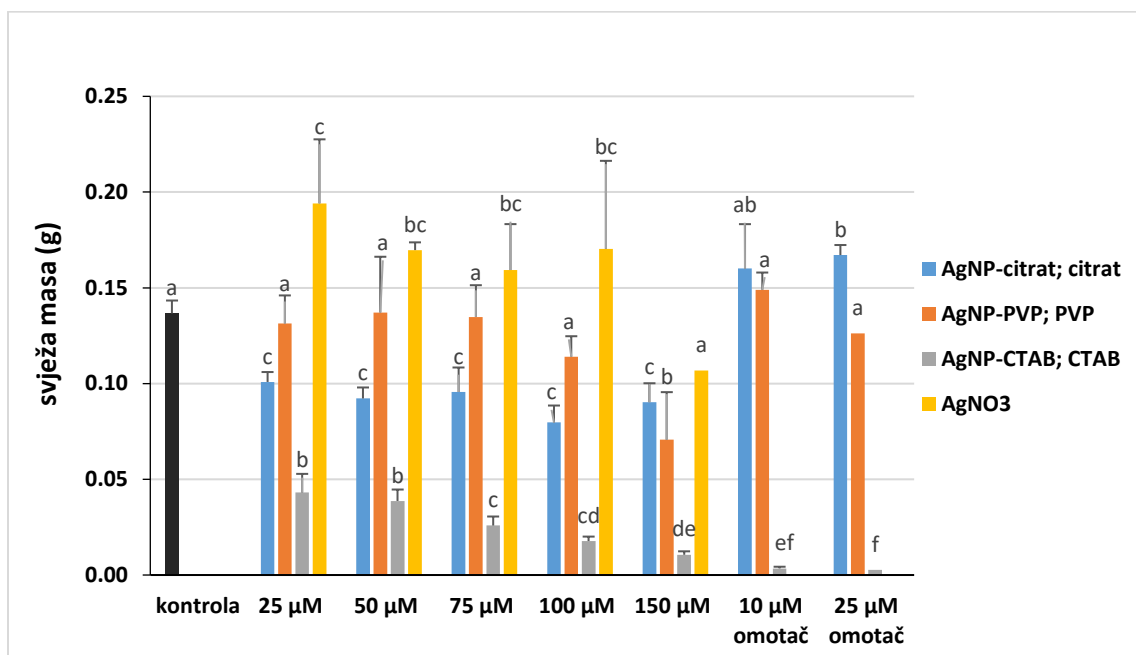


Slika 7. Prosječne duljine korjenčića klijanaca duhana koji su tri tjedna rasli na podlogama s dodatkom tri tipa nanočestica (AgNP-citrat, AgNP-PVP, AgNP-CTAB), ionskog srebra (AgNO_3) te omotača citrat, PVP i CTAB. Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti 6 replika \pm standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0.05$; Duncan test).

4.1.3. Prirast svježe mase klijanaca

Slika 8. prikazuje promjene svježe mase (g) klijanaca duhana nastale nakon tri tjedna rasta na podlogama s dodatkom AgNP, AgNO_3 te samih omotača. Sve primijenjene koncentracije AgNP-citrat su prouzročile značajno smanjenje svježe mase klijanaca u odnosu na kontrolu. Za razliku od toga, obje koncentracije citratnog omotača su izazvale porast svježe

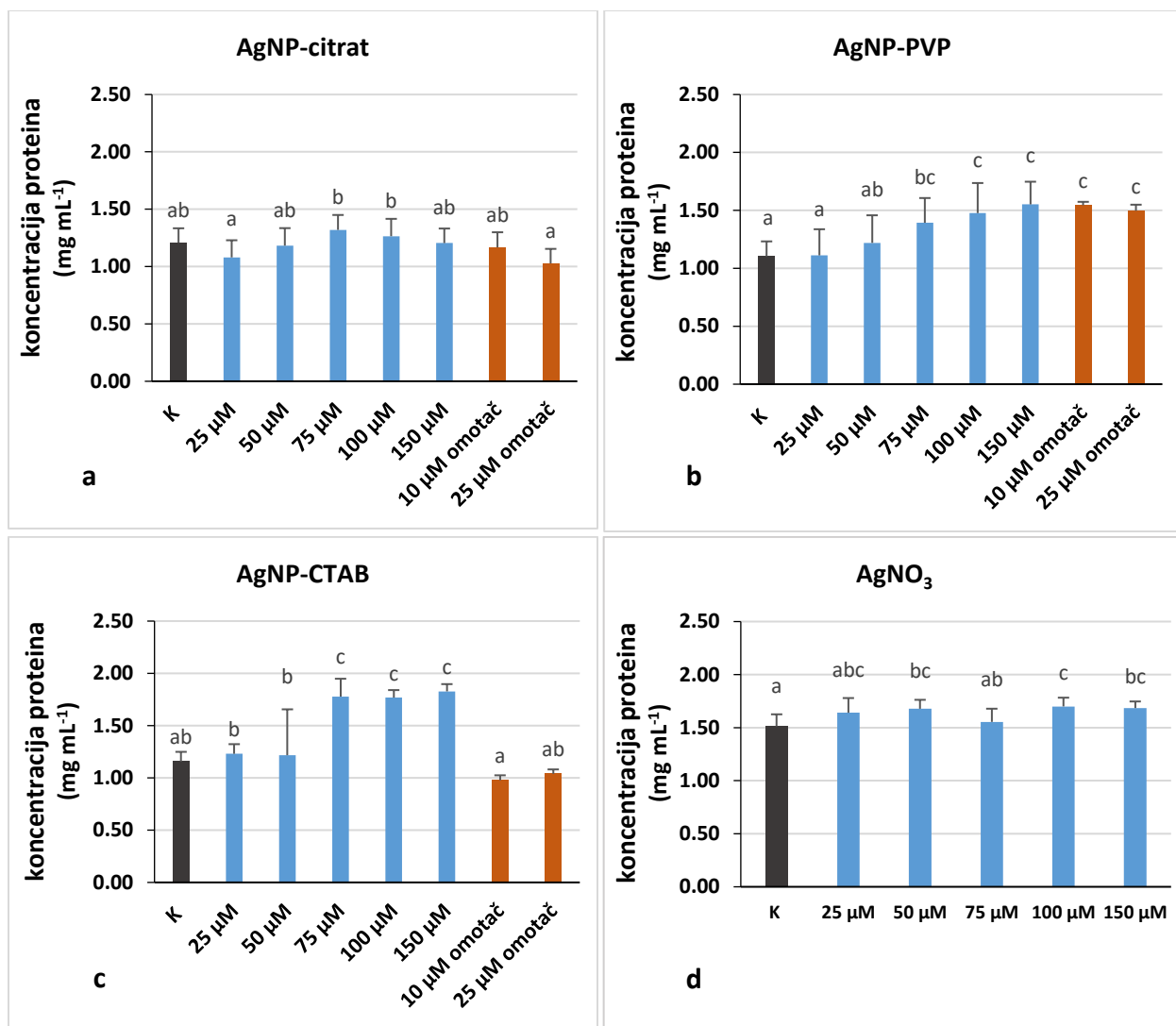
mase klijanaca, a pri koncentraciji od 25 μM je postignuta statistički značajna vrijednost. Tretman s AgNP-PVP je pri najvećoj ispitanoj koncentraciji od 150 μM statistički značajno utjecao na smanjenje mase u usporedbi s kontrolom. Primjena omotača PVP pri ovim koncentracijama nije značajno promijenila svježu masu klijanaca. Najveće smanjenje svježe mase klijanaca je zapaženo u tretmanima s omotačem CTAB te AgNP-CTAB, a negativan učinak na prirast je bio izraženiji s porastom koncentracije. Omotač CTAB je pri ovim niskim ispitivanim koncentracijama pokazao najnegativniji učinak na prirast mase klijanaca. Primjena ionskog srebra je pri svim ispitanim koncentracijama, osim najveće, uzrokovala statistički značajan porast svježe mase klijanaca u odnosu na kontrolu.



Slika 8. Svježe mase klijanaca duhanja koji su tri tjedna rasli na podlogama s dodatkom tri tipa nanočestica (AgNP-citrat, AgNP-PVP, AgNP-CTAB), ionskog srebra (AgNO_3) te omotača citrat, PVP i CTAB. Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti 6 replika \pm standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0.05$; Duncan test).

4.2. Koncentracija proteina

Na slici 9. može se vidjeti učinak 7-dnevnog izlaganja klijanaca duhana AgNP s različitim omotačima, ionskom srebru (AgNO_3) te samim omotačima na koncentraciju proteina. Nanočestice AgNP-citrat i citratni omotač nisu značajno utjecali na koncentraciju proteina u odnosu na kontrolu (Slika 9a). S porastom koncentracija AgNP-PVP došlo je do povećanja koncentracije proteina u klijanacima, a statistički značajne vrijednosti su postignute pri koncentracijama 75, 100 i 150 μM . Jednako tako, i omotač PVP primijenjen u obje koncentracije je izazvao značajan porast koncentracije proteina u usporedbi s kontrolom (Slika 9b). Izlaganje klijanaca nanočesticama AgNP-CTAB je rezultiralo statistički značajnim porastom koncentracije proteina pri koncentracijama nanočestica od 75, 100 i 150 μM . S druge strane, niti jedna ispitana koncentracija omotača CTAB nije izazvala promjene u koncentraciji proteina u odnosu na kontrolne klijanke (Slika 9c). Primjena ionskog srebra je povećala koncentraciju proteina, koja je bila statistički značajna pri koncentracijama od 50, 100 i 150 μM (Slika 9d).

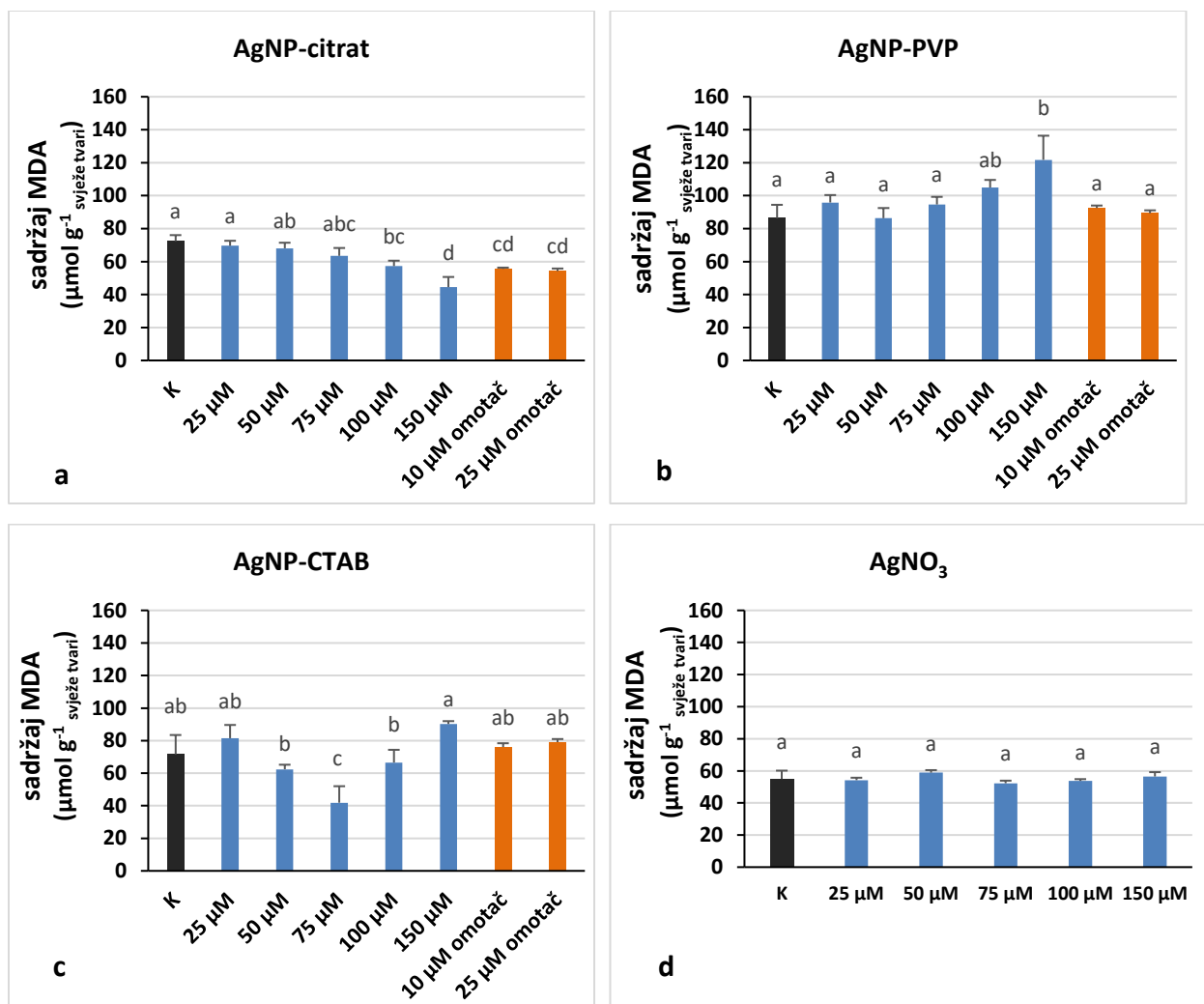


Slika 9. Koncentracija proteina u klijancima duhana koji su bili 7 dana tretirani s: a) AgNP-citrat, b) AgNP-PVP, c) AgNP-CTAB, d) AgNO₃ te omotačima citrat (a), PVP (b) i CTAB (c). Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti 6 replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0.05$; Duncan test). K - kontrola.

4.3. Sadržaj malondialdehida

MDA je jedan od krajnjih produkata lipidne peroksidacije i koristi se kao indikator oksidacijskog oštećenja membrana stanica pod stresnim uvjetima. Na slici 10. je prikazan učinak tri tipa AgNP i samih omotača te ionskog srebra na sadržaj MDA u klijancima duhana. Nanočestice AgNP-citrat su uzrokovale značajno smanjenje sadržaja MDA pri višim koncentracijama od 100 i 150 μM u odnosu na kontrolu. Obje primijenjene koncentracije

citratnog omotača su značajno smanjile razinu MDA u usporedbi s kontrolom. Citratni omotač pri koncentraciji od 25 μM je prouzročio značajno smanjenje MDA, dok ista koncentracija AgNP-citrat nije značajno utjecala na promjenu razine MDA (Slika 10a). Tretman s AgNP-PVP je pri višim koncentracijama izazvao porast lipidne peroksidacije, pri čemu je statistički značajan porast ostvaren samo s najvećom koncentracijom od 150 μM u odnosu na kontrolu. Niti jedna primijenjena koncentracija omotača PVP nije značajno utjecala na razinu lipidne peroksidacije (Slika 10b). Nanočestice AgNP-CTAB su značajno smanjile sadržaj MDA pri koncentraciji od 75 μM u odnosu na kontrolu, dok ostale primijenjene koncentracije nisu imale značajan učinak. Također, niti jedna od ispitanih koncentracije omotača CTAB nije značajno djelovala na razinu lipidne peroksidacije (Slika 10c). U kljancima izloženim ionskom srebru nije zabilježena promjena sadržaja MDA niti pri jednoj ispitanoj koncentraciji (Slika 10d).

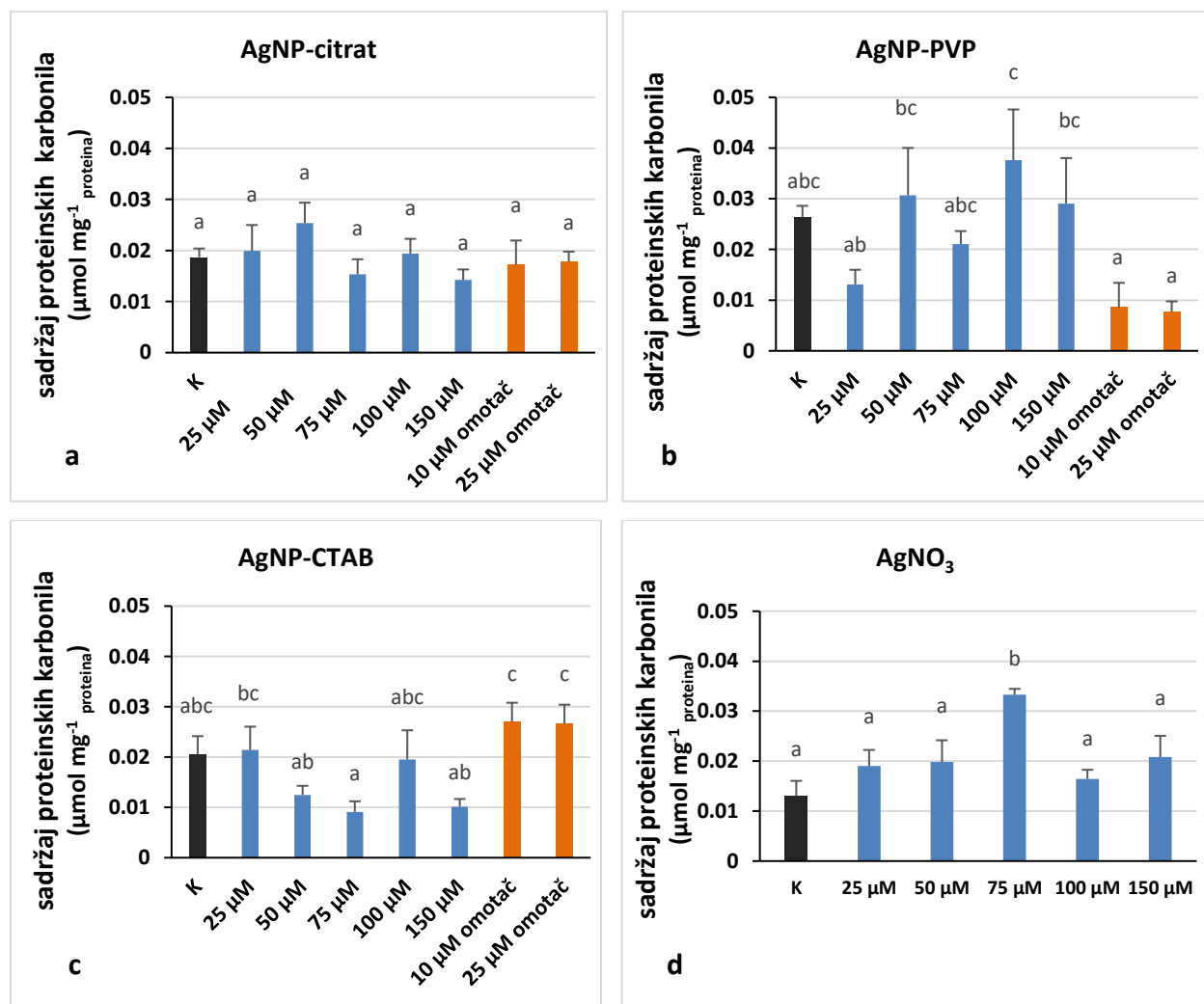


Slika 10. Sadržaj malondialdehida (MDA) u klijancima duhana koji su bili 7 dana tretirani s: a) AgNP-citrat, b) AgNP-PVP, c) AgNP-CTAB, d) AgNO₃ te omotačima citrat (a), PVP (b) i CTAB (c). Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti 6 replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0.05$; Duncan test). K - kontrola.

4.4. Sadržaj proteinskih karbonila

Utjecaj tri tipa AgNP i samih omotača te ionskog srebra na sadržaj proteinskih karbonila u klijancima duhana prikazan je na slici 11. Niti jedna primijenjena koncentracija AgNP-citrat te samog citrata nije imala značajan učinak na razinu proteinskih karbonila u odnosu na kontrolu (Slika 11a). Također, ni tretiranje klijanaca s AgNP-PVP nije značajno utjecalo na sadržaj karbonila u odnosu na kontrolu, ali postoji statistički značajna razlika između tretmana s

koncentracijama od 25 i 100 μM . Primjena omotača PVP u obje koncentracije izazvala je smanjenje razine karbonila, ali nije dobivena statistički značajna vrijednost u odnosu na kontrolne klijance (Slika 11b). Tretman s AgNP-CTAB je pri koncentracijama od 50, 75 i 150 μM smanjio sadržaj proteinskih karbonila, ali ne statistički značajno. Međutim, značajna razlika postoji između tretmana od 25 i 75 μM AgNP-CTAB. Obje koncentracije omotača CTAB su uzrokovale porast sadržaja karbonila, ali ne statistički značajno u usporedbi s kontrolom (Slika 11c). U klijancima izloženim AgNO_3 zabilježen je porast razine karbonila, koji je bio statistički značajan samo pri koncentraciji 75 μM (Slika 11d).

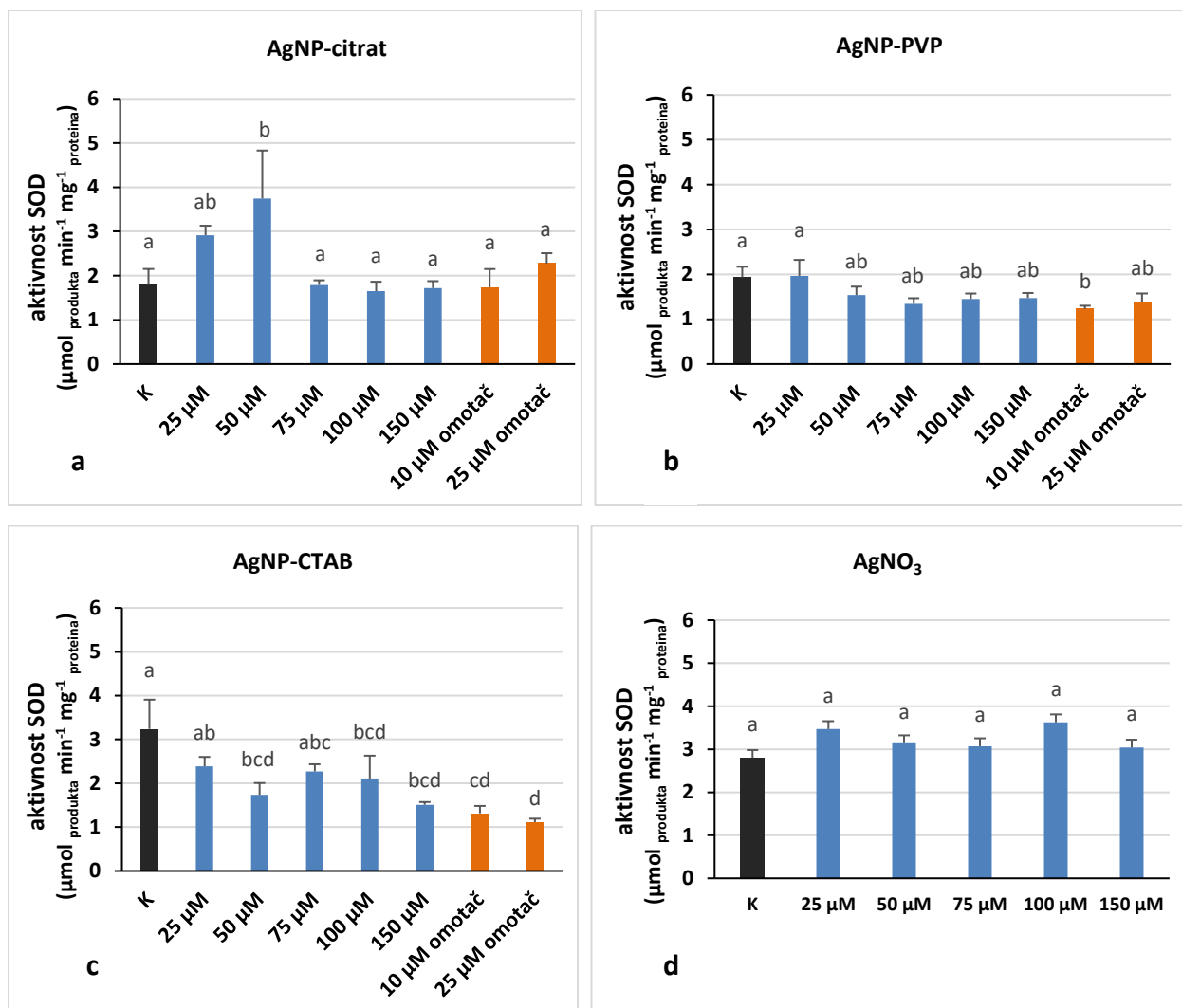


Slika 11. Sadržaj proteinskih karbonila u klijancima duhana koji su bili 7 dana tretirani s: a) AgNP-citrat, b) AgNP-PVP, c) AgNP-CTAB, d) AgNO_3 te omotačima citrat (a), PVP (b) i CTAB (c). Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti 6 replika \pm standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0.05$; Duncan test). K - kontrola.

4.5. Aktivnost antioksidacijskih enzima

4.5.1. Aktivnost superoksid dismutaze

Na slici 12. je prikazan učinak tri tipa AgNP i samih omotača te ionskog srebra na aktivnost SOD u klijancima duhana. Nanočestice AgNP-citrat su izazvale porast aktivnosti SOD pri koncentracijama od 25 i 50 μM , ali je on bio statistički značajan samo pri koncentraciji od 50 μM u usporedbi s netretiranim klijancima. Tretman sa citratnim omotačem nije značajno utjecao na aktivnost SOD u klijancima (Slika 12a). Niti jedna primijenjena koncentracija AgNP-PVP nije imala značajan učinak na aktivnost SOD, dok je sam omotač PVP pri koncentraciji od 10 μM uzrokovao statistički značajan pad aktivnosti SOD u usporedbi s kontrolom (Slika 12b). Porast koncentracije AgNP-CTAB je utjecao na smanjenje aktivnosti SOD u klijancima, koje je bilo statistički značajno pri koncentracijama od 50, 100 i 150 μM . Također, obje koncentracije omotača CTAB su značajno smanjile aktivnost SOD u odnosu na kontrolu. Omotač CTAB u koncentraciji 25 μM je smanjio aktivnost SOD značajnije od AgNP-CTAB iste koncentracije, koje nisu imale značajan učinak na aktivnost enzima u odnosu na kontrolu (Slika 12c). Tretman klijanaca ionskim srebrom nije rezultirao značajnim promjenama u aktivnosti SOD (Slika 12d).

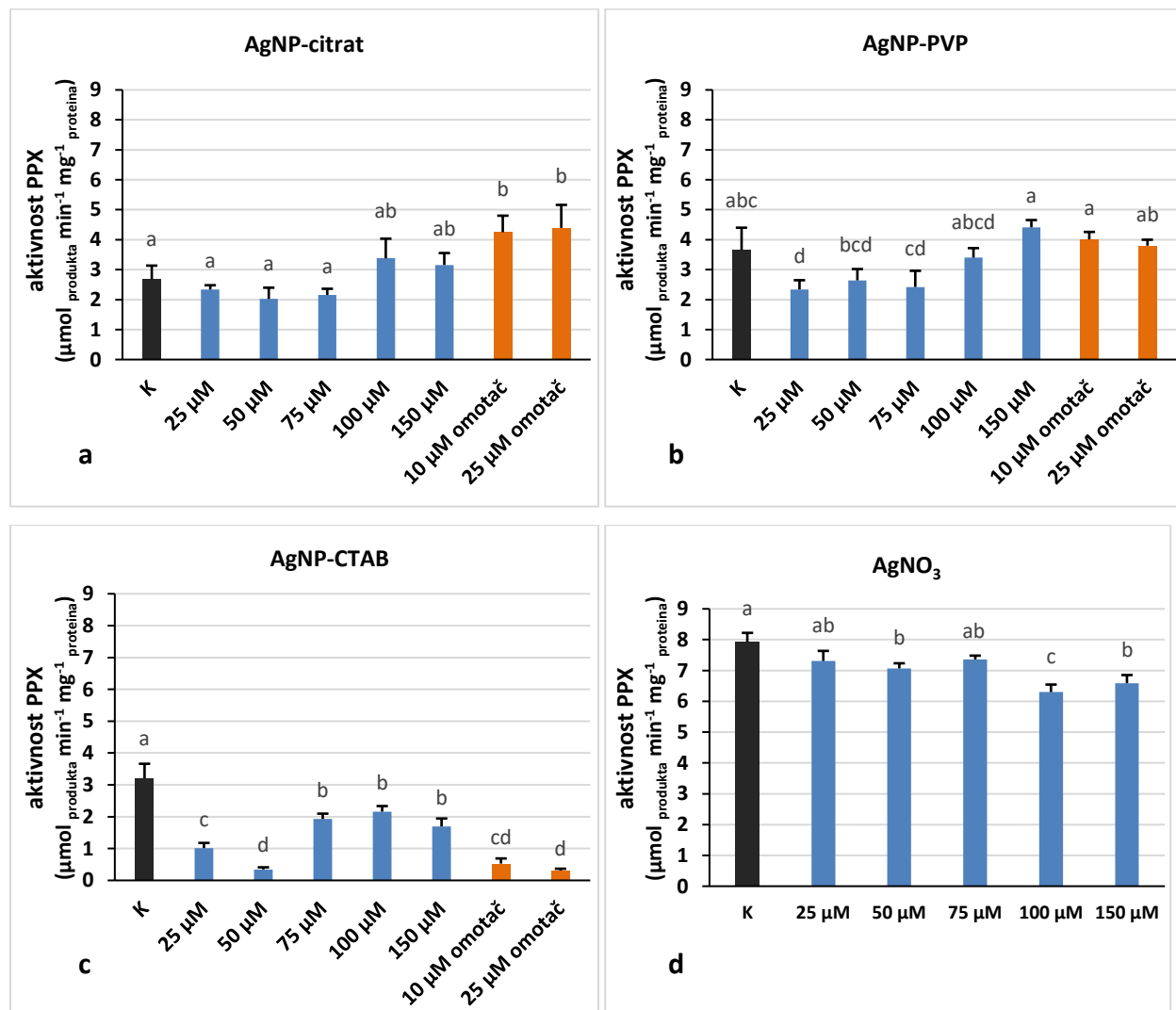


Slika 12. Aktivnost superoksid dismutaze (SOD) u klijancima duhana koji su bili 7 dana tretirani s: a) AgNP-citrat, b) AgNP-PVP, c) AgNP-CTAB, d) AgNO₃ te omotačima citrat (a), PVP (b) i CTAB (c). Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti 6 replika \pm standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0.05$; Duncan test). K - kontrola.

4.5.2. Aktivnost pirogalol peroksidaze

Promjene u aktivnosti PPX nakon izlaganja klijanaca duhana česticama AgNP i samim omotačima te AgNO₃ prikazane su na slici 13. Niti jedna ispitana koncentracija AgNP-citrat nije značajno utjecala na aktivnost PPX u usporedbi s kontrolnim klijancima, dok su obje koncentracije citratnog omotača izazvale statistički značajan porast aktivnosti (Slika 13a). U tretmanima s nižim koncentracijama AgNP-PVP došlo je do pada aktivnosti, ali je statistički

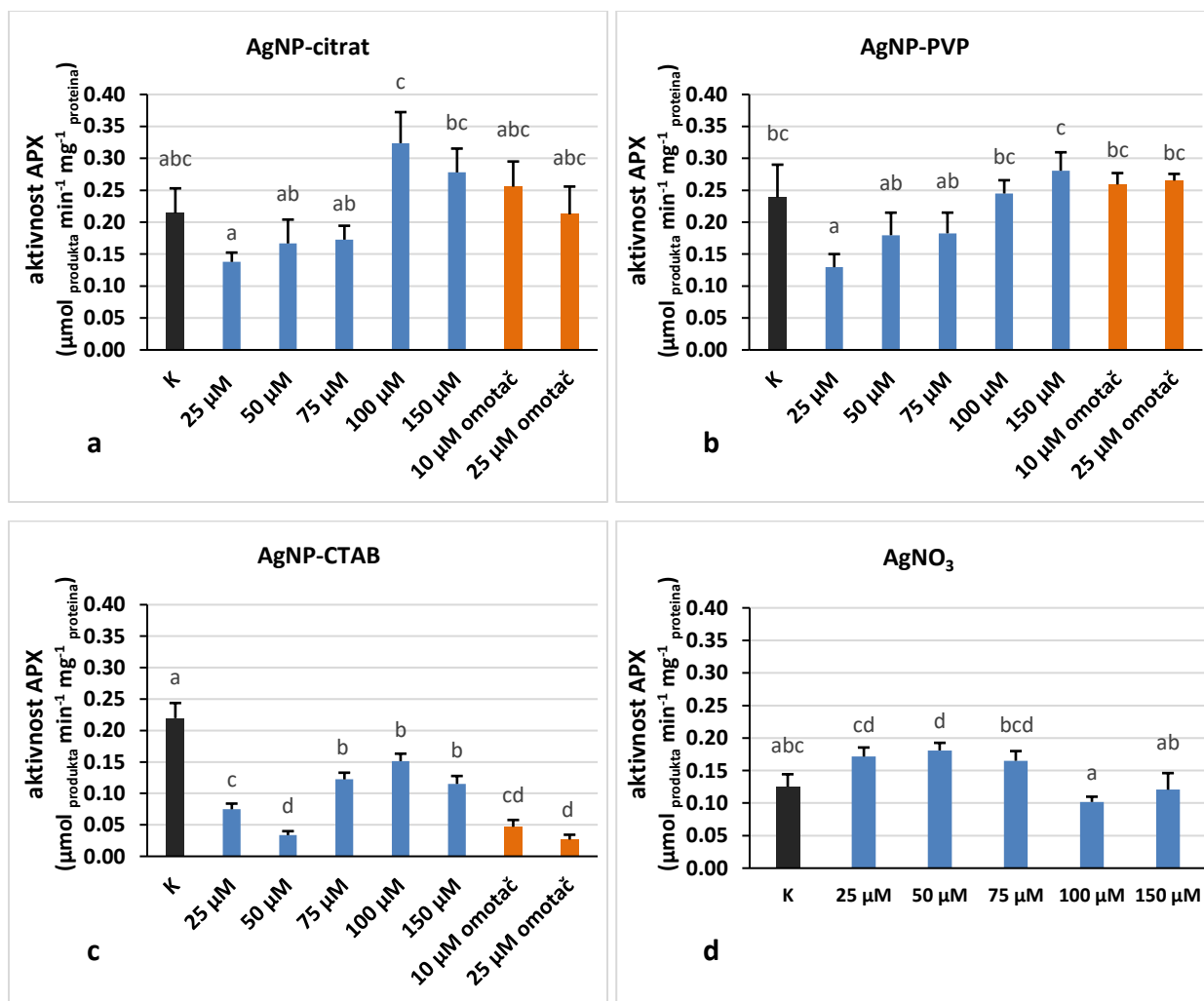
značajna vrijednost postignuta samo pri koncentraciji 25 μM . Nakon tretiranja klijanaca s omotačem PVP aktivnost se nije značajno promijenila u odnosu na kontrolu (Slika 13b). Sve primijenjene koncentracije AgNP-CTAB te omotača CTAB izazvale su statistički značajan pad aktivnosti PPX (Slika 13c). Izlaganje klijanaca ionskom srebru rezultiralo je padom aktivnosti, a statistički značajna vrijednost zabilježena je pri koncentracijama od 50, 100 i 150 μM (Slika 13d).



Slika 13. Aktivnost pirogalol peroksidaze (PPX) u klijancima duhana koji su bili 7 dana tretirani s: a) AgNP-citrat, b) AgNP-PVP, c) AgNP-CTAB, d) AgNO₃ te omotačima citrat (a), PVP (b) i CTAB (c). Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti 6 replika \pm standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0.05$; Duncan test). K - kontrola.

4.5.3. Aktivnost askorbat peroksidaze

Utjecaj tri tipa AgNP, samih omotača te ionskog srebra na promjene u aktivnosti APX u klijancima duhana nakon 7-dnevnog tretmana prikazan je na slici 14. Nanočestice AgNP-citrat primijenjene u koncentracijama od 100 i 150 μM su uzrokovale porast aktivnosti APX, iako nije bila statistički značajna u odnosu na kontrolu. Također, ni citratni omotač nije značajno utjecao na aktivnost APX (Slika 14a). Najniža primijenjena koncentracija AgNP-PVP rezultirala je statistički značajnim padom aktivnosti APX, dok primjena ostalih koncentracija nanočestica, kao i samog omotača PVP, nije znatno utjecala na aktivnost enzima (Slika 14b). Nasuprot tome, sve ispitane koncentracije AgNP-CTAB su izazvale statistički značajno smanjenje aktivnosti APX, a najveće je zabilježeno pri koncentraciji od 50 μM . Obje koncentracije omotača CTAB također su rezultirale značajnim smanjenjem aktivnosti APX u odnosu na kontrolu (Slika 14c). Tretman s AgNO_3 je pri nižim koncentracijama povećao aktivnost APX, ali je statistički značajna vrijednost postignuta samo pri koncentraciji od 50 μM (Slika 14d).

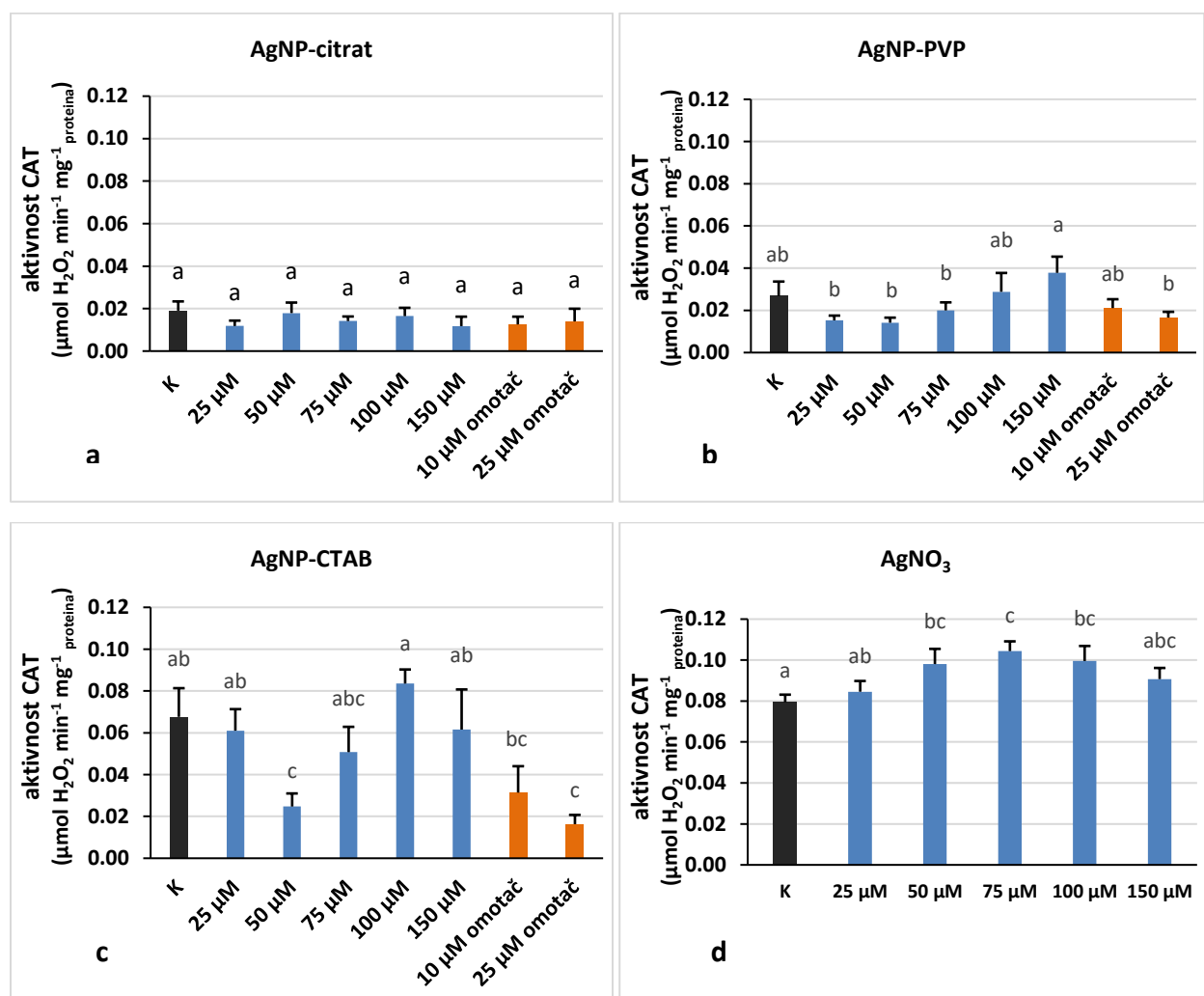


Slika 14. Aktivnost askorbat peroksidaze (APX) u klijancima duhana koji su bili 7 dana tretirani s: a) AgNP-citrat, b) AgNP-PVP, c) AgNP-CTAB, d) AgNO₃ te omotačima citrat (a), PVP (b) i CTAB (c). Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti 6 replika \pm standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0.05$; Duncan test). K - kontrola.

4.5.4. Aktivnost katalaze

Na slici 15. je prikazan učinak tri tipa AgNP i samih omotača te ionskog srebra na aktivnost CAT u klijancima duhana. Tretmani s AgNP-citrat i samim citratnim omotačem nisu izazvali značajnu promjenu aktivnosti CAT u usporedbi s kontrolom (Slika 15a). Nanočestice AgNP-PVP su pri nižim koncentracijama smanjile aktivnost CAT, a pri koncentracijama od 100 i 150 μM povećale, ali te promjene nisu bile statistički značajne u odnosu na kontrolu. Omotač PVP također nije imao statistički značajan učinak (Slika 15b). Nanočestice AgNP-CTAB

primijenjene u koncentraciji od 50 μM su statistički značajno smanjile aktivnost CAT, dok druge koncentracije nisu značajno utjecale na aktivnost CAT u usporedbi s kontrolom. Obje koncentracije omotača CTAB su smanjile aktivnost CAT, ali statistički značajno samo koncentracija od 25 μM . Suprotno tome, 25 μM AgNP-CTAB nije izazvao promjenu aktivnosti CAT u usporedbi s kontrolnim klijancima (Slika 15c). U klijancima tretiranim s AgNO_3 došlo je do porasta aktivnosti CAT, a statistički značajan porast je zabilježen pri koncentracijama od 50, 75 i 100 μM (Slika 15d).



Slika 15. Aktivnost katalaze (CAT) u klijancima duhana koji su bili 7 dana tretirani s: a) AgNP-citrat, b) AgNP-PVP, c) AgNP-CTAB, d) AgNO_3 te omotačima citrat (a), PVP (b) i CTAB (c). Rezultati predstavljaju srednje vrijednosti 6 replika \pm standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima označavaju statistički značajnu razliku ($p \leq 0.05$; Duncan test). K - kontrola.

4.6. Aktivnost antioksidacijskih enzima u gelu

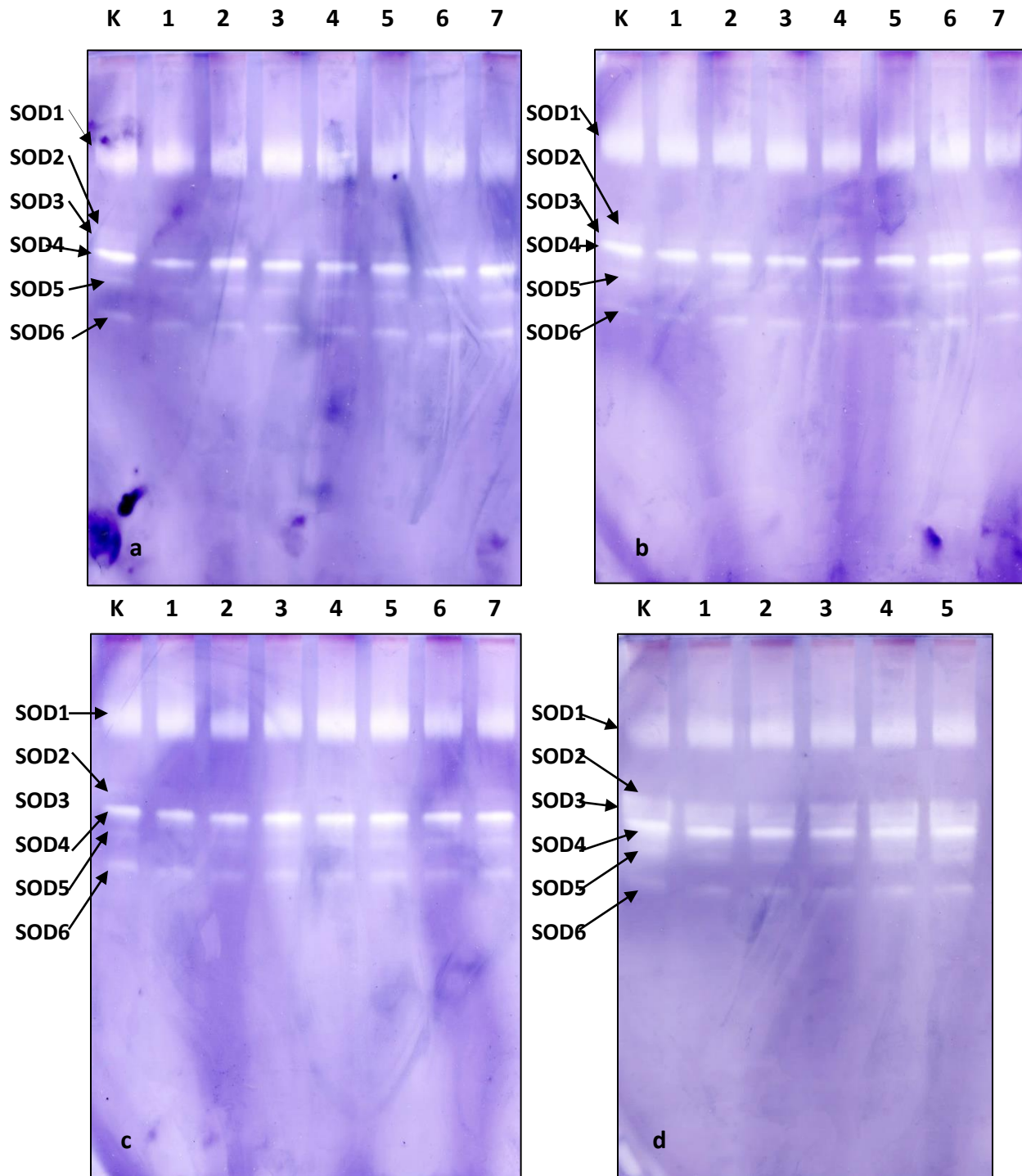
4.6.1. Aktivnost superoksid dismutaze

Slika 16a prikazuje aktivnost i izoforme SOD klijanaca duhana nakon tretmana s nanočesticama AgNP-citrat te citratnim omotačem. Na gelu sam uočila šest izoformi SOD koje su prema rastućoj pokretljivosti prema anodi označene kao SOD1 - SOD6, a svih šest bilo je prisutno u kontroli. Izoforma SOD1 detektirana je u svim tretmanima, ali je intenzitet signala pri tretmanu s 25 μM citratnog omotača bio znatno slabiji u odnosu na kontrolu. Izoforma SOD2 bila je vidljiva pri obje ispitane koncentracije citratnog omotača, ali u nešto slabijem intenzitetu od kontrole. Vrpce SOD3 - SOD6 uočila sam u svim tretmanima, ali je pri koncentraciji od 25 μM AgNP-citrat intenzitet obojenja vrpce bio slabiji u usporedbi s kontrolom. Nakon tretmana s 25 μM citratom izoforme SOD5 i SOD6 pokazale su jači intenzitet od kontrolnih vrpce.

Na slici 16b je vidljivo šest izoformi SOD u gelu iz klijanaca izloženih tretmanima s AgNP-PVP i omotačem PVP, a svih šest detektirano je u kontroli. Izoforme SOD1 te SOD3 - SOD6 uočila sam u svim tretmanima i bile su podjednakog intenziteta. Izoforma SOD2 je, osim u kontroli, bila prisutna samo nakon tretmana s 150 μM AgNP-PVP i pri obje koncentracije omotača PVP.

Aktivnost i izoforme SOD detektirane nakon izlaganja klijanaca nanočesticama AgNP-CTAB i omotaču CTAB prikazane su na slici 16c. Na gelu sam uočila šest izoformi, od kojih su u kontroli bile prisutne sve osim SOD3. Izoformu SOD1 uočila sam u svim tretmanima, a najjači intenzitet pokazala je nakon tretmana sa 100 i 150 μM nanočesticama. Vrpca SOD2 bila je prisutna i nakon izlaganja klijanaca 25 μM omotaču CTAB, a u slabijem intenzitetu nakon tretmana sa 150 μM AgNP-CTAB i 10 μM CTAB. Vrpca SOD3 slabog intenziteta, koja predstavlja izoformu, bila je vidljiva nakon tretmana sa 75, 100 i 150 μM AgNP-CTAB te 10 μM omotačem. Izoforme SOD4, SOD5 i SOD6 detektirala sam nakon svih tretmana. Intenzitet izoformi SOD5 i SOD6 bio je najslabiji nakon tretmana s 25 i 50 μM AgNP-CTAB.

Iz klijanaca tretiranih ionskim srebrom detektirano je u gelu šest izoformi SOD ujednačenog intenziteta (Slika 16d), koje se nisu razlikovale od izoformi iz netretiranih klijanaca. Najizraženije izoforme na svim gelovima su bile SOD1 i SOD4.



Slika 16. Aktivnost i izoforme superoksid dismutaze u gelu nakon elektroforeze u nativnim uvjetima dobivene iz klijanaca duhana koji su bili 7 dana tretirani s: a) AgNP-citrat, b) AgNP-PVP, c) AgNP-CTAB, d) AgNO₃ te omotačima citrat (a), PVP (b) i CTAB (c). K - kontrola, 1 - 25 μM, 2 - 50 μM, 3 - 75 μM, 4 - 100 μM, 5 - 150 μM, 6 - 10 μM omotač, 7 - 25 μM omotač.

4.6.2. Aktivnost pirogalol peroksidaze

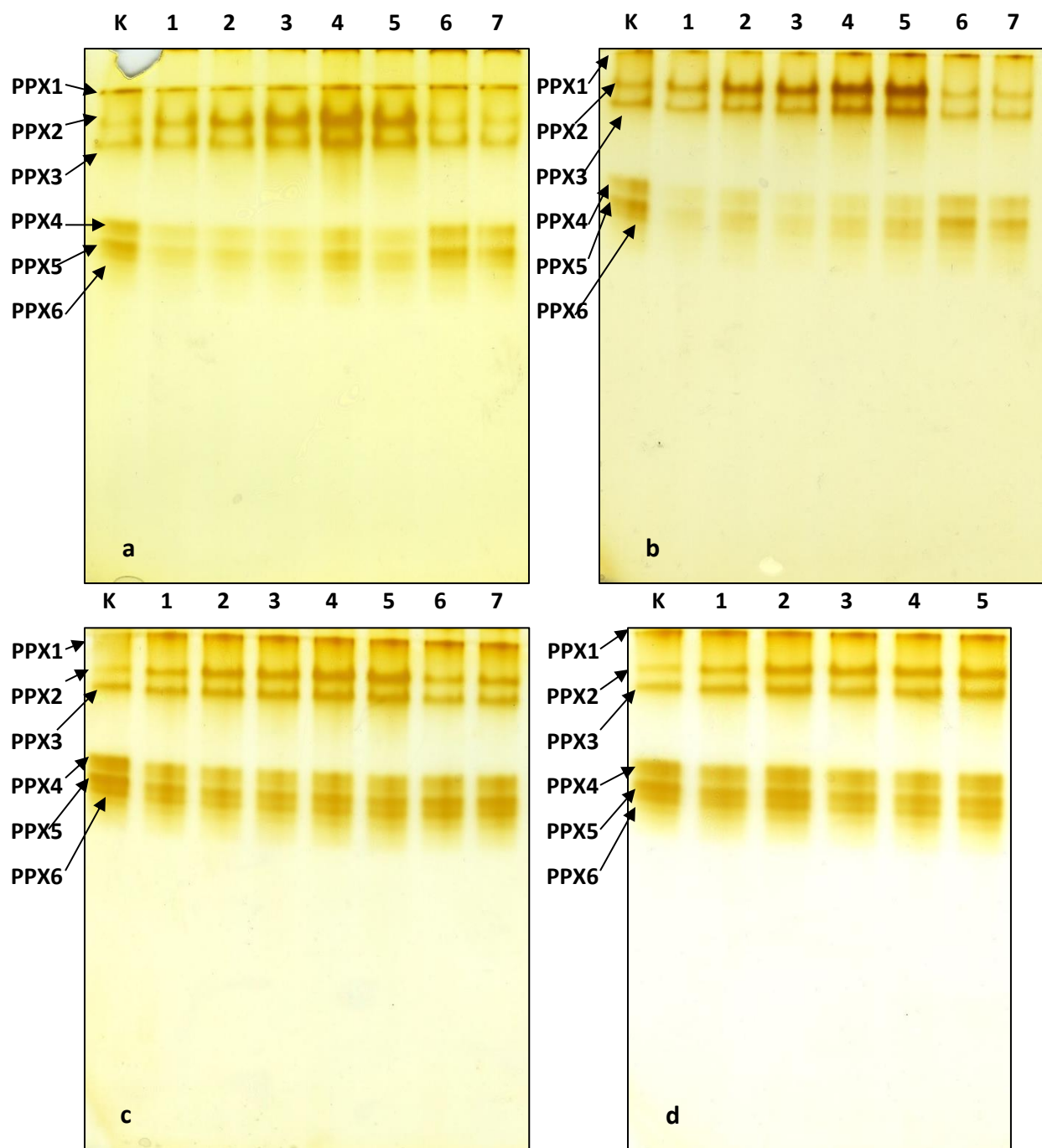
Aktivnost i izoforme PPX klijanaca izloženih djelovanju AgNP-citrat i citratnog omotača prikazane su na slici 17a. Vidljivo je šest izoformi PPX koje su označene prema rastućoj pokretljivosti kao PPX1 - PPX6. Između uzoraka tretiranih različitim koncentracijama nanočestica i omotača nije bilo razlike u broju izoformi, ali je postojala razlika u intenzitetu pojedinih vrpce među tretmanima te u odnosu na kontrolu. Intenzitet izoforme PPX1 bio je slabiji nakon tretmana s 25 i 50 μM AgNP-citrat, a jači pri 100 μM u usporedbi s kontrolom. Intenzitet vrpce PPX2 i PPX3 se postepeno pojačavao s porastom koncentracije nanočestica, a najjači je bio pri 100 μM AgNP-citrat. Niti jedna ispitana koncentracija citrata nije znatno promijenila aktivnost izoformi PPX u odnosu na kontrolu. U svim tretmanima s AgNP-citrat signali izoformi PPX4 - PPX6 bili su znatno slabiji od kontrole, a pri 100 μM AgNP-citrat signal je bio nešto jači u usporedbi s ostalim ispitanim koncentracijama. Nakon izlaganja klijanaca 10 μM citratu intenzitet vrpce PPX4 - PPX6 nije se razlikovao od kontrole, dok je nakon tretmana s 25 μM citratom intenzitet bio smanjen.

Nakon izlaganja klijanca duhana tretmanima s AgNP-PVP te omotačem PVP također je uočeno šest izoformi PPX (Slika 17b). Intenzitet izoforme PPX1 bio je jači od kontrole nakon tretmana sa 100 i 150 μM AgNP. Intenzitet vrpce PPX2 i PPX3 povećavao se s porastom koncentracije AgNP-PVP, a najjači signal u odnosu na kontrolu uočen je pri koncentracijama od 100 i 150 μM . Tretmani s AgNP-PVP rezultirali su značajno slabijom aktivnošću izoformi PPX4 - PPX6 u usporedbi s kontrolom. Pri obje koncentracije omotača PVP sve su vrpce, osim PPX1, bile slabijeg intenziteta u odnosu na izoforme iz kontrole.

Na slici 17c vidljivo je šest izoformi PPX koje su detektirane nakon tretmana s AgNP-CTAB te omotačem CTAB. U svim tretmanima signal izoforme PPX1 bio je jači od kontrole. Intenzitet vrpce PPX2 i PPX3 rastao je s porastom koncentracije nanočestica. Pri obje ispitane koncentracije omotača CTAB uočen je jači intenzitet vrpce PPX1 i PPX2 u usporedbi s kontrolom. U svim tretmanima signal izoforme PPX4 bio je slabiji od kontrole. Izoforme PPX5 i PPX6 pokazale su slabiji intenzitet od kontrole u svim tretmanima s AgNP-CTAB, ali zamječen je postepeni porast jačine signala s porastom koncentracije nanočestica. Pri obje koncentracije

samog omotača CTAB nije bilo znatne promjene u intenzitetu vrpce PPX5 u odnosu na kontrolu, dok je vrpca PPX6 imala slabiji intenzitet.

U klijancima izloženim ionskom srebru je nakon svih tretmana uočeno šesti izoformi PPX (Slika 17d). Izoenzimi PPX1 - PPX3 imali su jači intenzitet od kontrolnih uzoraka, a primijetila sam i postepeni porast jačine signala tih vrpca s porastom koncentracije AgNO_3 . Vrpce PPX4 - PPX6 pokazale su slabiji intenzitet od kontrole pri svim koncentracijama AgNO_3 , izuzev koncentracije od $50 \mu\text{M}$.



Slika 17. Aktivnost i izoforme pirogalol peroksidaze u gelu nakon nativne PAG elektroforeze dobivene iz klijanaca duhana koji su bili 7 dana tretirani s: a) AgNP-citrat, b) AgNP-PVP, c) AgNP-CTAB, d) AgNO₃ te omotačima citrat (a), PVP (b) i CTAB (c). K - kontrola, 1 - 25 μ M, 2 - 50 μ M, 3 - 75 μ M, 4 - 100 μ M, 5 - 150 μ M, 6 - 10 μ M omotač, 7 - 25 μ M omotač.

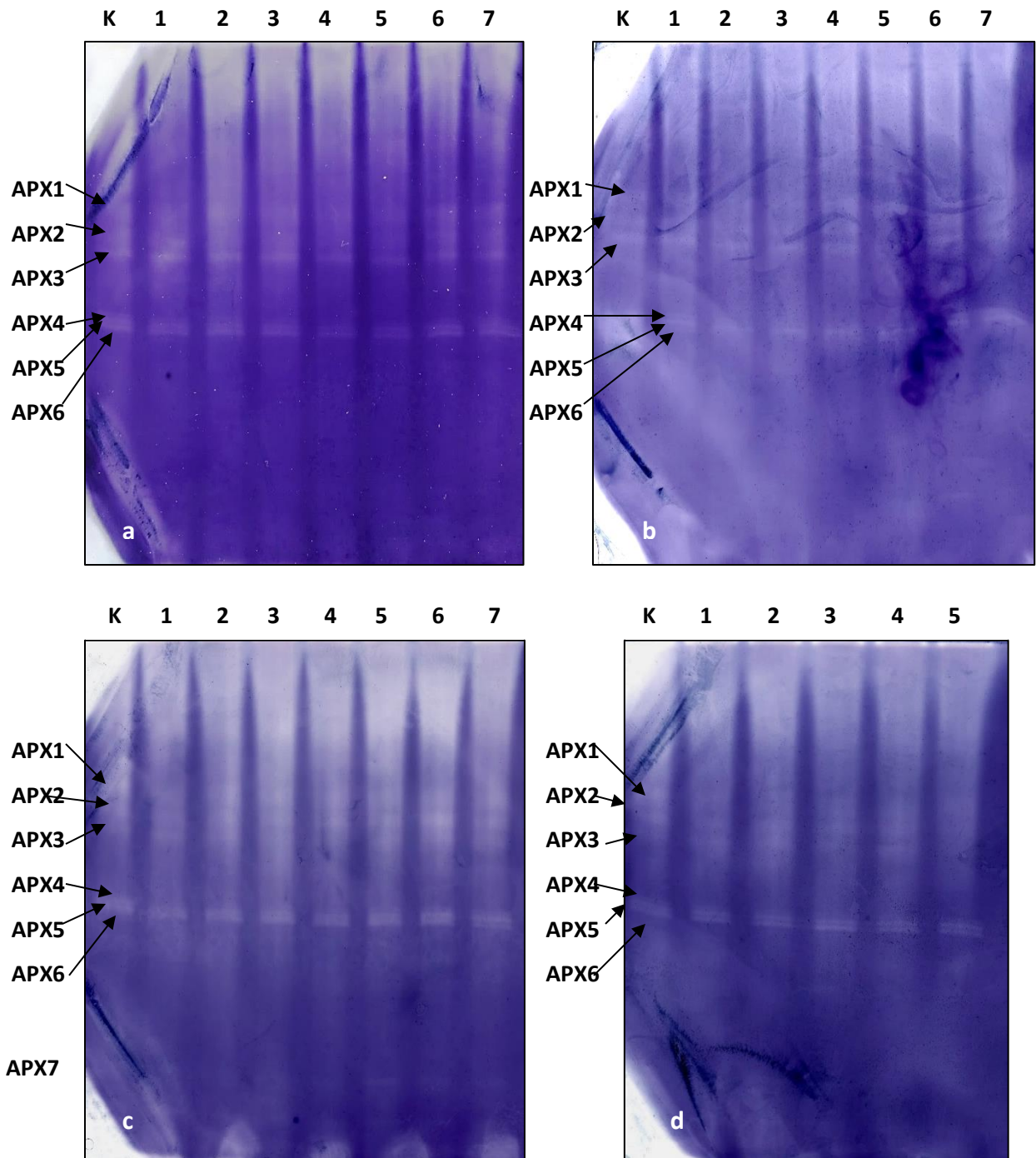
4.6.3. Aktivnost askorbat peroksidaze

Na slici 18a prikazane su izoforme APX detektirane nakon izlaganja klijanaca duhana tretmanima s AgNP-citrat i citratnim omotačem. U kontroli je bilo prisutno šest izoformi APX, koje su prema rastućoj pokretljivosti označene kao APX1, APX2, APX3, APX4, APX5 i APX6. Izoforme APX1 - APX3 bile su vidljive u svim tretmanima pri čemu su vrpce APX1 i APX2 pokazale najslabiji intenzitet nakon tretmana sa 150 μM AgNP-citrat. Najslabiji signal pokazala je izoforma APX4, čiji se intenzitet smanjivao s porastom koncentracije nanočestica. Izoforme APX5 i APX6 bile su prisutne u svim tretmanima, a njihov intenzitet opadao je s porastom koncentracije nanočestica. Suprotno tome, u tretmanima s omotačem citratom nije bilo razlika u aktivnosti APX4, APX5 i APX6 u odnosu na kontrolu.

Nakon izlaganja klijanaca duhana nanočesticama AgNP-PVP te omotaču PVP uočeno je ukupno 6 izoformi APX (Slika 18b), ali zbog nakupljene boje nije bilo moguće raspoznati vrpce nakon tretmana sa 150 μM nanočesticama te pojedine vrpce nakon tretmana s omotačem. Također, u kontroli se nisu mogle vidjeti izoforme APX4, APX5 i APX6 jer je taj dio gela bio blijed. Izoforme APX1, APX2 i APX3 bile su prisutne u kontroli i svim tretmanima s podjednakim intenzitetom. Pri koncentraciji od 25 μM AgNP-PVP uočila sam izoforme APX4, APX5 i APX6, čiji je intenzitet opadao s porastom koncentracije nanočestica. Pri obje ispitane koncentracije omotača PVP detektirane su vrpce APX4 i APX5.

Na slici 18c su vidljive izoforme APX u gelu dobivene nakon izlaganja klijanaca nanočesticama AgNP-CTAB te omotaču CTAB. U kontroli je uočeno šest izoformi APX, koje su bile prisutne i u svim tretmanima, a najslabijeg su intenziteta bile nakon tretmana s 25 μM AgNP-CTAB. Izoforme APX2, APX5 i APX6 imale su najjači intenzitet signala nakon izlaganja klijanaca tretmanu s 10 μM omotačem CTAB. Izoforma APX7 je vidljiva kao vrpca slabijeg intenziteta u svim tretmanima.

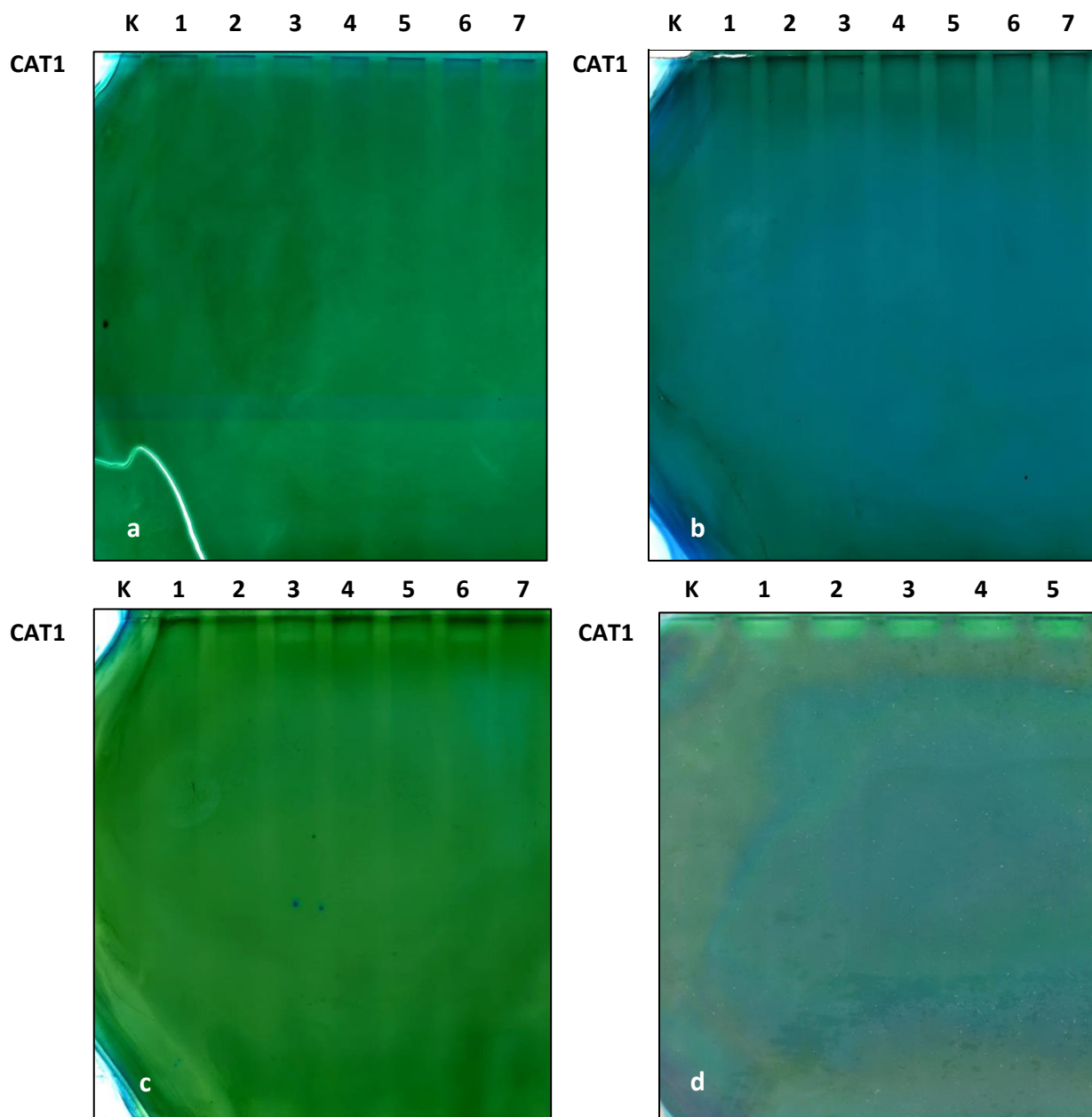
Nakon tretmana s AgNO₃ na gelu je bilo vidljivo šest izoformi APX, koje su uočene i u kontroli (Slika 18d). Vrpce APX1, APX2 i APX3 bile u vrlo slabog intenziteta nakon izlaganja 150 μM AgNO₃. Intenzitet izoformi APX5 i APX6 bio je najjači pri koncentraciji od 75 μM .



Slika 18. Aktivnost i izoforme askorbat peroksidaze u gelu nakon native PAG elektroforeze dobivene iz klijanaca duhana koji su bili 7 dana tretirani s: a) AgNP-citrat, b) AgNP-PVP, c) AgNP-CTAB, d) AgNO₃ te omotačima citrat (a), PVP (b) i CTAB (c). K - kontrola, 1 - 25 μM, 2 - 50 μM, 3 - 75 μM, 4 - 100 μM, 5 - 150 μM, 6 - 10 μM omotač, 7 - 25 μM omotač.

4.6.4. Aktivnost katalaze

Analiza aktivnosti i izoformi katalaze nije pokazala razlike između kontrole i bilo kojeg od ispitanih tretmana (Slika 19b). Na svim gelovima uočena je samo jedna izoforma, CAT1.



Slika 19. Aktivnost i izoforme katalaze u gelu nakon native PAG elektroforeze dobivene iz klijanaca duhana koji su bili 7 dana tretirani s: a) AgNP-citrat, b) AgNP-PVP, c) AgNP-CTAB, d) AgNO₃ te omotačima citrat (a), PVP (b) i CTAB (c). K - kontrola, 1 - 25 μ M, 2 - 50 μ M, 3 - 75 μ M, 4 - 100 μ M, 5 - 150 μ M, 6 - 10 μ M omotač, 7 - 25 μ M omotač.

RASPRAVA

5. RASPRAVA

Nanočestice srebra (AgNP) danas imaju primjenu u brojnim industrijskim i znanstvenim područjima te komercijalnim proizvodima prvenstveno zbog antimikrobne učinkovitosti te izuzetnih optičkih i katalitičkih svojstava. Budući da se kontinuirano razvijaju nanočestice novih karakteristika i pronalaze nove primjene, može se očekivati i njihovo povećano otpuštanje u okoliš s nepoznatim posljedicama. Velika reaktivnost, male dimenzije i specifična svojstva nanočestica predstavljaju poseban rizik za biološke sustave, stoga potencijalni toksični učinci nanočestica moraju biti detaljno proučeni prije širenja njihove upotrebe. U nanotoksikološkim istraživanjima odnedavno posebno mjesto zauzimaju biljke jer su temeljna komponenta ekosustava i imaju važnu ulogu u sudbini i transportu dizajniranih nanočestica u okolišu kroz njihov unos i bioakumulaciju (Ma i sur., 2010). Indukcija oksidacijskog stresa, oštećenje DNA i apoptoza su uglavnom prihvaćeni kao mehanizmi toksičnosti AgNP (Ahamed i sur., 2010). Važna karakteristika AgNP je moguće otpuštanje iona Ag^+ zbog površinske oksidacije (Riaz Ahmed i sur., 2017). Međutim, još uvijek nije razjašnjeno u kojoj mjeri je ionski oblik srebra odgovoran za toksične učinke, a u kojoj mjeri same nanočestice. Iz tog razloga je potrebno u istraživanjima primjenjivati i tretmane s ionskim srebrom. Od prioritetne je važnosti povezivanje fizikalno-kemijskih svojstava nanočestica s njihovim biološkim učincima. Tijekom sinteze nanočestica često im se dodaju omotači radi sprječavanja aglomeracije i dodatne stabilizacije. Biološki učinci samih omotača su nedovoljno istraženi, a često zanemarivanje njihovog utjecaja u istraživanjima toksičnosti nanočestica može biti razlog varijabilnosti među rezultatima. Stoga sam u ovom istraživanju ispitala učinke AgNP koje su bile stabilizirane s tri različita omotača (citrat, PVP ili CTAB), ali i učinke samih omotača na isključavanje i rast klijanaca duhana (*Nicotiana tabacum* L.) te na pojavu oksidacijskog stresa u klijancima. Također, usporedila sam učinke nanočestica i omotača na navedene parametre s učincima ionskog srebra (u obliku $AgNO_3$), koje sam primijenila u jednakom rasponu koncentracija kao i AgNP.

Nanočestice mogu izazvati promjene u biljkama na morfološkoj, fiziološkoj, biokemijskoj i molekularnoj razini. U istraživanju sam prvo pratila utjecaj AgNP i njihovih omotača, te utjecaj $AgNO_3$ na dinamiku isključavanja sjemenki duhana u periodu od pet dana. Nanočestice AgNP-

citrat i citratni omotač nisu pokazali značajan učinak na klijavost sjemenki niti u jednoj primijenjenoj koncentraciji u usporedbi s kontrolom, što je u skladu s rezultatima koje su zabilježili Geisler-Lee i sur. (2012) nakon ispitivanja učinka nanočestica AgNP-citrat na isključavanje vrste *Arabidopsis thaliana*. Nasuprot tome, Pokhrel i Dubey (2013) su pokazali negativan učinak AgNP-citrat na isključavanje vrste *Zea mays*, što pokazuje da učinak nanočestica na isključavanje ovisi o biljnoj vrsti. Nadalje, primjena nanočestica AgNP-PVP te omotača PVP također nije znatno utjecala na isključavanje sjemenki duhana. Sukladno mojim rezultatima, Yin i sur. (2012) nisu zabilježili značajan učinak AgNP-PVP na isključavanje 11 vrsti vodenih biljaka, a tretman s AgNP-PVP nije utjecao ni na klijavost vrste *Eruca sativa* (Vannini i sur., 2013). Nasuprot nanočesticama AgNP-citrat i AgNP-PVP, nanočestice AgNP-CTAB značajno su inhibirale isključavanje sjemenki duhana već pri najnižoj ispitanoj koncentraciji, a povećanje inhibicije isključavanja raslo je s povećanjem koncentracije nanočestica. Sam omotač CTAB je pri obje koncentracije pokazao značajan negativan učinak na ukupnu klijavost sjemenki u odnosu na kontrolu. Ovi rezultati pokazuju da utjecaj nanočestica srebra na isključavanje uvelike ovisi o omotaču koji se koristi za njihovu stabilizaciju. Nadalje, tretman ionskim srebrom nije pokazao značajan učinak na klijavost sjemenki duhana u usporedbi s kontrolom u mom istraživanju. Nasuprot tome, Pokhrel i Dubey (2013) su zabilježili inhibiciju isključavanja sjemenki vrste *Brassica oleracea* nakon tretmana s AgNO_3 , dok je u istraživanju Yin i sur. (2012) tretman s AgNO_3 pokazao stimulirajući učinak na klijavost sjemenki pet od 11 ispitanih vrsta vodenih biljaka, što sugerira da razlike u fitotoksičnom odgovoru na tretmane sa srebrom ne ovise samo o primijenjenoj koncentraciji Ag, već i o biljnoj vrsti. Usporedba učinaka AgNP na isključavanje sjemenki duhana s učincima ionskog srebra pokazuje načelno negativan učinak nanočestica srebra za razliku AgNO_3 , iako je toksičnost AgNP uvelike ovisila o omotaču koji je primijenjen za njihovu stabilizaciju. U istraživanju autora Yasur i Rani (2013) sjemenke vrste *Ricinus communis* L. imale su smanjenu klijavost nakon izlaganja tretmanima s AgNO_3 , dok tretman s AgNP-PVP nije pokazao negativan učinak te su autori pretpostavili da je smanjena toksičnost nanočestica posljedica stabilizacije AgNP s omotačem PVP, što je u skladu s mojim rezultatima. U istraživanju koje su proveli Yin i sur. (2012) primjena AgNO_3 je pokazala čak stimulirajući učinak na isključavanje više vrsta vodenih biljaka, dok AgNP ili nisu imale značajan učinak (AgNP-PVP) ili

su imale primarno inhibirajući učinak (AgNP-GA, nanočestice stabilizirane gumi arabikom). Autori su objasnili da je visoka toksičnost AgNP-GA najvjerojatnije posljedica kombinacije manje veličine, omotača i jačeg površinskog naboja u odnosu na AgNP-PVP. Također, viša toksičnost u odnosu na AgNO₃ sugerira da toksičnost nanočestica nije samo posljedica otpuštanja iona srebra. Moji rezultati i rezultati iz literature pokazuju kako omotači nanočestica imaju veliki utjecaj na toksično djelovanje AgNP na isključivanje različitih biljnih vrsta.

Smanjenje biljne biomase i inhibicija rasta korijena su važni indikatori fitotoksičnosti. Tri tjedna nakon nasađivanja sjemenki duhana na podloge s različitim AgNP i omotačima te AgNO₃ analizirala sam prosječnu duljinu korjenčića i svježiu masu klijanaca. Uočila sam postepeno smanjenje prosječne duljine korjenčića s porastom koncentracija AgNP-citrat i AgNP-PVP, a omotači citrat i PVP su pri koncentraciji od 25 μM jače inhibirali rast korjenčića od odgovarajućih nanočestica u istoj koncentraciji. Međutim, citrat je u niskoj koncentraciji od 10 μM potaknuo rast korjenčića, što pokazuje da niže koncentracije ovog omotača imaju stimulirajući, a više koncentracije inhibirajući učinak na rast korjenčića. Iako AgNP-citrat u istraživanju autora Geisler-Lee i sur. (2012) nisu utjecale na isključivanje vrste *Arabidopsis thaliana*, svi tretirani klijanci su imali kraće korjenčiće u odnosu na kontrolne klijance, a negativan učinak je bio izraženiji s porastom koncentracije AgNP, što je u skladu s rezultatima mog istraživanja. Nasuprot tome, autori Pokhrel i Dubey (2013) nisu utvrdili značajan učinak čestica AgNP-citrat na rast korijena vrste *Zea mays*, što ponovo pokazuje da osjetljivost na nanočestice srebra ovisi o biljnoj vrsti. Tretmani s AgNP-citrat i AgNP-PVP nisu imali značajan učinak na rast korijena vrste *Allium cepa* niti pri najvećoj ispitanoj koncentraciji od 100 μM u istraživanju koje su proveli Cvjetko i sur. (2017). S druge strane, Yin i sur. (2012) zabilježili su povećanje duljine korijena u tri od 11 vrsta vodenih biljaka nakon izlaganja nanočesticama AgNP-PVP, no većina ostalih vrsta biljaka koje su koristili u istraživanju imala je značajno kraće korijenje nakon tretmana istim nanočesticama, što je još jedan dokaz da nisu sve biljne vrste jednako osjetljive na djelovanje nanosrebra. U istraživanju utjecaja nanočestica AgNP-PVP na rast korijena vrste *Eruca sativa*, Vannini i sur. (2013) također su zabilježili stimulirajući učinak pri nižim koncentracijama nanosrebra. Na temelju svih navedenih rezultata može se zaključiti da nanočestice srebra mogu imati i stimulirajući i inhibirajući učinak na rast korijena, a to ovisi o

primijenjenoj koncentraciji i biljnoj vrsti. U svom istraživanju, najizraženiji inhibitorni učinak na rast korjenčića klijanaca duhana primijetila sam nakon tretmana s AgNP-CTAB te omotačem CTAB; pri najvišim ispitanim koncentracijama AgNP-CTAB te pri obje koncentracije omotača duljinu korjenčića nije bilo moguće izmjeriti. Cvjetko i sur. (2017) su u svom ispitivanju tri tipa nanočestica srebra (AgNP-citrat, AgNP-PVP i AgNP-CTAB) na rast korijena vrste *A. cepa* također zabilježili najizraženiji negativan učinak nakon tretmana s AgNP-CTAB. Autori su takav rezultat pripisali maloj veličini (< 10 nm) i snažnom pozitivnom naboju nanočestica AgNP-CTAB. To bi moglo biti i djelomično objašnjenje mojih rezultata jer, iako su AgNP koje sam koristila u ovom radu bile većeg promjera (50 nm), pozitivno nabijeni omotač CTAB mogao bi biti glavni uzrok negativnog učinka na rast korjenčića, što uostalom potvrđuju i rezultati tretmana sa samim omotačem. Ovi rezultati su i dodatna potvrda hipotezi da omotači nanočestica imaju značajan učinak na njihovu fitotoksičnost. Tretman ionskim srebrom je pokazao inhibitorni učinak na rast korjenčića klijanaca pri višim koncentracijama, što je u skladu s rezultatima Cvjetko i sur. (2017) u kojima je AgNO₃ značajno inhibirao rast korijena luka nakon izlaganja višim koncentracijama. Negativan učinak AgNO₃ na rast korijenja je zabilježen i u vrstama *Zea mays* i *Brassica oleracea* (Pokhrel i Dubey, 2013). No, Vannini i sur. (2013) su pokazali da tretmani s AgNO₃ mogu stimulirati rast korijena vrste *Eruca sativa*, ali samo nakon primijene u nižim koncentracijama. U ovom istraživanju su AgNP-citrat, AgNP-PVP i AgNO₃ slično inhibirali rast korjenčića klijanaca duhana s povećanjem koncentracija, a najizraženiji toksični učinak su pokazale nanočestice AgNP-CTAB, što opet ukazuje na ovisnost toksičnosti o omotaču.

Što se tiče učinka na svježu masu klijanaca, sve ispitane koncentracije AgNP-citrat uzrokovale su značajno smanjenje u odnosu na kontrolu. Vinković i sur. (2017) također su utvrdili značajno smanjenje biomase vrste *Capsicum annuum* L. nakon tretmana s AgNP-citrat. Za razliku od toga, tretman sa samim citratnim omotačem, pri koncentraciji od 25 µM, je rezultirao statistički značajnim porastom svježje mase klijanaca duhana. Na temelju usporedbe AgNP-citrat i citratnog omotača čini se da je ispoljavanje toksičnog učinka bilo posljedica djelovanja nanočestica jer su tretmani sa samim omotačem imali stimulirajući učinak. Nanočestice AgNP-PVP su izazvale značajno smanjenje mase klijanaca samo pri najvišoj ispitanoj koncentraciji, dok sam omotač PVP nije pokazao značajan utjecaj. Najznačajnije

zmanjenje mase sam uočila nakon tretmana s AgNP-CTAB i omotačem CTAB, a negativan učinak na prirast je bio izraženiji s povećanjem koncentracije nanočestica. Omotač CTAB je pri niskim ispitanim koncentracijama od 10 i 25 μM pokazao najnegativniji učinak na prirast svježe mase klijanaca u odnosu na kontrolu i sve ostale tretmane. Izlaganje klijanaca riže AgNP rezultiralo je značajnim smanjenjem svježe mase korijena i izdanka (Nair i Chung, 2014), a Hawthorne i sur. (2012) također su izvjestili da su AgNP uzrokovale smanjenje biomase vrste *Cucurbita pepo* za 49 - 91%. Ionsko srebro je pri svim ispitanim koncentracijama, izuzev najveće, uzrokovalo značajan porast svježe mase klijanaca duhana. Suprotno tome, Vinković i sur. (2017) su utvrdili značajno smanjenje biomase vrste *C. annuum* L. nakon tretmana s AgNO_3 . U ovom istraživanju AgNP su imale negativan učinak na prirast svježe mase klijanaca, posebno AgNP-CTAB, za razliku od AgNO_3 koji je pri svim ispitanim koncentracijama, osim najveće, uzrokovao porast svježe mase klijanaca u odnosu na kontrolu. Ovakav rezultat pokazuje da djelovanje ispitanih AgNP nije posljedica otpuštanja Ag^+ s nanočestica već djelovanja samih nanočestica.

Reaktivni oblici kisika (ROS) stvaraju se u biljkama kao nusprodukti više metaboličkih procesa unutar različitih staničnih odjeljaka. Pod optimalnim uvjetima njihova razina u stanici je niska zahvaljujući učinkovitosti antioksidacijskih mehanizama. Međutim, stresni čimbenici mogu poremetiti ravnotežu između stvaranja i uklanjanja ROS, što rezultira nakupljanjem ROS i oksidacijskim oštećenjem stanice. Mjerenjem količine produkata oksidacije lipida i proteina može se utvrditi je li došlo do oksidacijskog stresa u biljkama izloženim stresnim uvjetima. Biljni mehanizmi detoksikacije ROS uključuju sintezu enzimskih i neenzimskih antioksidacijskih molekula, stoga praćenje promjena u sadržaju neenzimskih molekula te koncentraciji ukupnih proteina i aktivnosti antioksidacijskih enzima može otkriti kako biljka odgovara na određeni stres (Montes i sur., 2017). U mom istraživanju nanočestice AgNP-citrat i citratni omotač nisu pokazali značajan utjecaj na koncentraciju proteina u odnosu na kontrolu. Suprotno ovim rezultatima, nakon tretmana s AgNP-citrat, koje su bile primijenjene u koncentracijama sličnim onima u mom istraživanju, koncentracija proteina u korjenčićima vrste *Allium cepa* bila je značajno povećana pri svim ispitanim koncentracijama osim najniže (Milošić, 2014), što ponovo pokazuje da utjecaj nanočestica istog tipa i slične koncentracije uvelike ovisi o tretiranoj biljnoj vrsti. Nakon tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO_3 sam primijetila da s porastom

koncentracije dolazi do povećanja koncentracije proteina u klijancima, a statistički značajne vrijednosti su postignute pri višim koncentracijama. Milošić (2014) je u svom istraživanju određivala koncentracije proteina u korjenčićima luka koji su također bili izloženi 25, 50, 75, 100 i 150 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃; značajan porast koncentracije proteina zabilježen je nakon tretmana s 75, 100 i 500 μM AgNP-PVP, što je u skladu s mojim rezultatima. U navedenom istraživanju tretmani korjenčića luka s AgNP-CTAB nisu utjecali na promjenu koncentracije proteina čak ni pri koncentraciji od 500 μM , dok je u mom istraživanju značajna promjena u koncentraciji proteina klijanaca tretiranih istim nanočesticama nastupila već pri koncentraciji od 75 μM . Nadalje, rezultate tretmana korjenčića luka s AgNO₃ (Milošić, 2014) mogu djelomično povezati s mojim jer je pri koncentracijama od 75 i 100 μM došlo do značajnog porasta koncentracije proteina u oba istraživanja. U mom diplomskom radu je tretman s AgNO₃ te s nanočesticama AgNP-PVP i AgNP-CTAB uzrokovao povećanje ukupne koncentracije proteina u klijancima pri većim koncentracijama, dok AgNP-citrat nisu pokazale učinak, što ponovo pokazuje kako omotač za stabilizaciju nanočestica može imati utjecaj na njihovu toksičnost.

Količinu malondialdehida sam mjerila kako bih utvrdila razinu lipidne peroksidacije u klijancima nakon tretmana. Nanočestice AgNP-citrat su značajno smanjile sadržaj MDA pri višim koncentracijama od 100 i 150 μM , dok su obje ispitane koncentracije citratnog omotača izazvale značajno smanjenje MDA u odnosu na kontrolu i tretmane s nižim koncentracijama AgNP-citrat. U istraživanju Milošić (2014), AgNP-citrat su pri višim koncentracijama od 100 i 500 μM značajno smanjile sadržaj MDA u korjenčićima luka, što odgovara mojim zapažanjima. Suprotno mojim rezultatima, AgNP-citrat nisu izazvale značajne promjene u razini lipidne peroksidacije u klijancima duhana (Biba, 2016). Razlog ovako različitim rezultatima mogu biti različiti eksperimentalni uvjeti uzgoja klijanaca. Naime, u istraživanju koje je provela Biba (2016), klijanci duhana su od stadija sjemenke rasli 30 dana na krutim podlogama s dodatkom nanočestica, dok su u mom istraživanju dva tjedna stari klijanci bili izloženi tretmanima u trajanju od sedam dana, što pokazuje kako eksperimentalni uvjeti također mogu utjecati na fitotoksičnost AgNP. U klijancima vrste *Pisum sativum* došlo je do znatnog povećanja razine MDA nakon izlaganja visokim koncentracijama od 1000 i 3000 μM AgNP (Tripathi i sur., 2017b),

dok su Sharma i sur. (2012b) izvijestili o pozitivnom učinku AgNP na rast i antioksidacijski status klijanaca vrste *Brassica juncea* u kojima su razine MDA bile snižene. U mom istraživanju, tretman klijanaca duhana s AgNP-PVP samo je pri višim koncentracijama izazvao porast lipidne peroksidacije, dok su nanočestice AgNP-CTAB samo pri koncentraciji od 75 μM značajno smanjile sadržaj MDA. Niti jedna primijenjena koncentracija samih omotača PVP i CTAB nije značajno utjecala na razinu lipidne peroksidacije. U istraživanju Milošić (2014) zabilježeno je smanjenje lipidne peroksidacije u korjenčićima luka pri višim koncentracijama AgNP-PVP te porast lipidne peroksidacije pri svim koncentracijama AgNP-CTAB, izuzev najviše od 500 μM . To je suprotno učincima koje sam ja primijetila za navedene nanočestice, a razlike bi se mogle pripisati različitim biljnim vrstama (luk i duhan), ali i različitoj vrsti (korijen i klijanci) i starosti tkiva (potpuno diferencirano i mlado tkivo). U klijancima duhana izloženim AgNO_3 nisam zabilježila promjenu sadržaja MDA u usporedbi s kontrolom. Suprotno mojim rezultatima, u istraživanju autorice Biba (2016) zabilježen je značajan porast lipidne peroksidacije u klijancima duhana pri koncentracijama 50, 75, 100 i 500 μM AgNO_3 , a razlog tome bi ponovo mogao biti u različitim eksperimentalnim uvjetima. Za razliku od neutralnog učinka AgNO_3 na sadržaj MDA u klijancima duhana, učinak nanočestica srebra na pojavu lipidne peroksidacije je ovisio o omotaču kojim su bile stabilizirane; AgNP-citrat su uzrokovale smanjenje sadržaja MDA pri 100 i 150 μM , AgNP-PVP porast sadržaja MDA pri 150 μM , a AgNP-CTAB pad razine MDA samo pri 75 μM .

Razinu proteinskih karbonila mjerila sam kako bih utvrdila učinak ispitanih tretmana na oksidaciju proteina. Nisam zabilježila promjene u sadržaju proteinskih karbonila nakon tretmana s AgNP-citrat te citratnim omotačem. Nasuprot tome, Biba (2016) je utvrdila porast oksidacije proteina u klijancima duhana tretiranim s 50, 100 i 500 μM AgNP-citrat, dok je u istraživanju Cvjetko i sur. (2017) izlaganje korjenčića luka nanočesticama AgNP-citrat značajno povećalo oksidaciju proteina već pri koncentraciji od 50 μM . Navedene razlike vjerojatno su posljedica različite osjetljivosti različitih biljnih vrsta i drugačijih eksperimentalnih uvjeta. Nakon tretmana s AgNP-PVP i omotačem PVP nisu zabilježene statistički značajne promjene sadržaja karbonila u klijancima duhana. Cvjetko i sur. (2017) su uočili povećanje razine karbonila u korjenčićima luka izloženim AgNP-PVP, koje je bilo ovisno o primijenjenoj koncentraciji.

Primjena AgNP-CTAB rezultirala je smanjenom razinom karbonila u klijancima duhana pri višim koncentracijama; s druge strane, obje koncentracije omotača CTAB dovele su do porasta sadržaja karbonila, koji nije bio statistički značajan u odnosu na kontrolu, ali je bio značajan u usporedbi s tretmanima s AgNP-CTAB primijenjenim u koncentracijama 50, 75 i 150 μM . Za razliku od mojih rezultata, u korjenčićima luka došlo je do porasta sadržaja karbonila nakon tretmana s AgNP-CTAB (Cvjetko i sur., 2017). U klijancima izloženim ionskom srebru zabilježila sam porast razine proteinskih karbonila, koji je bio statistički značajan pri koncentraciji 75 μM . U istraživanju Cvjetko i sur. (2017) također je zabilježeno značajno povećanje karbonilacije proteina u korjenčićima luka tretiranim sa 75 i 100 μM AgNO_3 . Nasuprot tome, u istraživanju autorice Biba (2016) tretman ionskim srebrom nije uzrokovao promjenu sadržaja karbonila u klijancima duhana u odnosu na kontrolu. Uočene razlike ponovo se mogu pripisati različitim biljnim vrstama i eksperimentalnim uvjetima. Na temelju dobivenih rezultata vidljivo je da nanočestice srebra nisu uzrokovale značajne promjene razine proteinskih karbonila u usporedbi s kontrolom, dok je ionsko srebro povećalo sadržaj karbonila samo pri koncentraciji od 75 μM , što ukazuje na pojavu oksidacijskog stresa.

Analiza aktivnosti antioksidacijskih enzima je važna u razumijevanju pojave oksidacijskog stresa koji može nastati kao posljedica fitotoksičnog učinka nanočestica. Stoga sam spektrofotometrijski mjerila aktivnosti enzima SOD, PPX, APX i CAT. Uz to, odredila sam i sastav izoformi navedenih enzima razdvajanjem proteina nativnom elektroforezom. Potrebno je napomenuti da su se na ovaj način razdvojili samo proteini koji su se zbog ukupnog negativnog naboja kretali prema anodi, što može biti razlog pojedinim odstupanjima u aktivnosti enzima u odnosu na one dobivene spektrofotometrijskim mjerenjem.

U stanicama pod stresnim uvjetima superoksid dismutaza djeluje kao prva linija obrane od povišenih razina ROS kroz dismutaciju O_2^- u H_2O_2 (Sharma i sur., 2012a). U tretmanu s AgNP-citrat zabilježila sam značajan porast aktivnosti SOD pri koncentraciji od 50 μM , dok ostale koncentracije nisu znatno utjecale na aktivnost enzima. To nije bilo u skladu s analizom izoformi SOD na gelu jer je uočeno pet izoformi pri svim koncentracijama AgNP-citrat. Nedostajala je samo izoforma SOD2 prisutna u kontroli. Ove nanočestice nisu utjecale na razinu proteinskih karbonila, dok je količina MDA čak bila i smanjena pri višim koncentracijama, što može

označavati aktivaciju drugih antioksidacijskih mehanizama. S druge strane, moguće je da je tretman s višim koncentracijama AgNP-citrat smanjio sadržaj lipidne komponente u tkivima klijanaca te su izmjerene niže razine MDA pod stresnim uvjetima. Da bi se to razjasnilo potrebno je istražiti i druge pokazatelje integriteta stanične membrane. U istraživanju autorice Biba (2016) je nakon izlaganja klijanaca duhana AgNP-citrat došlo do značajnog porasta aktivnosti SOD samo pri koncentraciji 100 μM , dok ja nisam detektirala promjenu aktivnosti SOD pri višim koncentracijama od 100 i 150 μM . Povećanje aktivnosti SOD ukazuje na aktivaciju obrane protiv oksidacijskog stresa izazvanog tretmanom i ključno je za preživljavanje biljaka. Mnoga istraživanja su izvijestila o povećanju aktivnosti SOD nakon izlaganja biljaka abiotičkim čimbenicima, među kojima su i nanočestice. Primjerice, u klijancima vrste *Pisum sativum* došlo je do značajne stimulacije aktivnosti SOD nakon izlaganja visokim koncentracijama od 1000 i 3000 μM AgNP (Tripathi i sur., 2017b). Također, Song i sur. (2013) su zabilježili povećanu aktivnost SOD u klijancima rajčice tretiranim AgNP. Međutim, i povećanje i inhibicija aktivnosti enzima može ukazivati na pojavu oksidacijskog stresa. Homae i Ehsanpour (2016) su primijetili značajno smanjenje aktivnosti SOD u vrsti *Solanum tuberosum* L. nakon tretmana višim koncentracijama AgNP, dok je pri nižim koncentracijama aktivnost enzima bila visoka. Autori su to povezali s povećanim stvaranjem ROS u tretiranim biljkama, jer je otprije poznato da jaki oksidacijski stres može inaktivirati SOD (Casano i sur., 1997). Na temelju toga ipak ne mogu izvoditi zaključke za svoje rezultate jer nisam primijenjivala jako visoke koncentracije i nisam mjerila razinu ROS u klijancima. Primjena samog citratnog omotača nije rezultirala promjenom aktivnosti enzima SOD, što je odgovaralo elektroforetskom profilu jer nije uočena promjena broja izoformi ni znatna promjena aktivnosti u odnosu na kontrolu. Također, omotač nije promijenio razinu karbonila, ali je pri obje koncentracije omotača izmjerena smanjena razina MDA. Izlaganje klijanaca AgNP-PVP nije imalo učinak na aktivnost enzima SOD. Na gelu su uočene iste izoforme SOD u tretmanima kao i u kontroli, osim SOD2 koja je bila prisutna samo pri najvišoj ispitanoj koncentraciji od 150 μM AgNP-PVP. Pri navedenoj koncentraciji AgNP-PVP zabilježen je porast lipidne peroksidacije, dok je aktivacija antioksidacijskih enzima izostala. Suprotno mojim rezultatima, AgNP-PVP su uzrokovale porast aktivnosti SOD u klijancima vrste *Ricinus communis* L. (Yasur i Rani, 2013). Nadalje, Kaveh i sur. (2013) su na temelju analize

ekspresije gena utvrdili postojanje oksidacijskog stresa u vrsti *Arabidopsis thaliana* nakon tretmana s AgNP-PVP. To opet potvrđuje da učinak nanočestica na određeni parametar ne ovisi samo o njihovom površinskom omotaču i koncentraciji već i o biljnoj vrsti. Tretman s omotačem PVP je izazvao značajan pad aktivnosti SOD u klijancima duhana samo pri koncentraciji od 10 μM , a pri toj koncentraciji razine MDA i karbonila nisu se znatno razlikovale od kontrole, što može ukazivati na aktivaciju kompenzirajućih antioksidacijskih mehanizama. U gelu je utvrđen jednak broj izoformi SOD nakon tretmana s omotačem PVP kao u kontroli. Nanočestice AgNP-CTAB su pri koncentracijama od 50, 100 i 150 μM značajno smanjile aktivnost SOD, što nije bilo usklađeno s izmjerenim sadržajem MDA i karbonila. Naime, primjena ovih nanočestica nije imala znatan utjecaj na sadržaj karbonila u klijancima, a pri koncentraciji 75 μM je zabilježen značajan pad razine MDA. Pri nižim koncentracijama AgNP-CTAB u gelu su utvrđene samo četiri izoforme od ukupno šest detektiranih. Pri koncentracijama 100 i 150 μM ustanovljen je jači signal SOD1, a pri 75, 100 i 150 μM i izoforma SOD3 koje nije bilo u kontroli, ali je pri 75 i 100 μM nedostajala izoforma SOD2. Gorczyca i sur. (2015) su izvijestili o padu aktivnosti SOD u listovima i korijenju pšenice nakon tretmana s AgNP, a dobiveni rezultat su povezali s činjenicom da AgNP, osim što potiču stvaranje ROS, mogu izazvati direktne promjene u konformaciji SOD kroz zamjenu metalnog iona i tako inhibirati aktivnost enzima. Obje koncentracije omotača CTAB su značajno smanjile aktivnost SOD u klijancima duhana, što se nije odrazilo na razinu MDA i proteinskih karbonila. Omotač CTAB je pri niskim koncentracijama od 10 i 25 μM značajnije smanjio aktivnost SOD od 25 μM AgNP-CTAB. Ova opažanja nisu potvrđena u gelu jer je pri 25 μM omotača utvrđen isti broj izoformi kao u kontroli, a pri 10 μM je prisutna izoforma SOD3 koje nema u kontroli. Tretman s AgNO₃ nije imao utjecaja na aktivnost SOD niti pri jednoj koncentraciji što je potvrđeno i u elektroforetskom profilu izoformi. Isto tako, nije zabilježena promjena razine MDA, ali je došlo do porasta razine karbonila pri koncentraciji od 75 μM AgNO₃, što ukazuje na neučinkovitost antioksidacijskog sustava. Suprotno mojim opažanjima, Yasur i Rani (2013) su utvrdili porast aktivnosti SOD u klijancima vrste *R. communis* nakon tretmana s AgNO₃. Slično, u istraživanju autorice Biba (2016) tretman klijanaca duhana s AgNO₃ je rezultirao povećanom aktivnošću SOD, pri čemu je najveća aktivnost bila zabilježena pri koncentraciji od 25 μM , nakon čega je uočeno opadanje

aktivnosti enzima s porastom koncentracije, što može ukazivati na preopterećenje antioksidacijskog sustava. U mom istraživanju ionsko srebro nije utjecalo na promjenu aktivnosti SOD u tretiranim klijancima, dok je utjecaj AgNP na aktivnost enzima ovisio o omotaču; AgNP-citrat su izazvale porast aktivnosti SOD pri 50 μM , AgNP-PVP nisu znatno utjecale na aktivnost, dok su AgNP-CTAB smanjile aktivnost SOD pri 50, 100 i 150 μM .

Enzimi peroksidaze su jedni od ključnih antioksidacijskih enzima koji razgrađuju H_2O_2 , a osim toga su uključene u različite procese rasta i razvitka biljaka (Pandey i sur., 2017). Nanočestice AgNP-citrat nisu znatno utjecale na aktivnost PPX u klijancima duhana. U istraživanju Cvjetko i sur. (2017) izlaganje korjenčića luka AgNP-citrat također nije znatno utjecalo na aktivnost PPX. Krishnaraj i sur. (2012) su pak izvijestili o porastu aktivnosti PPX u klijancima *Bacopa monnieri* L. nakon tretmana s AgNP. Suprotno tim rezultatima, Biba (2016) je utvrdila značajno smanjenje aktivnosti PPX u klijancima duhana tretiranim AgNP-citrat. Postojanje ovako različitih rezultata može se pripisati multifunkcionalnoj ulozi peroksidaza jer one ne sudjeluju samo u obrani od ROS, već su uključene u razne fiziološke procese poput metabolizma stanične stijenke, lignifikacije, suberinizacije, metabolizma auksina, zarastanja rana itd. (Pandey i sur., 2017). Pri obje koncentracije citratnog omotača došlo je do statistički značajnog porasta aktivnosti PPX, što odgovara sniženom sadržaju MDA, dok nije zabilježena promjena razine karbonila u odnosu na kontrolu. Suprotno tome, na gelu nisu uočene znatne promjene izoformi u usporedbi s kontrolom. Nadalje, AgNP-PVP su izazvale značajan pad aktivnosti PPX samo pri 25 μM , što se nije odrazilo na promjenu količine MDA i karbonila. Suprotno mojim rezultatima, povećanje aktivnosti PPX utvrđeno je u klijancima vrste *R. communis* L. nakon izlaganja AgNP-PVP (Yasur i Rani, 2013). Slično, Cvjetko i sur. (2017) su zabilježili porast aktivnosti PPX u korjenčićima luka izloženim AgNP-PVP pri koncentraciji od 100 μM , dok se u mom istraživanju aktivnost enzima ni pri 150 μM nije razlikovala od kontrole. Primjena samog omotača PVP nije pokazala utjecaj na aktivnost enzima PPX u klijancima duhana, a također nije došlo ni do promjene razine MDA i karbonila. Nadalje, sve primijenjene koncentracije AgNP-CTAB su značajno smanjile aktivnost PPX, a najviše koncentracija od 50 μM . Snažna inhibicija aktivnosti PPX i negativni učinci AgNP-CTAB na parametre rasta ukazuju na pojavu jakog oksidacijskog stresa. Međutim, to je u suprotnosti s rezultatima mjerenja sadržaja

MDA i karbonila. Naime, pri 75 μM je zabilježen pad razine MDA, dok nije bilo znatnih promjena količine karbonila u odnosu na kontrolu. U ovom slučaju bilo bi korisno imati podatke o razini ROS za dodatno objašnjenje. Za razliku od mojih rezultata, Cvjetko i sur. (2017) su nakon tretmana korjenčića luka istim nanočesticama zabilježili značajan porast aktivnosti PPX, ali samo pri koncentraciji 25 μM . Primjena omotača CTAB je rezultirala značajnim padom aktivnosti PPX u klijancima duhana pri obje ispitane koncentracije, ali to nije rezultiralo povećanim razinama lipidne peroksidacije i oksidacije proteina u klijancima. Tretman s AgNO_3 je uzrokovao značajan pad aktivnosti PPX pri koncentracijama od 50, 100 i 150 μM , što je u skladu s rezultatima iz istraživanja autorice Biba (2016), gdje je utvrđen pad aktivnosti PPX u klijancima duhana izloženim AgNO_3 u ovisnosti o koncentraciji. Za razliku od toga, Cvjetko i sur. (2017) su izvijestili o aktivaciji PPX u korjenčićima luka pri koncentracijama 50 i 75 μM AgNO_3 , dok je pri 100 μM aktivnost enzima odgovarala kontroli. Slično, aktivnost PPX je porasla u klijancima *R. communis* tretiranim s AgNO_3 , ali je pri višim koncentracijama zamijećen pad aktivnosti što ukazuje da je došlo do preopterećenja antioksidacijskog sustava (Yasur i Rani, 2013). U mom istraživanju ionsko srebro je smanjilo aktivnost PPX pri višim koncentracijama dok su učinci nanosrebra opet ovisili o omotaču; AgNP-citrat nisu utjecale na aktivnost enzima, AgNP-PVP su samo pri najnižoj koncentraciji smanjile aktivnost, dok je najznačajniji pad aktivnosti PPX zabilježen u tretmanima s AgNP-CTAB.

Askorbat peroksidaza je ključna komponenta askorbat-glutationskog ciklusa, prisutna je u različitim staničnim odjeljcima te ima veći afinitet za H_2O_2 od CAT i PPX, zbog čega je veoma učinkovita u njegovoj razgradnji pod stresnim uvjetima (Das i Roychoudhury, 2014). Tretiranje klijanaca duhana s AgNP-citrat nije značajno utjecalo na aktivnost APX u odnosu na kontrolu, ali postoje statistički značajne razlike između tretmana od 25 μM te 100 i 150 μM . U tom smislu uočen je porast aktivnosti APX, što bi moglo objasniti uočenu smanjenu razinu MDA nakon tretmana višim koncentracijama AgNP-citrat. Nasuprot rezultatima spektrofotometrijskog mjerenja, na gelu je pronađeno šest izoformi enzima u tretmanima kao i u kontroli, ali je uočeno smanjenje intenziteta izoformi s porastom koncentracije nanočestica. Primjena samog citratnog omotača nije rezultirala promjenom aktivnosti enzima APX u klijancima, što je potvrđeno u elektroforetskom profilu izoformi enzima. U istraživanju autorice Biba (2016)

zabilježen je značajan porast aktivnosti APX u klijancima duhana izloženim AgNP-citrat čak i pri koncentraciji od 25 μM , a razlika u odnosu na moje rezultate se opet može pripisati različitoj duljini i načinu tretmana. O povećanju aktivnosti APX su izvijestili i Sharma i sur. (2012b) nakon izlaganja klijanaca *B. juncea* nanočesticama srebra. Nasuprot tome, do smanjenja aktivnosti APX došlo je u korjenčićima luka nakon tretmana s 25, 75 i 100 μM AgNP-citrat (Cvjetko i sur., 2017). Nadalje, AgNP-PVP su uzrokovale statistički značajan pad aktivnosti APX pri 25 μM , a pri istoj koncentraciji je bio zabilježen i pad aktivnosti PPX. Međutim, pri toj koncentraciji je razina MDA i karbonila bila kao u kontroli. U gelu je pri koncentraciji od 25 μM detektiran isti broj izoformi kao i u drugim tretmanima, ali nije se moglo posve usporediti s kontrolom jer je gel na tom dijelu bio blijed. Omotač PVP nije pokazao utjecaj na aktivnost enzima APX pri ovim ispitanim koncentracijama. U istraživanju Cvjetko i sur. (2017) je utvrđen značajan pad aktivnosti APX u korjenčićima luka pri koncentraciji 50 μM , dok je u mom istraživanju došlo do pada aktivnosti već pri 25 μM . Nanočestice AgNP-CTAB značajno su smanjile aktivnost enzima APX u klijancima duhana pri svim ispitanim koncentracijama, a naročito pri 50 μM . Međutim, to je u suprotnosti s rezultatima mjerenja sadržaja MDA i karbonila, što je vrijedilo i za PPX. U istraživanju Cvjetko i sur. (2017) u korjenčićima luka izloženim AgNP-CTAB došlo je do značajnog pada aktivnosti APX samo pri koncentraciji 75 μM . Omotač CTAB je uzrokovao značajan pad aktivnosti APX pri obje koncentracije, što nije odgovaralo elektroforetskom profilu jer nije bilo razlike u broju izoformi u odnosu na kontrolu. Izlaganje klijanaca duhana nižim koncentracijama AgNO_3 izazvalo je porast aktivnosti APX, koji je bio statistički značajan pri 50 μM , dok je tretman većim koncentracijama smanjio aktivnost enzima na kontrolnu razinu, što može ukazivati na zasićenje antioksidacijskog sustava. Primjena AgNO_3 nije utjecala na razinu MDA, dok je značajan porast razine proteinskih karbonila zabilježen samo pri koncentraciji od 75 μM . U istraživanju autorice Biba (2016) je nakon tretiranja klijanaca duhana s AgNO_3 utvrđen značajan porast aktivnosti APX, čak i pri većim koncentracijama od 100 i 500 μM AgNO_3 , što nije u skladu s mojim rezultatima. Za razliku od toga, izlaganje korjenčića luka ionskom srebru u koncentracijama od 25, 50, 75 i 100 μM nije znatno utjecalo na aktivnost APX (Cvjetko i sur., 2017), što još jednom ukazuje na različitu osjetljivost različitih biljnih vrsta i tkiva na tretmane. Ionsko srebro i nanosrebro su različito promijenili aktivnost APX u klijancima duhana, pri čemu su učinci

nanosrebra ovisili o omotaču. Nanočestice AgNP-citrat nisu utjecale na aktivnost enzima u usporedbi s kontrolom, AgNP-PVP su izazvale značajan pad aktivnosti APX pri 25 μM , dok su AgNP-CTAB najizraženije smanjile aktivnost enzima pri svim ispitanim koncentracijama u odnosu na kontrolu i druge tretmane.

Katalaza je primarno prisutna u peroksisomima gdje njene izoforme razgrađuju H_2O_2 nastao tijekom fotorespiracije, β -oksidacije masnih kiselina i oksidacijskog stresa (Das i Roychoudhury, 2014). Izlaganje klijanaca duhana nanočesticama AgNP-citrat te citratnom omotaču nije uzrokovalo promjenu aktivnosti CAT, što je bilo u skladu s elektroforetskim profilom izoformi. Slično, ni u korjenčićima luka tretiranim istim nanočesticama nije bila znatno promijenjena aktivnost CAT (Cvjetko i sur., 2017). Za razliku od toga, Biba (2016) je utvrdila značajno smanjenje aktivnosti CAT u klijancima duhana nakon primjene 50, 75, 100 i 500 μM AgNP-citrat, što je vjerojatno posljedica već ranije navedene razlike u duljini tretmana. Naime, u istraživanju autorice Biba (2016) klijanci duhana bili su izloženi tretmanu 30 dana, dok su u mom istraživanju klijanci bili tretirani 7 dana te je moguće da taj period nije bio dovoljan da se uoči slična inhibicija aktivnosti. Smanjenje aktivnosti CAT je uočeno u listovima i korijenju pšenice nakon izlaganja AgNP (Gorczyca i sur., 2015), što su autori objasnili osjetljivošću enzima na povišenu razinu H_2O_2 . Izlaganje klijanaca duhana AgNP-PVP te omotaču PVP nije imalo učinka na aktivnost CAT, a to je potvrđeno i u gelu. Suprotno tome, Yasur i Rani (2013) su uočili povećanje aktivnosti CAT u klijancima *R. communis* L. nakon tretmana s AgNP-PVP, dok su Cvjetko i sur. (2017) zabilježili pad aktivnosti CAT u korjenčićima luka pri koncentraciji 50 μM AgNP-PVP. Nanočestice AgNP-CTAB su izazvale značajan pad aktivnosti CAT u klijancima duhana samo pri koncentraciji od 50 μM , iako taj tretman nije utjecao na promjenu sadržaja MDA i karbonila, što može ukazivati na djelovanje alternativnih antioksidacijskih mehanizama. Omotač CTAB je značajno smanjio aktivnost CAT samo pri koncentraciji od 25 μM , ali to nije utjecalo na razinu MDA i proteinskih karbonila. Izlaganje korjenčića luka AgNP-CTAB nije znatno promijenilo aktivnost CAT niti pri jednoj ispitanoj koncentraciji u istraživanju Cvjetko i sur. (2017). Nakon tretmana ionskim srebrom utvrdila sam značajan porast aktivnosti CAT u klijancima duhana pri 50, 75 i 100 μM , što ukazuje na pojavu stresa koji je uzrokovao aktivaciju antioksidacijskog sustava. Međutim, pri tome nije došlo do promjene količine MDA, dok je pri koncentraciji od 75

μM zabilježen porast razine oksidiranih proteina, što pokazuje neučinkovitost antioksidacijskog sustava. Suprotno mojim rezultatima, Biba (2016) je utvrdila značajan pad aktivnosti CAT u klijancima duhana, čak i pri niskoj koncentraciji od $25 \mu\text{M}$ AgNO_3 . Yasur i Rani (2013) su također izvijestili o smanjenoj aktivnosti CAT u klijancima *R. communis* L. nakon tretmana s AgNO_3 . Porast ili inhibicija aktivnosti antioksidacijskih enzima nakon tretmana može biti posljedica razlika među biljnim vrstama te različitih eksperimentalnih uvjeta. Tretmani s AgNO_3 te AgNP su imali različiti utjecaj na aktivnost CAT u klijancima duhana, pri čemu je učinak nanočestica i u ovom slučaju bio moduliran omotačem kojim su bile stabilizirane. Za razliku od ionskog srebra koje je pri višim koncentracijama potaklo aktivnost CAT, nanočestice AgNP-citrat i AgNP-PVP nisu pokazale učinak, dok su AgNP-CTAB smanjile aktivnost CAT pri $50 \mu\text{M}$.

Ovo istraživanje je pokazalo različite fitotoksične učinke ionskog srebra i nanosrebra na klijancima duhana pri čemu su učinci nanočestica ovisili o omotaču kojim su bile stabilizirane, iako su se učinci samih omotača pri pojedinim parametrima razlikovali od učinaka odgovarajućih nanočestica. Razlika u toksičnosti između AgNP i AgNO_3 sugerira da toksičnost nanočestica nije samo posljedica otpuštanja iona srebra već ovisi i o karakteristikama samih nanočestica. Nanočestice srebra su pokazale toksično djelovanje pri ispitanim parametrima rasta klijanaca, dok se za AgNO_3 može zaključiti da niže koncentracije nisu štetne za rast duhana. Omotač CTAB je pokazao najnegativniji učinak na rast klijanaca u odnosu na druge omotače. Porast sadržaja MDA je zabilježen pri najvećoj koncentraciji AgNP-PVP, dok je pri određenim koncentracijama AgNP-citrat i AgNP-CTAB čak zabilježen pad sadržaja MDA. U tretmanu sa citratnim omotačem je također došlo do smanjenja sadržaja MDA. Za razliku od toga, tretmani s AgNP i omotačima nisu znatno utjecali na sadržaj proteinskih karbonila, dok je tretman s AgNO_3 uzrokovao porast oksidacije proteina pri $75 \mu\text{M}$. Utvrđene promjene aktivnosti antioksidacijskih enzima te promjene u elektroforetskim profilima izoformi ukazuju na pojavu oksidacijskog stresa u klijancima pri određenim koncentracijama AgNP, omotača i AgNO_3 . Određivanje fitotoksičnosti nanočestica je složeno jer ovisi o više faktora među kojima su karakteristike nanočestica (npr. veličina, oblik, omotač), primijenjena koncentracija nanočestica, razlike između biljnih vrsta i eksperimentalnih uvjeta. Za izvođenje konačnih zaključaka o mehanizmima toksičnosti AgNP bilo bi potrebno istražiti kakav utjecaj imaju na

genom, proteom i metabolom biljnih stanica. Nadalje, na učinke nanočestica mogle bi utjecati i druge tvari budući da nanočestice mogu adsorbirati materijale koji imaju štetne učinke na organizme (Exbrayat i sur., 2015). Također, u toksikološkim istraživanjima potrebno je proučiti i utjecaj promjena koje nanočestice mogu proći u kontaktu s okolišnim komponentama u tlu, vodi i sedimentima jer one osim na pokretljivost ili agregaciju vjerojatno mogu utjecati i na promjenu karakteristika toksičnosti (Rana i Kalaichelvan, 2013).

ZAKLJUČAK

6. ZAKLJUČAK

1. Od tri tipa AgNP ispitanih u ovom istraživanju najizraženiji negativan učinak na isključavanje sjemenki duhana, rast korjenčića i promjenu svježe mase klijanaca su pokazale AgNP-CTAB. Nadalje, tretman omotačem CTAB je pokazao najnegativniji učinak na sve istražene parametre rasta klijanaca u odnosu na ostale tretmane, dok tretmani omotačima citrat i PVP nisu utjecali na klijavost sjemenki, ali su jače inhibirali rast korjenčića od odgovarajućih nanočestica iste koncentracije. Ovi rezultati pokazuju da toksičnost AgNP ovisi o omotaču.
2. Tretmani s AgNO_3 uglavnom nisu imali toksičan učinak na rast klijanaca u odnosu na tretmane s AgNP i omotačima te se može zaključiti da učinak zabilježen nakon izlaganja klijanaca nanočesticama srebra nije posljedica iona Ag^+ oslobođenih s AgNP, već djelovanja samih nanočestica.
3. Tretman s AgNP-citrat nije utjecao na ukupnu količinu proteina u klijancima duhana, dok su tretmani s višim koncentracijama AgNP-PVP i AgNP-CTAB doveli do porasta količine proteina. Nadalje, tretman omotačem PVP je povećao količinu proteina u odnosu na tretman s AgNP-PVP iste koncentracije, dok tretmani s drugim omotačima nisu pokazali učinak. Ovi rezultati ponovo pokazuju kako je djelovanje AgNP ovisno o omotaču koji je primijenjen za njihovu stabilizaciju.
4. Tretmani s AgNP i omotačima su izazvali promjene u lipidnoj peroksidaciji i aktivnosti antioksidacijskih enzima u klijancima, dok promjene u sadržaju proteinskih karbonila nisu utvrđene. Ovi rezultati pokazuju da navedeni tretmani izazivaju pojavu oksidacijskog stresa i ukazuju na toksične učinke nanočestica srebra.
5. Tretmani s AgNO_3 nisu uzrokovali lipidnu peroksidaciju, ali su izazvali porast sadržaja proteinskih karbonila te promjene u aktivnosti antioksidacijskih enzima, koje su bile drugačije od tretmana s AgNP. To pokazuje da je i tretman s AgNO_3 izazvao pojavu oksidacijskog stresa, ali drugim mehanizmima te navodi na zaključak da toksični učinak AgNP ne potječe od iona Ag^+ oslobođenih s AgNP, već je posljedica djelovanja samih nanočestica srebra.

LITERATURA

7. LITERATURA

- Abbaszadegan A, Ghahramani Y, Gholami A, Hemmateenejad B, Dorostkar S, Nabavizadeh M, Sharghi H (2015) The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: A preliminary study. *J Nanomater.* ID 720654, 8.
- Aebi M (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121–126.
- Ahamed M, AlSalhi MS, Siddiqui MKJ (2010) Silver nanoparticle applications and human health. *Clin Chim Acta.* 411:1841–1848.
- Anjum NA, Sofo A, Scopa A, Roychoudhury A, Gill SS, Iqbal M, Pereira E, Duarte AC, Ahmad I (2015) Lipids and proteins - major targets of oxidative modifications in abiotic stressed plants. *Environ Sci Pollut Res Int.* 22(6):4099–4121.
- Antony JJ, Sivalingam P, Chen B (2015) Toxicological effects of silver nanoparticles. *Environ Toxicol Pharmacol.* 40(3):729–732.
- Arora S, Sharma P, Kumar S, Nayan R, Khanna P, Zaidi M (2012) Gold-nanoparticle induced enhancement in growth and seed yield of *Brassica juncea*. *Plant Growth Regul.* 66(3):303–310.
- Asharani PV, Wu YL, Gong Z, Valiyaveetil S (2008) Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. *Nanotechnology.* 19:255102.
- Asli S, Neumann PM (2009) Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. *Plant Cell Environ.* 32:577–584.
- Balen B, Pavoković D, Peharec Štefanić P, Krsnik-Rasol M (2011) Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. Sveučilišni priručnik, Zagreb: Hrvatska sveučilišna naknada
- Beauchamp C, Fridovich I (1971) Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem.* 44:276–287.
- Behra R, Sigg L, Clift MJ, Herzog F, Minghetti M, Johnston B, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B (2013) Bioavailability of silver nanoparticles and ions: from a chemical and biochemical perspective. *J R Soc Interface.* 10(87):20130396.
- Biba R (2016) Utjecaj nanočestica srebra na pojavu oksidacijskog stresa i ekspresiju proteina u klijancima duhana (*Nicotiana tabacum*). Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248–254.

- Burklew CE, Ashlock J, Winfrey WB, Zhang B (2012) Effects of aluminum oxide nanoparticles on the growth, development, and microRNA expression of tobacco (*Nicotiana tabacum*). PLoS ONE. 7(5):e34783.
- Campisi S, Schiavoni M, Chan-Thaw CE, Villa A (2016) Untangling the role of the capping agent in nanocatalysis: Recent advances and perspectives. Catalysts. 6(12):185.
- Casano LM, Gómez LD, Lascano HR, González CA, Trippi VS (1997) Inactivation and degradation of CuZn-SOD by active oxygen species in wheat chloroplasts exposed to photooxidative stress. Plant Cell Physiol. 38:433–440.
- Chance B, Maehly AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. U: Colowick SP, Kaplan NO (ur.) Methods Enzymol. 2:764–775.
- Cohen D, Soroka Y, Ma'or Z, Oron M, Portugal-Cohen M, Brégégère FM, Berhanu D, Valsami-Jones E, Hai N, Milner Y (2013) Evaluation of topically applied copper(II) oxide nanoparticle cytotoxicity in human skin organ culture. Toxicol In Vitro. 27:292–298.
- Cox A, Venkatachalam P, Sahi S, Sharma N (2016) Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants: a review of current research. Plant Physiol Biochem. 107:147–163.
- Cvjetko P, Milošić A, Domijan AM, Vinković Vrček I, Tolić S, Peharec Štefanić P, Letofsky-Papst I, Tkalec M, Balen B (2017) Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. Ecotoxicol Environ Saf. 137:18–28.
- Das K, Roychoudhury A (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. Front Environ Sci. 2:53.
- de Lima R, Seabra AB, Durán N (2012) Silver nanoparticles: a brief review of cytotoxicity and genotoxicity of chemically and biogenically synthesized nanoparticles. J Appl Toxicol. 32(11):867-879.
- de la Rosa G, García-Castañeda C, Vázquez-Núñez E, Alonso-Castro AJ, Basurto-Islas G, Mendoza Á, Cruz-Jiménez G, Molina C (2017) Physiological and biochemical response of plants to engineered NMs: Implications on future design. Plant Physiol Biochem. 110:226–235.
- Dhawan A, Sharma V, Parmar D (2009) Nanomaterials: a challenge for toxicologists. Nanotoxicology 3(1):1–9.
- El Badawy AM, Silva RG, Morris B, Scheckel KG, Suidan MT, Tolaymat TM (2011) Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. Environ Sci Technol. 45(1):283–287.
- Exbrayat JM, Moudilou EN, Lapied E (2015) Harmful effects of nanoparticles on animals. J Nanotechnol. ID 861092, 10.

Faisal M, Saquib Q, Alatar AA, Al-Khedhairi AA, Hegazy AK, Musarrat J (2013) Phytotoxic hazards of NiO-nanoparticles in tomato: a study on mechanism of cell death. *J Hazard Mater.* 250–251:318–332.

Fröhlich E (2012) The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Intl J Nanomedicine.* 7:5577-5591.

Ganapathi TR, Suprasanna P, Rao PS, Bapat VA (2004) Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) - a model system for tissue culture interventions and genetic engineering. *Indian J Biotechnol.* 3(2):171-184.

García-Barrasa J, López-de-Luzuriaga JM, Monge M (2011) Silver nanoparticles: synthesis through chemical methods in solution and biomedical applications. *Cent Eur J Chem.* 9:7–19.

Geisler-Lee J, Wang Q, Yao Y, Zhang W, Geisler M, Li K, Huang Y, Chen Y, Kolmakov A, Ma X (2012) Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. *Nanotoxicology.* 7:323–337.

Gorczyca A, Pociecha E, Kasprowicz M, Niemiec M (2015) Effect of nanosilver in wheat seedlings and *Fusarium culmorum* culture systems. *Eur J Plant Pathol.* 142:251–261.

Hawthorne J, Musante C, Sinha SK, White JC (2012) Accumulation and phytotoxicity of engineered nanoparticles to *Cucurbita pepo*. *Int J Phytoremediation.* 14:429–442.

Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 125:189-198.

Homaee MB, Ehsanpour AA (2016) Silver nanoparticles and silver ions: Oxidative stress responses and toxicity in potato (*Solanum tuberosum* L) grown *in vitro*. *Hortic Environ Biotechnol.* 57(6):544-553.

Hossain Z, Mustafa G, Komatsu S (2015) Plant responses to nanoparticle stress. *Int J Mol Sci.* 16(11):26644–26653.

Jain N, Bhargava A, Pareek V, Akhtar MS, Panwar J (2017) Does seed size and surface anatomy play role in combating phytotoxicity of nanoparticles? *Ecotoxicology.* 26:238-249.

Jia CJ, Schüth F (2011) Colloidal metal nanoparticles as a component of designed catalyst. *Phys Chem Chem Phys.* 7:2457–2487.

Kaveh R, Li YS, Ranjbar S, Tehrani R, Brueck CL, Van Aken B (2013) Changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions. *Environ Sci Technol.* 47(18):10637-10644.

Kawata K, Osawa M, Okabe S (2009) In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environ Sci Technol.* 43:6046–6051.

Keat CL, Aziz A, Eid AM, Elmarzugi NA (2015) Biosynthesis of nanoparticles and silver nanoparticles. *Bioresour Bioprocessing*. 2:47.

Kim YS, Kim JS, Cho HS, Rha DS, Kim JM, Park JD, Choi BS, Lim R, Chang HK, Chung YH, Kwon IH, Jeong J, Han BS, Yu IJ (2008) Twenty eight day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats. *Inhalation Toxicol*. 20:575–583.

Krishnaraj C, Jagan EG, Ramachandran R, Abirami SM, Mohan N, Kalaichelvan PT (2012) Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. *Process Biochem*. 47:651-658.

Kumari M, Mukherjee A, Chandrasekaran N (2009) Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Sci Total Environ*. 407:5243–5246.

Larue C, Khodja H, Herlin-Boime N, Brisset F, Flank AM, Fayard B, Chaillou S, Carrière M (2011) Investigation of titanium dioxide nanoparticles toxicity and uptake by plants. *J Phys Conf Ser*. 304:012057.

Leroueil PR, Hong S, Mecke A, Baker JR, Orr BG, Banaszak Holl MM (2007) Nanoparticle interaction with biological membranes: does nanotechnology present a Janus face? *Acc Chem Res*. 40(5):335-342.

Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E (1994) Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*. 233:346-357.

Li X, Yang Y, Gao B, Zhang M (2015) Stimulation of peanut seedling development and growth by zero-valent iron nanoparticles at low concentrations. *PLoS One*. 10(4):e0122884.

Li Y, Qin T, Ingle T, Yan J, He W, Yin JJ, Chen T (2017) Differential genotoxicity mechanisms of silver nanoparticles and silver ions. *Arch Toxicol*. 91(1):509–519.

Ma C, White JC, Dhankher OP, Xing B (2015) Metal-based nanotoxicity and detoxification pathways in higher plants. *Environ Sci Technol*. 49(12):7109–7122.

Ma X, Geiser-Lee J, Deng Y, Kolmakov A (2010) Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Sci Total Environ*. 408(16):3053–3061.

Mikac L, Ivanda M, Gotić M, Mihelj T, Horvat L (2014) Synthesis and characterization of silver colloidal nanoparticles with different coatings for SERS application. *J Nanopart Res*. 16:2748-2761.

Milošić A (2014) Utjecaj čestica nanosrebra na rast i pojavu oksidacijskog stresa u korjenčićima luka (*Allium cepa* L.). Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

- Miralles P, Church TL, Harris AT (2012) Toxicity, uptake, and translocation of engineered nanomaterials in vascular plants. *Environ Sci Technol.* 46:9224–9239.
- Mittler R, Zilinskas BA (1993) Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Anal Biochem.* 212:540-546.
- Mody VV, Siwale R, Singh A, Mody HR (2010) Introduction to metallic nanoparticles. *J Pharm and Bioallied Sci.* 2(4):282-289.
- Montes A, Bisson MA, Gardella JA Jr, Aga DS (2017) Uptake and transformations of engineered nanomaterials: Critical responses observed in terrestrial plants and the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Sci Total Environ.* 607-608:1497-1516.
- Mukherjee A, Peralta-Videa JR, Bandyopadhyay S, Rico CM, Zhao L, Gardea-Torresdey JL (2014) Physiological effects of nanoparticulate ZnO in green peas (*Pisum sativum* L.) cultivated in soil. *Metallomics.* 6(1):132–138.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant.* 15:473-479.
- Musante C, White JC (2012) Toxicity of silver and copper to *Cucurbita pepo*: differential effects of nano and bulk-size particles. *Environ Toxicol.* 27(9):510–517.
- Nair PMG, Chung IM (2017) Evaluation of stress effects of copper oxide nanoparticles in *Brassica napus* L. seedlings. *3 Biotech.* 7(5):293.
- Nair PMG, Chung IM (2014) Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere.* 112:105–113.
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22:867–880.
- Park EJ, Bae E, Yi J, Kim Y, Choi K, Lee SH, Yoon J, Lee BC, Park K (2010) Repeated-dose toxicity and inflammatory responses in mice by oral administration of silver nanoparticles. *Environ Toxicol Pharmacol.* 30(2):162-168.
- Pandey VP, Awasthi M, Singh S, Tiwari S, Dwivedi UN (2017) A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. *Biochem Anal Biochem.* 6:308.
- Pokhrel LR, Dubey B (2013) Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles. *Sci Total Environ.* 452-453:321-332.
- Rana S, Kalaichelvan PT (2013) Ecotoxicity of nanoparticles. *ISRN Toxicol.* ID 574648, 11.
- Riahi-Madvar A, Rezaee F, Jalali V (2012) Effects of alumina nanoparticles on morphological properties and antioxidant system of *Triticum aestivum*. *Iran J of Plant Physiol.* 3:595–603.

Riaz Ahmed KB, Nagy AM, Brown RP, Zhang Q, Malghan SG, Goering PL (2017) Silver nanoparticles: significance of physicochemical properties and assay interference on the interpretation of *in vitro* cytotoxicity studies. *Toxicol in Vitro*. 38:179–192.

Rizwan M, Ali S, Qayyum MF, Ok YS, Adrees M, Ibrahim M, Zia-Ur-Rehman M, Farid M, Abbas F (2017) The effect of metal and metal oxide nanoparticles on the growth and physiology of globally important food crops: a critical review. *J Hazard Mater*. 322(Pt A):2–16.

Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012a) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Bot*. ID 217037, 26.

Sharma P, Bhatt D, Zaidi MGH, Saradhi PP, Khanna PK, Arora S (2012b) Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. *Appl Biochem Biotechnol*. 167:2225–2233.

Shulaev V, Oliver DJ (2006) Metabolic and proteomic markers for oxidative stress. New tools for reactive oxygen species research. *Plant Physiol*. 141(2):367-372.

Silva, TU (2011) An evaluation of coating material dependent toxicity of silver nanoparticles. ETD Paper 1229. <http://dc.etsu.edu/etd/1229>

Sivera M, Kvitek L, Soukupova J, Panacek A, Pucek R, Vecerova R, Zboril R (2014) Silver nanoparticles modified by gelatin with extraordinary pH stability and long-term antibacterial activity. *PLoS One*. 9(8):e103675.

Song U, Jun H, Waldman B, Roh J, Kim Y, Yi J, Lee EJ (2013) Functional analyses of nanoparticle toxicity: a comparative study of the effects of TiO₂ and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Ecotoxicol Environ Saf*. 93:60-67.

Sun B, Zhang F, Zhou GJ, Chu GH, Huang FF, Wang QM, Jin LF, Lin FC, Yang J (2013) Genetic variation in alkaloid accumulation in leaves of *Nicotiana*. *J Zhejiang Univ Sci B*. 14:1100–1109.

Suriyaprabha R, Karunakaran G, Yuvakkumar R, Prabu P, Rajendran V, Kannan N (2012) Growth and physiological responses of maize (*Zea mays* L.) to porous silica nanoparticles in soil. *J Nanopart Res*. 14(12):1294-1296.

Takenaka S, Karg E, Roth C, Schulz H, Ziesenis A, Heinzmann U, Schramel P, Heyder J (2001) Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. *Environ Health Perspect*. 4:547–551.

Tang J, Xiong L, Wang S, Wang J, Liu L, Li J, Yuan F, Xi T (2009) Distribution, translocation and accumulation of silver nanoparticles in rats. *J Nanosci Nanotechnol*. 9:4924–4932.

Tripathi DK, Tripathi A, Shweta SS, Singh Y, Vishwakarma K, Yadav G, Sharma S, Singh VK, Mishra RK, Upadhyay RG, Dubey NK, Lee Y, Chauhan DK (2017a) Uptake, accumulation and toxicity of

silver nanoparticle in autotrophic plants, and heterotrophic microbes: A concentric review. *Front Microbiol.* 8:07.

Tripathi DK, Singh S, Singh S, Srivastava PK, Singh VP, Singh S, Prasad SM, Singh PK, Dubey NK, Pandey AC, Chauhan DK (2017b) Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings. *Plant Physiol Biochem.* 110:167-177.

Tumburu L, Andersen CP, Rygiewicz PT, Reichman JR (2015) Phenotypic and genomic responses to titanium dioxide and cerium oxide nanoparticles in *Arabidopsis* germinants. *Environ Toxicol Chem.* 34:70–83.

Vannini C, Domingo G, Onelli E, Prinsi B, Marsoni M, Espen L, Bracale M (2013) Morphological and proteomic responses of *Eruca sativa* exposed to silver nanoparticles or silver nitrate. *PLoS ONE.* 8:e68752.

Vinković T, Novák O, Strnad M, Goessler W, Domazet Jurašin D, Parađiković N, Vinković Vrček I (2017) Cytokinin response in pepper plants (*Capsicum annuum* L.) exposed to silver nanoparticles. *Environ Res.* 156:10–18.

Wang J, Koo Y, Alexander A, Yang Y, Westerhof S, Zhang Q, Schnoor JL, Colvin VL, Braam J, Alvarez PJJ (2013) Phytostimulation of poplars and *Arabidopsis* exposed to silver nanoparticles and Ag⁺ at sublethal concentrations. *Environ Sci Technol.* 47(10):5442–5449.

Woodbury WA, Spencer K, Stahlmann MA (1971) An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal Biochem.* 44:301-305.

Yasur J, Rani PU (2013) Environmental effects of nanosilver: impact on castor seed germination, seedling growth, and plant physiology. *Environ Sci Pollut Res.* 20(12):8636-8648.

Yin L, Colman BP, McGill BM, Wright JP, Bernhardt ES (2012) Effects of silver nanoparticle exposure on germination and early growth of eleven wetland plants. *PLoS ONE.* 7:e47674.

Zuin S, Micheletti C, Critto A, Pojana G, Johnston H, Stone V, Tran L, Marcomini A (2011) Weight of evidence approach for the relative hazard ranking of nanomaterials. *Nanotoxicol.* 5(3):445–458.

ŽIVOTOPIS

8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 9. prosinca 1989. godine u Požegi, gdje sam završila osnovnu školu i opću gimnaziju. Nakon kraće stanke od školovanja, upisala sam preddiplomski studij molekularne biologije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, kojeg sam završila 2014. godine s ukupnim prosjekom ocjena 4.12. Diplomski studij molekularne biologije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2015. godine, a sve ispite položila u 2017. godini s ukupnim prosjekom ocjena 4.76. Aktivno govorim i pišem engleski jezik, a pasivno njemački jezik. Poznajem osnove programskog jezika R. U slobodno vrijeme pomažem obitelji u uzgoju voća i povrća s naglaskom na ekološki pristup i uzgoj starih i autohtonih sorti. Moji hobiji uključuju šivanje, slikanje i planinarenje.