Učinak nanočestica srebra na pojavu oksidacijskoga stresa i ekspresiju proteina u duhanu (Nicotiana tabacum)

Zovko, Mira

Doctoral thesis / Disertacija

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:613019

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

MIRA ZOVKO

UČINAK NANOČESTICA SREBRA NA POJAVU OKSIDACIJSKOGA STRESA I EKSPRESIJU PROTEINA U DUHANU (*Nicotiana tabacum*)

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.

University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE

DEPARTMENT OF BIOLOGY

MIRA ZOVKO

EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES ON OXIDATIVE STRESS AND PROTEIN EXPRESSION IN TOBACCO (*Nicotiana tabacum*)

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018

„Ovaj je doktorski rad izrađen u Laboratoriju za biljnu proteomiku Zavoda za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u okviru projekta Fitotoksičnost nanosrebra: mehanizmi akcije i interakcije u stanicama duhana (6488 *NanoPhytoTox*), financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost te u Laboratoriju Centra za proteomiku i spektrometriju masa Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Biljane Balen, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. “

ZAHVALA

Najljepše se zahvaljujem svojoj mentorici, izv. prof. dr. sc. Biljani Balen na savjetima, uputama, motivaciji i nesebičnoj pomoći tijekom izrade ovoga rada. Osobitu zahvalu upućujem dr. sc. Petri Cvjetko na optimizmu, uputama i pomoći tijekom provođenja ovog istraživanja, kao i svim djelatnicima Zavoda za molekularnu biologiju na savjetima, podršci i ugodnom druženju.

Također zahvaljujem djelatnicima Laboratorija Centra za proteomiku i spektrometriju masa Instituta Ruđer Bošković na gostoprimstvu i savjetima koje su mi pružili tijekom izrade dijela ovog istraživanja.

Zahvaljujem se i članovima povjerenstva: izv. prof. dr. sc. Mirti Tkalec, izv. prof. dr. sc. Ana-Mariji Domijan i doc. dr. sc. Dubravku Pavokoviću, koji su svojim uputama, sugestijama i komentarima upotpunili ovaj rad.

Mariji Bičanić i Marini Bošković upućujem veliko hvala na informacijama te podršci koju su mi pružale tijekom studija.

Na razumijevanju i potpori koju mi daju u svemu što radim, posebno se zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima.

Mira Zovko

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Doktorski rad

Učinak nanočestica srebra na pojavu oksidacijskoga stresa i ekspresiju proteina u duhanu (*Nicotiana tabacum*)

MIRA ZOVKO
Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno matematički fakultet
Biološki odsjek

Klijanci i odrasle biljke duhana (*Nicotiana tabacum* L.) izloženi su tretmanima s nanočesticama srebra (AgNP) i ionskim srebrom ($AgNO_3$) u koncentracijama od 25, 50, 75, 100 i 500 μM. Nakon tretmana s AgNP u klijancima je unatoč nižem sadržaju srebra utvrđen oksidacijski stres te promjene u aktivnosti i ekspresiji antioksidacijskih enzima, dok u odraslim biljkama nije bilo većih promjena. Tretmani s $AgNO_3$ izazvali su pojavu oksidacijskog stresa i u klijancima i u korijenu odraslih biljaka, što pokazuje da je ionski oblik srebra toksičniji za duhan od nanočestica. U listovima biljaka tretiranih s AgNP i $AgNO_3$ izostanak izraženijih toksičnih učinaka te niski sadržaj srebra upućuju na zaključak da se akumulacijom srebra u korijenu i sprečavanjem njegovog prijenosa u izdanak štiti fotosintetsko tkivo lista. Oba tipa tretmana dovela su do promjene u ekspresiji većeg broja proteina u klijancima nego u odraslim biljkama. Proteini su u najvećoj mjeri pripadali kategorijama Energija, Metabolizam te Odgovor na biotički i abiotički stres. Većina diferencijalno eksprimiranih proteina klijanaca imala je pojačanu ekspresiju, dok je ekspresija proteina korijena i lista uglavnom bila smanjena. Dobiveni rezultati impliciraju aktivaciju različitih mehanizama obrane u odgovoru duhana na izlaganje srebru, što ovisi o starosti tkiva, stupnju razvitka te duljini izlaganja srebru.

(297 stranica, 80 slika, 12 tablica, 356 literaturnih navoda, jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: nanočestice srebra, ionsko srebro, *Nicotiana tabacum*, oksidacijski stres, antioksidacijski enzimi, imunodetekcija, proteom

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Biljana Balen
Ocjenjivači: Izv. prof. dr. sc. Mirta Tkalec
Izv. prof. dr. sc. Ana-Marija Domijan
Doc. dr. sc. Dubravko Pavoković

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Doctoral thesis

Effect of silver nanoparticles on oxidative stress and protein expression in tobacco (*Nicotiana tabacum*)

MIRA ZOVKO
University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Seedlings and adult tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plants were exposed to 25, 50, 75, 100 and 500 μM silver nanoparticles (AgNP) and ionic silver ($AgNO_3$). After treatment with AgNP, oxidative stress and changes in antioxidant enzymes activity and expression were found in seedlings despite the lower Ag content, while in adult plants no major changes were observed. Treatments with $AgNO_3$ induced prominent oxidative stress in seedlings and root of adult plants, indicating that silver in ionic form is more toxic for tobacco than nanoparticles. Treatments with AgNP and $AgNO_3$ resulted with absence of toxic effects in leaf, which together with a low Ag content suggests that Ag accumulation in root and the prevention of its transfer to shoots protects the leaf photosynthetic tissue. Both types of treatment have induced changes in expression of a greater number of proteins in seedlings than in adult plants. Majority of identified proteins belonged to the Energy, Metabolism and Response to biotic and abiotic stress categories. Most of the differentially expressed proteins of seedlings were up-regulated, while the expression of root and leaf proteins was mainly reduced. The results imply activation of various defence mechanisms in tobacco in response to Ag, which depend on the age of tissue, stage of its development and the length of Ag exposure.

(297 pages, 80 figures, 12 tables, 356 references, original in croatian)

Keywords: silver nanoparticles, ionic silver, *Nicotiana tabacum*, oxidative stress, antioxidant enzymes, immunodetection, proteome

Supervisor: Assoc. Prof. dr. sc. Biljana Balen
Reviewers: Assoc. Prof. dr. sc. Mirta Tkalec
Assoc. Prof. dr. sc. Ana-Marija Domijan
Asst. Prof. dr. sc. Dubravko Pavoković

SADRŽAJ

1. UVOD 1
2. LITERATURNI PREGLED 5
2.1. Duhan (*Nicotiana tabacum*) – modelni organizam za istraživanje učinaka abiotičkog stresa 5
2.2. Nanomaterijali - svojstva, primjena i spoznaje o učincima na zdravlje i okoliš 6
2.2.1. Nanočestice srebra 9
2.3. Utjecaj stresnih čimbenika na biljke 13
2.4. Oksidacijski stres 16
2.4.1. Reaktivni kisikovi spojevi 17
2.4.2. Pokazatelji oksidacijskog stresa 20
2.4.2.1. Lipidna peroksidacija 20
2.4.2.2. Oksidacija proteina 23
2.4.2.3. Oštećenja molekule DNA 25
2.5. Antioksidacijski sustav 25
2.5.1. Superoksid dismutaza 26
2.5.2. Peroksidaze 27
2.5.3. Katalaza 30
2.6. Istraživanje proteoma biljaka izloženih stresu 31
2.6.1. Metode za analizu proteoma 32
2.6.1.1. Gel elektroforeza 34
2.6.1.2. Imunodetekcija 36
2.6.1.3. Spektrometrija masa 37
2.7. Dosadašnje spoznaje o učincima nanočestica srebra na biljke 39
3. MATERIJALI I METODE 42
3.1. Materijal 42
3.1.1. Biljni materijal 42
3.2. Metode 42
3.2.1. Kultura biljnog tkiva 42
3.2.2. Tretiranje biljnog materijala 44

3.2.3. Određivanje koncentracije srebra u biljnom tkivu 44
3.2.3.1. Priprema uzoraka biljnog tkiva 44
3.2.3.2. Određivanje koncentracije srebra 45
3.2.4. Ekstrakcija topivih proteina iz biljnog tkiva i određivanje njihove koncentracije 46
3.2.5. Mjerenje parametara oksidacijskog stresa 47
3.2.5.1. Određivanje razine reaktivnih kisikovih spojeva – dehidroetidij test 47
3.2.5.2. Određivanje razine lipidne peroksidacije – sadržaj malondialdehida 47
3.2.5.3. Određivanje sadržaja proteinskih karbonila 48
3.2.5.4. Određivanje oštećenja molekule DNA - Comet test 49
3.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima 50
3.2.6.1. Superoksid dismutaza 50
3.2.6.2. Pirogalol peroksidaza 51
3.2.6.3. Askorbat peroksidaza 52
3.2.6.4. Katalaza 53
3.2.6.5. Statistička obrada podataka 54
3.2.7. Određivanje sastava izoformi antioksidacijskih enzima 54
3.2.7.1. Razdvajanje proteina nativnom poliakriamid gel elektroforezom (PAGE) 54
3.2.7.2. Dokazivanje izoformi superoksid dismutaze 55
3.2.7.3. Dokazivanje izoformi pirogalol peroksidaze 56
3.2.7.4. Dokazivanje izoformi askorbat peroksidaze 56
3.2.7.5. Dokazivanje izoformi katalaze 56
3.2.7.6. Obrada rezultata 56
3.2.8. Analiza ekspresije ukupnih topivih proteina 57
3.2.8.1. Razdvajanje ukupnih proteina natrijev dodecil sulfat – poliakrilamid gel elektroforezom (SDS-PAGE) 57
3.2.8.2. Bojanje gelova bojom *Coomassie Brilliant Blue* i srebrovim nitratom 58
3.2.9. Određivanje ekspresije antioksidacijskih enzima imunodetekcijom proteina na membrani 59
3.2.10. Analiza proteina dvodimenzionalnom elektroforezom 61
3.2.10.1. Fenolna ekstrakcija ukupnih topivih proteina 61
3.2.10.2. Određivanje koncentracije proteina u ekstraktima za 2-DE 63
3.2.10.3. Rehidracija imobilina 64

3.2.10.4. Izoelektrično fokusiranje – prva dimenzija 64
3.2.10.5. Ekvilibracija imobilina 65
3.2.10.6. SDS-PAG elektroforeza – druga dimenzija 65
3.2.10.7. Vizualizacija razdvojenih proteina bojom *Coomassie Brilliant Blue* 66
3.2.10.8. Snimanje i analiza gelova 66
3.2.11. Analiza proteina spektrometrijom masa 67
3.2.11.1. Priprema uzoraka za digestiju u gelu 67
3.2.11.2. Digestija proteina u gelu 67
3.2.11.3. Ekstrakcija peptida iz gela 68
3.2.11.4. Pročišćavanje peptida 68
3.2.11.5. Analiza peptida spektrometrom masa 69
3.2.11.6. Obrada podataka – identifikacija proteina 70
4. REZULTATI 72
4.1. Koncentracija srebra u biljnom tkivu 72
4.1.1. Klijanci 72
4.1.2. Odrasle biljke 73
4.2. Parametri oksidacijskog stresa 74
4.2.1 Razina reaktivnih kisikovih spojeva 74
4.2.1.1 Klijanci 74
4.2.1.2 Odrasle biljke 75
4.2.2. Razina lipidne peroksidacije – sadržaj malondialdehida 77
4.2.2.1. Klijanci 77
4.2.2.2. Odrasle biljke 78
4.2.3. Sadržaj proteinskih karbonila 80
4.2.3.1. Klijanci 80
4.2.3.2. Odrasle biljke 81
4.2.4. Oštećenje molekule DNA 83
4.2.4.1. Klijanci 83
4.2.4.2. Odrasle biljke 85
4.3. Aktivnost antioksidacijskog sustava 87
4.3.1. Aktivnost superoksid dismutaze 87
4.3.1.1. Klijanci 87

4.3.1.2. Odrasle biljke 89
4.3.2. Aktivnost pirogalol peroksidaze 92
4.3.2.1. Klijanci 92
4.3.2.2. Odrasle biljke 95
4.3.3. Aktivnost askorbat peroksidaze 100
4.3.3.1. Klijanci 100
4.3.3.2. Odrasle biljke 102
4.3.4. Aktivnost katalaze 106
4.3.4.1. Klijanci 106
4.3.4.2. Odrasle biljke 108
4.4. Imunodetekcija antioksidacijskih enzima 112
4.4.1. Imunodetekcija superoksid dismutaze 112
4.4.1.1. Klijanci 112
4.4.1.2. Odrasle biljke 113
4.4.2. Imuniodetekcija peroksidaze iz hrena 114
4.4.2.1. Klijanci 114
4.4.2.2. Odrasle biljke 115
4.4.3. Imunodetekcija askorbat peroksidaze 116
4.4.3.1. Klijanci 116
4.4.3.2. Odrasle biljke 117
4.4.4. Imunodetekcija katalaze 118
4.4.4.1. Klijanci 118
4.4.4.2. Odrasle biljke 119
4.5. Koncentracija ukupnih topivih proteina 120
4.5.1. Klijanci 120
4.5.2. Odrasle biljke 122
4.6. Ekspresija ukupnih topivih proteina 125
4.6.1. Klijanci 125
4.6.2. Odrasle biljke 126
4.7. Identifikacija i kategorizacija proteina 132
4.7.1. Klijanci 132

4.7.2. Korijen 141
4.7.3. List 149
5. RASPRAVA 157
5.1. Učinci u klijancima duhana 158
5.1.1. Unos čestica AgNP i akumulacija Ag 158
5.1.2. Oksidacijski stres i aktivnost antioksidacijskih enzima 160
5.1.3. Ekspresija staničnih proteina 166
5.2. Učinci na odraslim biljkama duhana 177
5.2.1. Unos čestica AgNP i akumulacija Ag 177
5.2.2. Oksidacijski stres i aktivnost antioksidacijskih enzima 178
5.2.3. Ekspresija staničnih proteina 185
5.2.4.1. Promjene u proteomskoj slici korijena duhana 185
5.2.3.2. Promjene u proteomskoj slici lista duhana 191
5.3. Određivanje utjecaja citratnog omotača na duhan 195
5.4. Usporedba rezultata dobivenih na klijancima i odraslim biljkama 196
6. ZAKLJUČAK 199
7. POPIS LITERATURE 201
8. PRILOZI 238
9. ŽIVOTOPIS 295

POPIS KRATICA I SIMBOLA

AA	akrilamid
$AgNO_3$	srebrov nitrat
AgNP	nanočestice srebra
APS	amonijev peroksodisulfat
APX	askorbat peroksidaza
Bis	N,N'-metilen-bis-akrilamid
BFB	bromfenol plavo
bPEI	razgranati polietilenimin
BSA	albumin goveđeg seruma
CAT	katalaza
CBB	boja *Coomassie Brilliant Blue (CBB)*
CHAPS	3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonijev]-2-hidroksi-1-propansulfonat
CHCA	α-cijano-4-hidroksi-cimetna kiselina
2D-PAGE	dvodimenzionalna poliakrilamid gel elektroforeza
DHE	dihidroetidij
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
deH_2O	destilirana voda
DTT	ditiotreitol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
ESI	ionizacija elektroraspršenjem
EtOH	etanol
HRP	peroksidaza iz hrena
IEF	izoelektrično fokusiranje
MALDI	matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem
MDA	malondialdehid
MS	spektometrija masa
MS/MS	tandemska spektometrija masa
NBT	*nitroblue tetrazolium* (NBT)
PAGE	poliakrilamid gel elektroforeza

PBS	puferirana otopina fosfatnih soli
PEG	polietilen glikol
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
PPX	pirogalol peroksidaza
PVP	polivinilpirolidon
reH_2O	redestilirana voda
ROS	reaktivni kisikovi spojevi
rpm	okretaji u minuti
RP-S	kolona za tekućinsku kromatografiju obrnutih faza
SDS	natrijev dodecil sulfat
SOD	superoksid dismutaza
TBA	tiobarbituratna kiselina
TBS	Tris pufer
TCA	trikloroctena kiselina
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
TFA	trifluoroctena kiselina
TOF	vrijeme leta
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
UV/VIS	ultraljubičasto zračenje /vidljiva svjetlost

1. UVOD

Nanomaterijali su jednokomponentni ili višekomponentni materijali, kojima je barem jedna dimenzija komponente u rasponu tzv. nanopodručja - između 0,1 i 100 nm, a međusobno se razlikuju po broju dimenzija na nanoskali (Ivanković 2011). Toj skupini materijala pripadaju nanostrukturirane površine, nanocjevčice i nanočestice. Nanostrukturirane površine su jednodimenzijske (samo je debljina površine objekta između 0,1 i 100 nm), nanocjevčice su dvodimenzijske (promjer cjevčice je između 0,1 i 100 nm, a njihova duljina može biti mnogo veća), a nanočestice (eng. *nanoparticles*, NP) su čestice koje na nanoskali imaju sve tri prostorne dimenzije (svaka je između 0,1 i 100 nm) (Ivanković 2011). Nanomaterijali su, u odnosu na istovrsne materijale makrometarskih dimenzija i mikrometarskih oblika, poboljšanih fizikalno-kemijskih, optičko-elektroničkih i bioloških svojstava (Arora i sur. 2009), što je ujedno i razlog njihovoj sve većoj primjeni u različitim vrstama proizvoda. Naime, smanjenjem veličine nanočestica raste omjer između broja atoma na površini i onih u masi (volumenu), pa time raste i njihova reaktivnost (Ivanković 2011). Također, mogu pokazivati jedinstvenu bioraspodjelu, koja je određena veličinom (npr. deponiranje u plućima) ili međudjelovanje s proteinima, pa njihova svojstva, kao što su: veličina, oblik, aglomeracijsko stanje, topljivost te veličina površine i površinski naboj, treba uzeti u obzir pri procjeni opasnosti za zdravlje ljudi i kvalitetu okoliša. Činjenica je da se o sudbini i interakcijama nanočestica s okolišem još uvijek nedovoljno zna. To je, između ostaloga, razlog zbog kojega zasad, prilikom dizajniranja proizvoda načinjenih od nanomaterijala, ne postoje jasna pravila integracije zdravstvenog te okolišno - sigurnosnog aspekta, što izaziva zabrinutost, ali i potiče provođenje dodatnih istraživanja učinaka na žive organizme (EEA 2013).

Među različitim vrstama nanočestica dominira proizvodnja nanočestica srebra (AgNP), upravo radi njegovih protubakterijskih i protugljivičnih učinaka na žive organizme. Stoga ova vrsta nanočestica nalazi primjenu u brojnim predmetima široke potrošnje u domaćinstvu, farmaceutskoj industriji i medicini, poljoprivredi, ali i u energetici i optici, proizvodnji aditiva, vlakana, boja i lakova, tekstila, kozmetike te u proizvodnji ambalaže za pakiranje brojnih proizvoda (Hodge i sur. 2010, Savolainen i sur. 2010). Kako je primjena AgNP u svakodnevnom životu vrlo raširena i u porastu, ove čestice odlaganjem otpada i ispiranjem s površine proizvoda dospijevaju u sve sastavnice okoliša (tlo, vodu, zrak), što potencijalno može prouzročiti štetne učinke na organizme različitih ekosustava, ali imati i negativan utjecaj na zdravlje ljudi (Beer i sur. 2012). Dosadašnja istraživanja pokazuju da AgNP izazivaju toksičnost u prokariotskim (Suresh i sur. 2010) i eukariotskim stanicama (Ahamed i sur. 2010)

te u vodenim sustavima (Fabrega i sur. 2009) i sustavima *in vitro* (Foldbjerg i sur. 2011). Toksičnost AgNP pripisana je nekim mogućim mehanizmima, koji uključuju narušavanje cjelovitosti stanične membrane (Suresh i sur. 2010), vezanje i oštećivanje proteina i molekula DNA (Arora i sur. 2009), stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (eng. *reactive oxygen species*, ROS) (Hsin i sur. 2008) te apoptotičku staničnu smrt (Gopinath i sur. 2010). Nadalje, istraživanja dokazuju kako se u većim dozama i pri učestalom izlaganju organizma, AgNP nakupljaju u jetri, plućima, mozgu, bubrezima i testisima (Kim i sur. 2008), a uporaba preparata koji sadrže AgNP može prouzročiti alergijske i pigmentacijske primjene na koži (Fisher i sur. 2003). AgNP su sklone agregaciji, ali i oksidaciji elementarnog (Ag^0) u ionski oblik (Ag^+), što rezultira otpuštanjem Ag^+ (Lowry i sur. 2012). Istraživanja mehanizama toksičnosti AgNP pokazuju da još uvijek nije razjašnjeno do kojeg stupnja toksičnost AgNP potječe od samih nanočestica, a koliko je povezana s oslobođenim ionima srebra (Ag^+) (Navarro i sur. 2008, Anjum i sur. 2013). Kako bi se povećala stabilnost AgNP, tijekom njihove sinteze često se koriste različiti površinski omotači, koji, međutim, također mogu utjecati na fizikalno-kemijska svojstva nanočestica: veličinu i oblik, naboj površine te potencijal za vezanje i agregaciju, određujući time i citotoksičnost AgNP, kao i na njihovu interakciju s biološkim molekulama (Suresh i sur. 2010, Zhao i sur. 2012, Navarro i sur. 2015, Cvjetko i sur. 2017).

Biljke su sesilni organizmi koji nisu u mogućnosti izbjeći čimbenike stresa. Stoga su razvile niz mehanizama adaptacije, kako uslijed nepovoljnih okolišnih uvjeta ne bi bile značajnije oštećene (Clemens 2006). Reakcija biljke na stres ovisi o karakteristikama stresnih čimbenika - trajanju, jačini i učestalosti izlaganja stresu, kao i o karakteristikama samih biljaka - vrsti biljke i tkiva, njenom razvojnom stadiju i genotipu (Gaspar i sur. 2002). Poznato je da se, kao posljedica abiotičkog stresa, vrlo često javlja sekundarni, oksidacijski stres, koji ima snažan utjecaj na rast i razvoj biljaka (Schützendübel i Polle 2002). Primjerice, na staničnoj se razini toksičnost metala zasniva na direktnim interakcijama s funkcionalnim skupinama biološki važnih molekula, osobito proteina, lipida i DNA ili indirektno induciranjem oksidacijskog stresa, koji se kao sekundarna reakcija javlja u biljnoj stanici uvijek kada stvaranje ROS, koji su inače važni u mnogim biokemijskim procesima, premašuje mogućnosti mehanizama za njihovo uklanjanje (Lushchak 2011).

Toksikološke studije o učincima AgNP provedene na višim biljkama, organizmima koji imaju važnu ulogu u akumulaciji i biodistribuciji mnogih tvari otpuštenih u okoliš, malobrojne su. Uzme li se u obzir da su biljke izložene AgNP neizravno - putem proizvoda koje ljudi korištenjem oslobađaju u okoliš, i izravno - primjenom komercijalno dostupnih proizvoda korištenih u poljoprivredi, ovakva su istraživanja svakako potrebna.

Dosadašnja istraživanja učinaka AgNP na biljke pokazuju da toksičnost AgNP ovisi o starosti biljke i vrsti tkiva, veličini i koncentraciji čestica, površinskim omotačima te eksperimentalnim uvjetima, kao što su duljina i način izlaganja (Sharma i sur. 2012a). Fitotoksičnost AgNP očituje se u smanjenju duljine korijena i mase biljke (Sharma i sur. 2012a, Vannini i sur. 2014) te u promjenama uočenima kod isklijavanja sjemenki i rasta klijanaca (Vannini i sur. 2014). Poznato je da AgNP izazivaju i morfološke promjene na korijenu, listu te na stabljici biljke (Tripathi i sur. 2017a). Citotoksičnost AgNP pripisana je mehanizmima kao što su stvaranje ROS (Nair i Chung 2014a, Barbasz i sur. 2016), povećanje lipidne peroksidacije i oštećenja stanične membrane (Barbasz i sur 2016.), povećanje oksidacijskog oštećenja proteina (Cvjetko i sur. 2017) te vezanje i oštećivanje molekule DNA (Ghosh i sur. 2010). Osim toga, dokazane su i promjene u aktivnosti antioksidacijskih enzima (Zhang i sur. 2005, Barbasz i sur. 2016) te u proteomskoj slici biljke (Pozveh i sur. 2014, Syu i sur. 2014, Vannini i sur. 2014). Budući da odgovor biljke na stres uključuje veliki broj fizioloških, biokemijskih i molekularnih promjena, u kojima proteini igraju važnu ulogu (Wang i sur. 2011), mogu se očekivati promjene i u ekspresiji gena biljne stanice, što izravno utječe na stanični metabolizam i u konačnici izaziva promjene u rastu i prinosima (Balen 2016).

U ovom sam radu pokušala razjasniti mehanizme djelovanja toksičnosti AgNP na duhan (*Nicotiana tabacum* L. sorta Burley), biljku koju sam zbog široke rasprostranjenosti, lake dostupnosti, kratkog generacijskog vremena i razmjerne tolerancije na stres (Gregor i sur. 2010) izabrala kao objekt istraživanja. Budući da se procjena oksidacijskog oštećenja lipida, proteina i molekule DNA, kao i promjene u aktivnosti antioksidacijskih enzima, često koriste kao parametri u istraživanjima toksičnosti koja je izazvana metalima (Balen i sur. 2012, Tkalec i sur. 2014), i ja sam analizirala navedene parametre i povezala ih s rezultatima mjerenja akumulacije srebra u biljnom tkivu, kako bih dobila odgovor na pitanje sudjeluje li oksidacijski stres u mehanizmu fitotoksičnosti koji je izazvan česticama AgNP. Također sam provela i direktno određivanje ROS primjenom fluorescentne boje dihidroetidiuma (DHE).

S obzirom da podaci iz literature navode da toksičnost AgNP ovisi o starosti biljke (Sharma i sur. 2012a), u svom sam istraživanju ispitala utjecaj AgNP na klijance i odrasle biljke duhana. Učinke nanočestica AgNP usporedila sam i sa učincima ionskog srebra ($AgNO_3$), kako bih pokušala utvrditi je li toksičnost AgNP rezultat otpuštanja iona Ag^+ ili djelovanja samih nanočestica. Navedene parametre oksidacijskog stresa i aktivnosti antioksidacijskih enzima ispitala sam i nakon tretmana sa samim citratom, koji je korišten kao omotač za stabilizaciju nanočestica, kako bih provjerila utječe li primijenjeni površinski omotač na fitotoksičnost AgNP.

Djelovanje stresnih čimbenika na organizam može rezultirati i vrlo specifičnim promjenama u proteomu, tj. različitim odgovorom u ekspresiji određenih proteina (Hossain i Komatsu 2013), a koje se mogu vrlo učinkovito analizirati sofisticiranim proteomskim tehnikama. Prema trenutnim spoznajama, proteomska analiza primijenjena je samo u nekoliko istraživanja učinaka AgNP na biljke (Vannini i sur. 2013, Vannini i sur. 2014, Pozveh i sur. 2014). S obzirom da je duhan biljka čiji je genom sekvenciran (Sierro i sur. 2014), u svom radu mogla sam ispitati i utjecaj srebra na ekspresiju ukupnih staničnih proteina, kako bih otkrila koji geni pokazuju promijenjenu ekspresiju i koje su biološke uloge njihovih produkata te postoje li razlike u identificiranim proteinima s obzirom na primijenjeni oblik srebra (AgNP ili $AgNO_3$) i starost biljnog tkiva (klijanci i odrasle biljke).

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Duhan (*Nicotiana tabacum*) – modelni organizam za istraživanje učinaka abiotičkog stresa

Duhan, *Nicotiana tabacum* L. sorta Burley, je jednogodišnja, zeljasta biljka koja pripada porodici pomoćnica (Solanaceae). Naraste i preko 2 m, ima velike nerazdijeljene listove duge do 70 cm, a cvjetovi na vrhu stabljike formiraju štitasti cvat. Plod je tobolac s velikim brojem sitnih sjemenki jajolikog ili bubrežastog oblika. Cvjetovi su dvospolni, a njihova je boja u rasponu od bijele do crvene. Biljka potječe iz suptropskih krajeva Amerike. Neke samonikle vrste nalaze se na Sudanskim otocima, u Australiji i na otocima Tihog oceana. Danas se duhan uzgaja u gotovo u svim krajevima umjerenog i suptropskog pojasa, a poznato je 65 sorti. Dvije najvažnije komercijalne vrste su *Nicotiana tabacum* (pravi duhan) i *Nicotiana rustica* (seoski duhan). Za duhan je karakterističan alkaloid nikotin koji se proizvodi u korijenu, a odlaže u listovima. Stoga je duhan važna gospodarska kultura koja se uzgaja širom svijeta za preradu osušenih listova u duhanskoj industriji. Osim toga, duhan se u novije vrijeme koristi i u medicinske svrhe. Naime, lišće duhana sadrži preko 2.500 fitokemijski zanimljivih spojeva, najviše alkaloida, od kojih se neki koriste za dobivanje farmaceutskih pripravaka i lijekova (Nugroho i Verpoorte 2002).

Duhan je široko rasprostranjena i razmjerno tolerantna biljka. Zbog lake dostupnosti, kratkog generacijskog vremena i lagane transformacije često se koristi kao modelni organizam u znanstvenim istraživanjima (Gregor i sur. 2010). U istraživanju provedenom na transgeničnoj liniji duhana, koja je sadržavala gen *prx8* za sintezu peroksidaze iz ječma, utvrđena je povezanost povećane ekspresije peroksidaze s porastom tolerancije duhana na niz uzročnika abiotičkog stresa, kao što su temperatura, povećana osmolarnost i salinitet te ioni metala (Vicuna i sur. 2011). Nakon uvođenja gena *RrANR* odgovornog za ekspresiju antocijanidin reduktaze iz vrste *Rosa rugosa* u biljku duhana, uočena je povećana sposobnost akumulacije flavonoida (osobito proantocijanida) i biljnog hormona apscizinske kiseline (eng. *abscisic acid*, ABA), koja aktivira gene za sintezu različitih proteina zaduženih za osmoregulaciju, što je rezultiralo povećanom tolerancijom duhana na oksidacijski stres uzrokovan sušom (Luo i sur. 2016). Navedena istraživanja, kao i niz drugih sličnih istraživanja (Hyun i sur. 2015, Lee i sur. 2015) nude osnovu za unapređenje mehanizama tolerancije duhana na abiotički stres u svrhu očuvanja usjeva i povećanja prinosa, budući da je duhan važna poljoprivredna biljka. Kulture stanica duhana koriste se u biljnoj biotehnologiji za analizu genoma, kartografiranje gena te za

istraživanje fizioloških mehanizama (Schmidt i Delaney 2010, Lee i sur. 2015, Mostafa i sur. 2016). Duhan je i vrsta prikladna za istraživanja proteina, budući da je genom duhana sekvenciran (Sierro i sur. 2014), a kao modelni organizam koristi se i za dobivanje rekombinantnih proteina namijenjenih primjeni u medicini i farmaciji. Murashige i Skoog (1962) su tijekom svoga rada na kulturi tkiva duhana usavršili sastav hranjivih podloga za uzgoj u uvjetima *in vitro*, što je kasnije primijenjeno i u uzgoju kultura drugih biljnih vrsta (Ganapathi i sur. 2004).

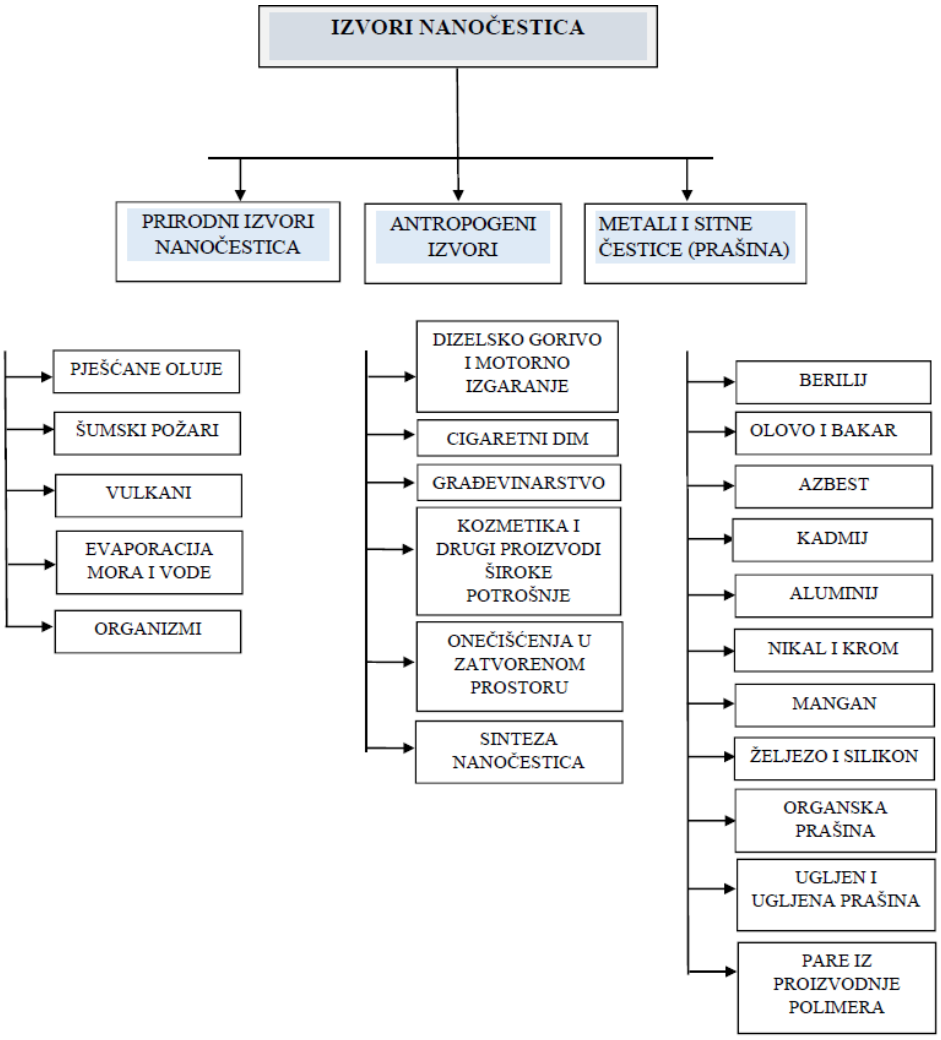
2.2. Nanomaterijali - svojstva, primjena i spoznaje o učincima na zdravlje i okoliš

Prema definiciji Europske komisije (EU 2011), nanomaterijali su prirodni ili proizvedeni materijali koji se sastoje od čestica u nevezanome stanju, u obliku agregata ili aglomerata, gdje 50% ili više čestica ima jednu ili više dimenzija u rasponu od 1 do 100 nm. Dva osnovna svojstva koja nanomaterijali trebaju zadovoljiti su da im barem jedna dimenzija mora biti u rasponu od 1 - 100 nm te da im ta nanostruktura daje svojstva drugačija u odnosu na svojstva njihovih uobičajenih makrometarskih formi. Nanomaterijale dijelimo na nanostrukturirane površine, koje su jednodimenzijske (samo je debljina površine objekta između 0,1 i 100 nm), nanocjevčice koje su dvodimenzijske (promjer cjevčice je između 0,1 i 100 nm, a njihova duljina može biti mnogo veća) i nanočestice (engl. *nanoparticles*, NP), koje na nanoskali imaju sve tri prostorne dimenzije (svaka je između 0,1 i 100 nm) (Ivanković, 2011).

U odnosu na materijale istog kemijskog sastava i uobičajenih mikrometarskih dimenzija, nanočestice imaju jedinstvena električna, kemijska i fizička svojstva. Razlog tome je veća aktivna površina po masi, čime se povećava i reaktivnost nanočestica. Zbog ovakvih svojstava, proizvodi nanotehnologije imaju značajan tržišni potencijal, no postoji čitav niz nepoznanica vezanih uz njihov učinak na okoliš i zdravlje ljudi. Nanočestice imaju široku primjenu u medicini (terapija genima, unos lijekova, mikrokirurška tehnologija, kontrastni agensi, fluorescentne oznake), poljoprivredi (nanokapsulirani herbicidi i pesticidi), energetici, elektronici i optici, tekstilnoj industriji, industriji boja i lakova te u proizvodnji katalizatora i aditiva za goriva, antimikrobnih vlakana i sprejeva, kozmetike te ambalaže za pakiranje hrane i prehrambenih proizvoda, primjerice nanokapsuliranih vitamina i minerala (Hodge i sur. 2010, Savolainen i sur. 2010).

Izvori iz kojih se nanočestice ispuštaju u okoliš prikazani su na Slici 1. Izdvajaju se: požari, vulkani, motori s unutarnjim izgaranjem (elektrane, spalionice, mlazni motori i sl.) te

općenito dizajnirani nanomaterijali koji su odloženi, ispušteni ili korišteni u okolišu (Pirela i sur. 2015), primjerice za remedijaciju tla i druge poljoprivredne svrhe (Rico i sur. 2011). Nanočestice su, uslijed ispiranja i ispuštanja takvog materijala, prisutne i u otpadnim vodama, čime ulaze u vodene i ostale ekosustave (Pirela i sur. 2015). Istraživanja novih svojstava nanočestica su brojna, no malo se zna o njihovoj interakciji sa sastavnicama okoliša i organizmima. U listopadu 2011. godine Europska komisija objavila je dokument pod nazivom „Preporuka o definiciji nanomaterijala“ (eng. *Recommendation on the definition of a nanomaterial*), koji je namijenjen prvenstveno definiranju jednoznačnih kriterija, regulatornih odredbi te dosljednom tumačenju pojmova u ovome području (Bleeker i sur. 2013). Što se tiče proizvodnje, primjene i uporabe nanomaterijala, važeća je uredba REACH (eng. *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*), koja predstavlja pravni okvir Europske Unije za kemikalije (EU 2006). S obzirom na to da su nanočestice kemijski jednake svojoj makroformi, one imaju i jednaki broj CAS (eng. *Chemical Abstract Service*), pa u industriji nisu prepoznate kao nova vrsta kemijskih tvari. Kao rezultat toga, proizvodnja i korištenje nanočestica zasada se regulira jednako kao i za konvencionalne kemijske tvari, što će se zbog promjene svojstava nanočestica trebati izmijeniti u skladu s rezultatima istraživanja (EEA 2013).



Slika 1. Pregled različitih izvora iz kojih se nanočestice ispuštaju u okoliš (prilagođeno prema Tripathi i sur. 2017a).

Činjenica da ne postoje jasna pravila za integriranje zdravstvenog, sigurnosnog i okolišnog aspekta prilikom dizajniranja proizvoda napravljenih od nanomaterijala izaziva zabrinutost, ali i potiče provođenje istraživanja (EEA 2013). Budući da nanočestice imaju različita svojstva u odnosu na istovrsne materijale mikrometarskih dimenzija, od toksikoloških se studija očekuju informacije o eventualnoj opasnosti korištenja nanočestica za ljude i okoliš te organizme, odnosno adekvatna procjena rizika. Stoga je potrebno uskladiti razvoj nanotehnologije i potrebnih istraživanja, kako bi se pravovremeno identificirala eventualna opasnost te stvoriti baza znanja o ekotoksikološkom profilu nanomaterijala (Oberdörster i sur. 2005).

Jedna od hipoteza je da su štetna svojstva nanočestica povezana s njihovim fizikalno-kemijskim značajkama: veličinom, oblikom, kristalnom strukturom i površinskim nabojem.

Naime, još su 1990. godine znanstvenici izvijestili da su čestice titanijevog dioksida (TiO_2) i aluminijevog oksida (Al_2O_3) dimenzija između 20-30 nm izazvale veću upalnu reakciju na plućima štakora, u odnosu na čestice većeg promjera (250 i 500 nm) (Oberdörster i sur. 1990).

2.2.1. Nanočestice srebra

Srebro je plemeniti metal i u prirodi je najčešće prisutan u obliku mineralnih ruda u spojevima s drugim metalima ili u obliku mineralnih soli (ionsko srebro). Pozicioniran je kao 47-mi element periodnog sustava elemenata, ima atomsku težinu 107,8 i izuzetnu električnu i toplinsku vodljivost. Odavno je poznat po svojim iznimnim protubakterijskim i protugljivičnim svojstvima, osobito za dezinfekciju vode i hrane u skladištu (Sarkar i sur. 2007). Ovisno o količini i dužini izlaganja, srebro može imati potencijalno štetan učinak na zdravlje ljudi. U organizam čovjeka može ući inhalacijom, gutanjem (Furchner i sur. 1968, Phalen i Morrow 1973) ili kontaktom preko kože (Saint i sur. 2000).

Prema podacima dostupnima u bazi *Woodrow Wilson Inventory* 38 (PEN 2011) AgNP su dominantan nanomaterijal u proizvodima široke potrošnje. Budući da je nanočesticama srebra, u odnosu na Ag makrometarskih dimenzija, značajno povećana djelotvornost, ne čudi da ubrzano raste broj proizvoda u kojima se AgNP primjenjuju. U kemijskoj industriji koriste se kao katalizatori, a primjenjuju se i u medicinskim uređajima, elektroničkim i optičkim napravama, u proizvodnji ambalaže prehrambenih proizvoda, posuđa, boja i lakova, zatim tekstila i zavoja s baktericidnim djelovanjem te u sredstvima za čišćenje i dodacima prehrani. Također se nalaze u gelovima za liječenje opeklina, gastroenteritisa i zaraznih bolesti, a poznati su i sustavi za pročišćavanje vode i zraka na bazi AgNP (PEN 2011). Laboratorijski je dokazan učinak medicinskog gela s AgNP na neke od sojeva bakterije *Staphylococcus aureus* otpornih na meticilin (eng. *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) te na enterokoke otporne na vankomicin (eng. *vancomycin-resistant enterococci*, VRE) (Seltenrich 2013).

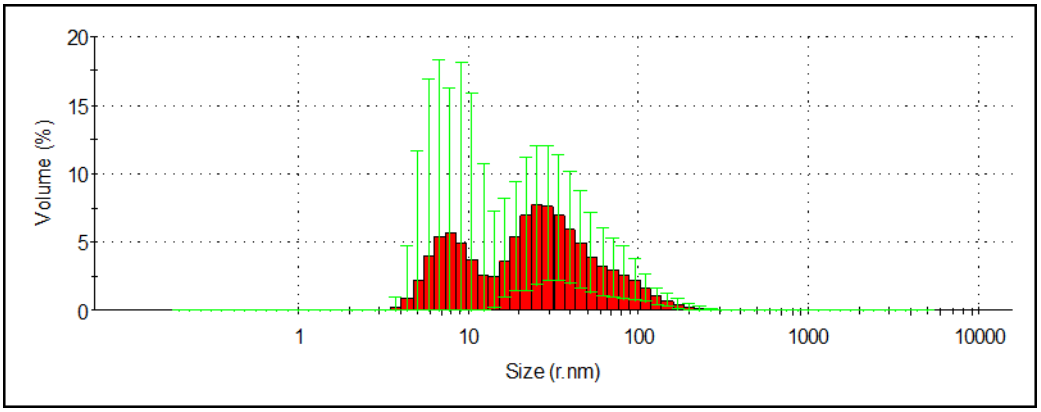
Toksičnost i prisutnost čestica AgNP u okolišu usko je povezana s njihovom topivosti (Ma i sur. 2015). Okolišni uvjeti kao što su pH, prisutnost iona, koncentracija otopljenog kisika, intenzitet svjetlosti, vrsta omotača, biokoloidi (vodene otopine proteina) i općenito prisutnost organskih tvari, značajno utječu na stabilnost AgNP u biološkim sustavima i u vodenom okolišu (Sharma i sur. 2012a). Poznato je da AgNP izazivaju toksičnost u prokariotskim (Suresh i sur. 2010) i eukariotskim stanicama (Ahamed i sur. 2010) te u vodenim sustavima (Fabrega i sur. 2009) i sustavima *in vitro* (Foldbjerg i sur. 2011). Istraživanja su pokazala kako se u većim dozama i pri učestalom izlaganju organizama AgNP, te nanočestice nakupljaju u jetri, plućima,

mozgu, bubrezima i testisima (Kim i sur. 2008). Uporaba preparata za kožu na bazi Ag može prouzročiti hipersenzibilizaciju, alergijski kontaktni dermatitis i sustavnu argiriju (ireverzibilna siva pigmentacija kože) te argirozu (pigmentacija očiju) (Fisher i sur. 2003). Toksičnost AgNP pripisana je brojim mogućim mehanizmima, koji uključuju narušavanje cjelovitosti stanične membrane (Suresh i sur. 2010), vezanje i oštećivanje proteina i molekula DNA (Arora i sur. 2009), stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (eng. *reactive oxygen species*, ROS) (Hsin i sur. 2008) te apoptotičku staničnu smrt (Gopinath i sur. 2010). Međutim, postojanje kontradiktornih rezultata pokazuje da još uvijek nije dovoljno jasno do kojeg stupnja toksičnost nanočestica srebra potječe od samih nanočestica, a koliko je povezana s oslobođenim ionima srebra (Ag^+) (Navarro i sur. 2008, Anjum i sur. 2013). Naime, nanočestice srebra sklone su agregaciji u veće čestice i, što je još važnije, oksidaciji elementarnog srebra u ionski oblik, što rezultira otpuštanjem iona Ag^+ (Lowry i sur. 2012). Treba naglasiti kako različiti čimbenici, kao što su vrijednost pH, kisik te različite vrste iona i liganada, utječu na topivost AgNP i međudjelovanje s Ag^+. Primjerice, za ione Ca^{2+} dokazano je da izazivaju agregaciju nanočestica srebra (El-Badawy i sur. 2010), dok ioni Cl^-, organske kiseline te ligandi s tiolnom skupinom, kao npr. cistein, povećavaju otpuštanje Ag^+ i stvaraju komplekse s njima (Xiu i Alvarez 2011).

Kako bi se uspostavilo svojstvo elektrostatskog odbijanja među pojedinačnim nanočesticama i tako spriječila njihova agregacija, provodi se sinteza nanočestica s organskim omotačima (Sharma i sur. 2014). Općenito, površinski omotači nanočestica dobivaju se iz tzv. zaštitnih tvari kao što su limunska kiselina, polisaharidi, površinske aktivne tvari, proteini, polimeri i prirodne organske tvari (Levard i sur. 2012). Stabilnost AgNP s organskim omotačima procjenjuje se na osnovi promjene u rezonanciji površinskih plazmona (eng. *surface plasmon resonance*, SPR) (Labille i Brant 2010). Svaki omotač ima svoja karakteristična kemijska svojstva koja utječu na fizikalno - kemijska svojstva nanočestica, odnosno na njihovu veličinu, oblik, naboj površine, potencijal za vezanje i agregaciju, što određuje njihovu potencijalnu citotoksičnost i interakciju s biološkim molekulama (Suresh i sur. 2010). Neki od omotača koji se koriste pri sintezi AgNP su citrat, polivinilpirolidon (PVP), cetiltrimetilamonijev bromid (CTAB), polietilen glikol (PEG) i razgranati polietilenimin (eng. *branched polyethylenimine*, bPEI). Čestice AgNP sintetizirane s različitim omotačima međusobno se razlikuju prema obliku, pa ih je moguće prepoznati kao sferične, izdužene, u obliku trokuta, kocke ili oktaedra, a mogu imati i oblik tube, diska ili prizme (Levard i sur. 2012). Također postoje razlike i u naboju, koje su ovisne o omotačima. Tako npr. citrat daje jaki, a PVP slabi negativni naboj; CTAB i bPEI daju jaki pozitivni naboj; dok su nanočestice stabilizirane omotačem PEG neutralne (bez naboja). S obzirom da nanočesticama srebra daju

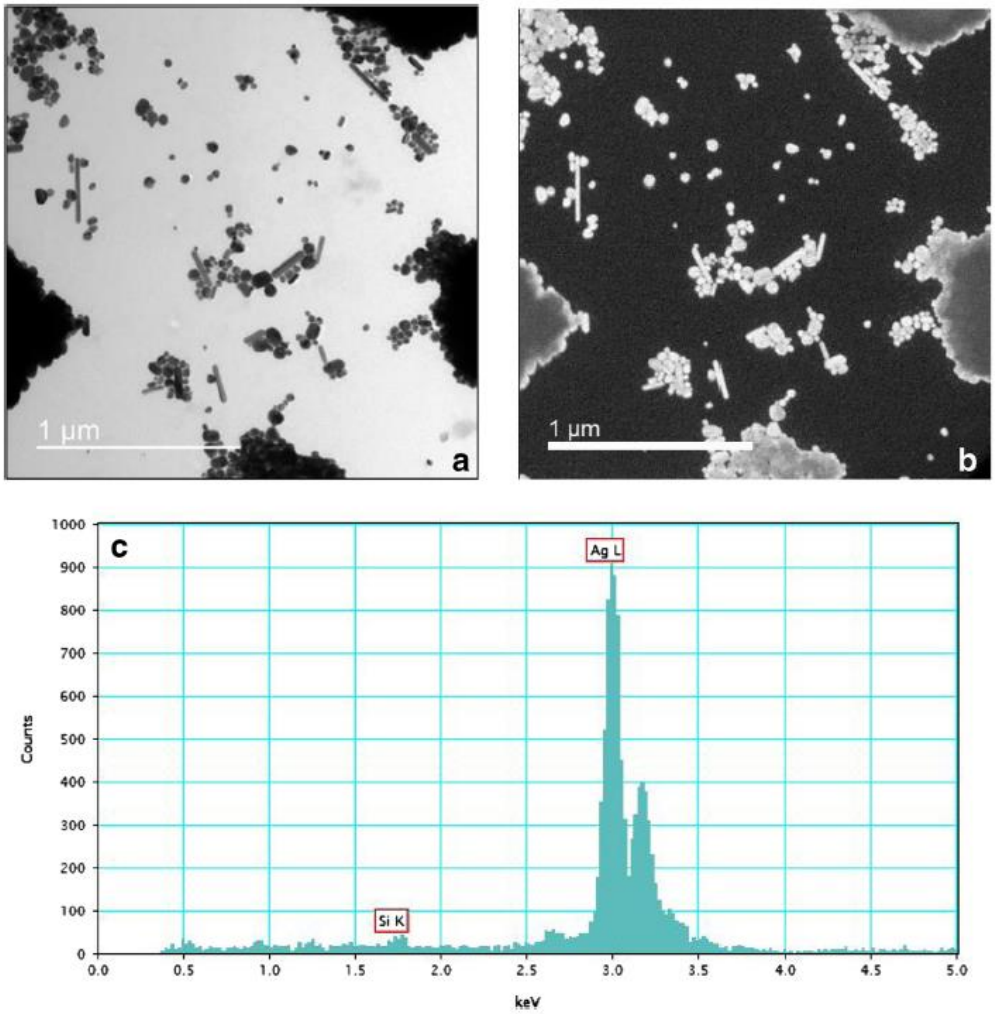
jaki naboj, omotači citrat, CTAB i bPEI osiguravaju njihovo učinkovito raspršenje, dajući im tako stabilnost (Silva i sur. 2014). CTAB se često koristi kao omotač i za neke druge vrste nanočestica, npr. nanočestoce zlata (AuNP) te nanočestice magnetita (Fe_3O_4NP) (Labille i Brant 2010, Zhang i sur. 2012). Osim što se koristi kao omotač za AgNP (Levard i sur. 2012), PVP je i česti omotač nanočestica željeznih oksida (Labille i Brant 2010). Neka istraživanja ukazuju na toksične učinke AgNP, koje su stabilizirane organskim omotačima, pa su potrebne daljnje analize akutne i kronične toksičnosti, osobito na višim organizmima. Cilj je utvrditi mehanizam njihovog djelovanja u okolišu i osigurati okolišno prihvatljivo i održivo korištenje materijala koji sadrže AgNP (Sharma i sur. 2012a). Polazne osnove za daljnja istraživanja su dosadašnji rezultati ispitivanja, koji ukazuju da površinska svojstva AgNP, vrsta omotača i kemijske karakteristike okoliša određuju stabilnost, agregatno stanje i stupanj topivosti nanočestica u uvjetima *in vitro* i *in vivo* (Sharma i sur. 2012a).

Nanočestice srebra (AgNP), koje sam koristila u ovom radu, pripravljene su redukcijskim postupkom u ultračistoj vodi iz srebrovog nitrata ($AgNO_3$) kao prekursora (Cvjetko i sur. 2017, Cvjetko i sur. 2018). Kao reducens korišten je trinatrijev citrat ($Na_3C_6H_5O_7$). Citratni ioni stabilizirali su nanočestice, te su na taj način dobivene negativno nabijene nanočestice srebra obložene citratom (AgNP-citrat). Prisutnost tih AgNP u eksperimentalnoj otopini dokazana je mjerenjem rezonancije površinskih plazmona (SPR) UV-Vis spektrofotometrom, pri čemu je utvrđen karakteristični apsorpcijski maksimum nanočestica na 415 nm. Mjerenje metodom dinamičkog raspršenja svjetla (DLS) pokazalo je bimodalnu distribuciju veličine, pri čemu je veća populacija nanočestica (~ 80%) bila veličine od 61.2 ± 33.9 nm, a manja (~ 20%) veličine od 13.8 ± 4.9 nm (Slika 2).



Slika 2. Prikaz distribucije veličina čestica AgNP stabiliziranih s citratnim omotačem, dobiven mjerenjem metodom dinamičkog raspršenja svjetla (DLS) (preuzeto iz Cvjetko i sur. 2018).

Snimke dobivene transmisijskom elektronskom mikroskopijom bile su u skladu s rezultatima mjerenja tehnikom DLS i pokazale da eksperimentalna otopina AgNP sadrži dva oblika nanočestica, sferične i štapićaste (Slika 3a. i 3b.). Analiza transmisijskim elektronskim mikroskopom s energodisperzivnim detektorom X-zraka (TEM-EDX) potvrdila je da su detektirane čestice sadržavale srebro (Slika 3c.). Mjerenja ζ potencijala pokazala su negativan naboj površine čestica AgNP koji je iznosio −39.8 ± 3.4 mV. Ova vrijednost ukazuje na jaku elektrostatičku stabilizaciju čestica AgNP ionizacijom polarnih citratnih karboksilnih skupina na površini. Određivanje disocijacije srebra sa čestica AgNP u ultračistoj vodi pokazalo je da je razina slobodnih iona Ag^+ u otopini AgNP bila niža od 0.5% (Cvjetko i sur. 2018).



Slika 3. Prikaz čestica AgNP stabiliziranih s citratnim omotačem: a) slika dobivena konvencionalnim transmisijskim elektronskim mikroskopom, b) slika svijetlog polja, c) spektar dobiven s energodisperzivnim detektorom X-zraka čestica AgNP (preuzeto iz Cvjetko i sur. 2018).

2.3. Utjecaj stresnih čimbenika na biljke

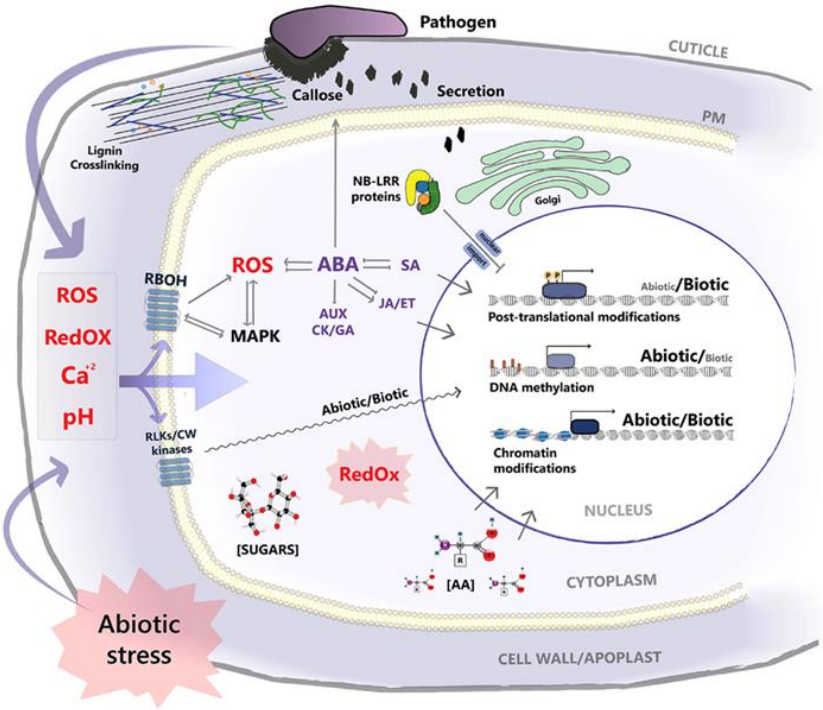
Biljke su sesilni organizmi i nisu u mogućnosti napustiti svoje prirodno stanište. Stoga su često izložene različitim stresnim čimbenicima. Stres uzrokuju nepovoljni uvjeti koji ometaju ili inhibiraju normalno funkcioniranje metaboličkih procesa (Jones i Jones 1989). Biljka pokušava normalizirati nastalu neravnotežu i prilagoditi se (tolerancija na stres), što utječe na njen rast i razvoj, a neravnoteža može uzrokovati i smanjenje produktivnosti.

Razlikuju se biotički i abiotički stres. Biotički stres u biljaka definira se kao stres nastao uslijed napada kukaca i mikroorganizama (npr. patogenih gljiva i bakterija) te kompeticije s drugim organizmima. S druge strane, abiotički stres uzrokovan je negativnim učincima neživih čimbenika na žive organizme. Abiotički stresni čimbenici koji utječu na biljke su: povišene ili snižene temperature, nedostatak ili suvišak vode u tlu, svjetlost prejakog ili preslabog intenziteteta, povećani salinitet (osmotski stres), izloženost ozonu, UV zračenju, zatim povećanje CO_2 u atmosferi, nedostatak kisika te onečišćenje zraka, tla i vode brojnim kemijskim spojevima, uključujući teške metale (Arora i sur. 2002). Nanomaterijali, primjerice AgNP, također su jedan od stresnih abiotičkih čimbenika, a njihov se učinak očituje u fizičkim, fiziološkim, biokemijskim i strukturalnim promjenama biljke (Tripathi i sur. 2017a).

Biljke pokazuju određenu otpornost na stres. Mehanizmi koji biljci pomažu da preživi stresne uvjete su „izbjegavanje“ stresa (biljka može biti u fazi dormancije) i tolerancija na stres (npr. održavanje visoke metaboličke aktivnosti). Tolerancija se manifestira u obliku adaptacije ili aklimatizacije, podrazumijeva sposobnost biljke da se prilagodi iznenadnim nepovoljnim uvjetima, a da pritom ne bude značajnije oštećena (Clemens 2006). Kao posljedica abiotičkog stresa vrlo se često javlja sekundarni, oksidacijski stres, koji ima snažan utjecaj na rast i razvitak biljnog organizma te može smanjiti produktivnost biljaka za 65 do 87%, ovisno o biljnoj vrsti (Das i sur. 2015). Kako je prethodno navedeno, reakcija biljke na stres ovisi o karakteristikama stresnih čimbenika (trajanju, jačini i učestalosti izlaganja stresu) te o njihovoj međusobnoj kombinaciji koja je normalno prisutna u prirodi. Isto tako, reakcija se razlikuje ovisno o biljnim karakteristikama (vrsta i svojstvo tkiva i organa, razvojni stadij i genotip) (Gaspar i sur. 2002). Oksidacijski stres može izazvati promjene u ekspresiji gena biljne stanice, što izravno utječe na stanični metabolizam i u konačnici izaziva promjene u rastu i prinosima (Das i sur. 2015).

Odgovor na stres je iniciran kada biljka prepoznaje stres na staničnoj razini, a prepoznavanje stresa aktivira put prijenosa signala koji provode informaciju unutar pojedinačne stanice i kroz cijelu biljku (Slika 4.). Nakon prepoznavanja i prenošenja signala slijedi indukcija gena vezanih za određeni odgovor za pojedinu vrstu stresa, a koja rezultira sintezom specifičnih

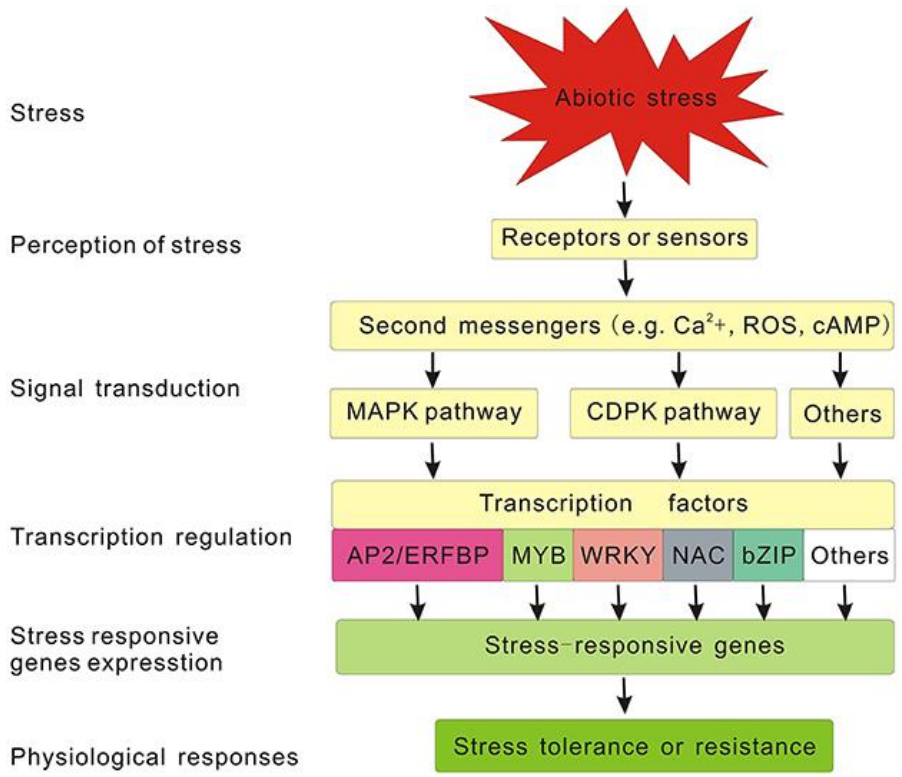
proteina i metabolita. Promjene u ekspresiji gena mogu modificirati rast i razvoj te utjecati na reproduktivnu sposobnost biljke. U slučaju da je odgovor biljke neovisan o vrsti stresnog čimbenika koji ga je uzrokovao, govorimo o nespecifičnom odgovoru na stres. Tu se ubrajaju promjene u aktivnosti antioksidacijskih enzima (superoksid dismutaza, peroksidaza, glutation reduktaza, dehidroaskorbat reduktaza, katalaza), zatim sinteza poliamina, stresnih metabolita i kompatibilnih osmotski aktivnih tvari (prolin, glicin betain, polioli), kao i sinteza i akumulacija antioksidansa (askorbinska kiselina, tokoferol, glutation), sinteza regulatora rasta induciranih stresom (ABA, jasmonska kiselina, etilen) te promjene metabolizma (pojačano disanje, inhibicija fotosinteze) i membranskog transporta te sinteza stresnih proteina. U nekim slučajevima različiti stresni čimbenici mogu prouzrokovati slične ili čak identične mehanizme obrane (Pevalek-Kozlina 2003).



Slika 4. Shematski prikaz signalnih putova koji se aktiviraju tijekom izlaganja biljne stanice biotičkom i/ili abiotičkom stresu (preuzeto iz Kissoudis i sur. 2014).

Istraživanja u području odgovora biljaka na stres podastiru dokaze o tome da biljne stanice primaju signale stresa kroz različite, još nepoznate senzore (Slika 5.). Signali se prenose različitim signalnim putovima u kojima sudjeluju mnogi sekundarni glasnici, primjerice biljni hormoni i transkripcijski regulatori.

Indukciju stresnih gena reguliraju višestruki stresni signali, a neki od njih su transkripcijski faktori (Slika 5.). Neki stresom inducirani geni kodiraju funkcionalne proteine koji su izravno uključeni u toleranciju na stres, dok ostali kodiraju regulatorne proteine, koji vjerojatno putem pozitivnih i negativnih povratnih informacija reguliraju odgovor biljke na stres. Istraživanje genoma biljke *Arabidopsis thaliana* doprinjelo je razjašnjavanju transkripcijske regulacije, posttranskripcijskih i posttranslacijskih modifikacija te epigenetičke regulacije pod utjecajem složenog abiotičkog stresa (Hirayama i Shinozaki 2010). Odgovor biljke na stres je vrlo složen, budući da uključuje mnoge gene te različite biokemijske i molekularne mehanizme, od kojih mnoge tek treba razjasniti. Geni koji sudjeluju u mehanizmima tolerancije na stres mogu se podijeliti u tri glavne skupine. Prvu skupinu čine geni uključeni u signalne kaskade i kontrolu transkripcije [MAP kinaze (eng. *mitogen-activated protein kinase*), fosfolipaze i dr.]. Drugu skupinu čine geni direktno uključeni u zaštitu biomembrana i proteina [proteini toplinskog šoka (eng. *heat shock proteins*, HSPs), šaperoni, proteini LEA (eng. *late embryogenesis abundant*, LEA), osmoprotektanti i komponente antioksidacijskog odgovora], dok trećoj skupini pripadaju geni koji reguliraju primanje i prijenos vode i iona (akvaporini i transporteri iona). Svi ovi geni sudjeluju u mehanizmima koji osiguravaju održavanje homeostaze, zaštite i popravka oštećenih proteina i membrana. Neodgovarajući korak, ili više njih, u signalizaciji ili aktivaciji gena može nepovratno oštetiti proteine i membrane te dovesti do stanične smrti (Gaspar i sur. 2002).



Slika 5. Signalni putovi uključeni u odgovor biljne stanice na abiotički stres (preuzeto iz Wang i sur. 2016).

Abiotički stres uvelike utječe na prinos usjeva, budući da stresni čimbenici aktiviraju molekularne mehanizme stanične prilagodbe, uključujući primanje signala te njihov prijenos putem kaskada, transkripcijskih mreža i adaptivnih metaboličkih putova. Posljednjih desetak godina genetičkim su inženjerstvom dobivene nove sorte tolerantnije na abiotički stres, koje se sve više primjenjuju u konvencionalnom uzgoju (Chen i sur. 2014).

2.4. Oksidacijski stres

Oksidacijski stres definira se kao pomak ravnoteže u staničnim oksidacijsko-redukcijskim reakcijama u smjeru oksidacije. Pojavljuje se kao rezultat povećanog nastajanja ROS, smanjenja antioksidacijske zaštite (nemogućnost neutraliziranja utjecaja ROS ili pak njihovog uklanjanja) ili uslijed nemogućnosti popravka oksidacijskog oštećenja. Stoga se može reći da je oksidacijski stres stanje u kojem je povećana uobičajena koncentracija ROS, uslijed čega nastaje neravnoteža između aktivnosti oksidansa i antioksidansa, što rezultira poremećajem staničnog metabolizma i njegove regulacije (Lushchak 2011).

Ravnotežu između stvaranja i uklanjanja ROS mogu poremetiti različiti stresni biotički i abiotički čimbenici koji potiču naglo povećanje unutarstanične razine ROS, a to su prethodno spomenuti čimbenici stresa (Arora i sur. 2002). Kada koncentracija ROS nadmaši obrambeni antioksidacijski kapacitet stanice, dolazi do pojave oksidacijskog stresa (Apel i Hirt 2004, Karuppanapandian i sur. 2011).

2.4.1. Reaktivni kisikovi spojevi

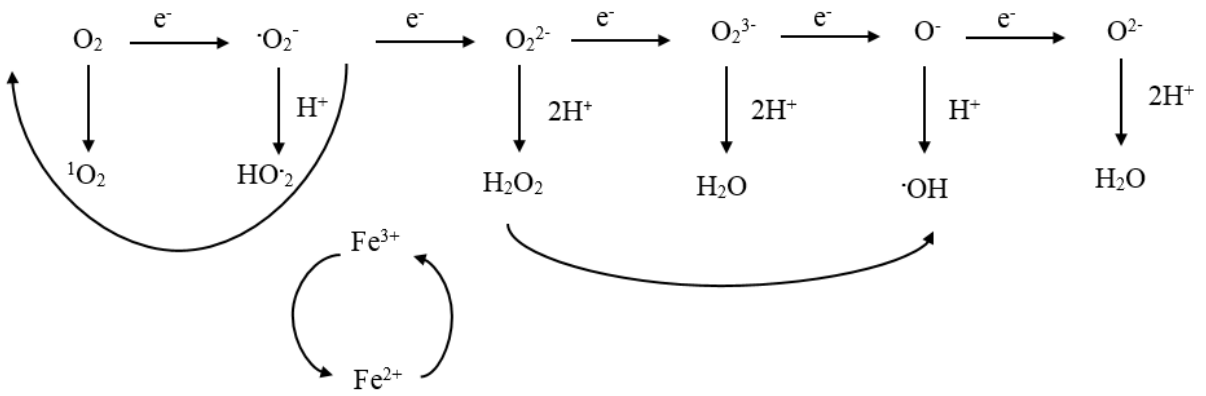
Aerobni način života praćen je nastankom ROS, koji su djelomično reducirani i elektronski ekscitirani oblici atmosferskog kisika. Primarna mjesta nastanka ROS u biljnim stanicama su kloroplasti (fotosinteza), peroksisomi (fotorespiracija) te mitohondriji (oksidacijska fosforilacija). Veći dio struktura u sastavu ROS su slobodni radikali, a najznačajniji su prikazani u Tablici 1.

Tablica 1. Reaktivni kisikovi spojevi (preuzeto iz Štefan i sur. 2007)

SLOBODNI RADIKALI	ČESTICE KOJE NISU SLOBODNI RADIKALI
Superoksidni radikal, $^{\bullet}O_2^-$	Singletni kisik, $^1O_2$ (prvo pobuđeno singletno stanje)
Hidroksilni radikal, $OH^{\bullet}$	Vodikov peroksid, H_2O_2
Peroksilni radikal, $ROO^{\bullet}$	Ozon, O_3
Alkoksilni radikal, $RO^{\bullet}$	Hipokloritna kiselina, HClO
Hidroperoksilni radikal, $HO_2^{\bullet}$	

Molekula kisika je u svom osnovnom, tripletnom stanju inertna molekula (Pevalek-Kozlina 2003). Iako bi se zbog dva nesparena elektrona mogla smatrati radikalom, molekula kisika je zbog paralelnih spinova nesparenih elektrona stabilna i nije reaktivna. Aktivni ili reaktivni kisikovi spojevi nastaju kemijskom ili fizikalnom aktivacijom molekule kisika.

Kemijska aktivacija kisika odvija se monovalentnom redukcijom kisika. U daljnjim koracima postepeno nastaju superoksidni radikal ($^{\bullet}O_2^-$), vodikov peroksid (H_2O_2), hidroksilni radikal ($OH^{\bullet}$) i voda (H_2O) (Slika 6.).



Slika 6. Metabolički putovi jednovalentne redukcije O_2 do H_2O, pri čemu nastaju različiti reaktivni kisikovi spojevi (prilagođeno prema Mittler i sur. 2004).

Pri niskoj vrijednosti pH protoniranjem $^{\bullet}O_2^-$ stvara se hidroperoksilni radikal ($HO_2^{\bullet}$), koji zajedno s $^{\bullet}O_2^-$ opet može dati H_2O_2. H_2O_2 je neradikalni štetni produkt kisika, a može ponovno krenuti u reakciju (Fentonova ili Haber-Weiss-ova reakcija), čiji je produkt hidroksilni radikal ($OH^{\bullet}$), koji je najjači poznati oksidans.

Fentonova ili Haber-Weiss-ova reakcija:

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\cdot}$$

gdje se Fe^{2+}- kompleks oksidira u Fe^{3+}- kompleks.

Svjetlost visokog intenziteta je čimbenik abiotičkog stresa. Fizikalna aktivacija kisika događa se uslijed apsorpcije energije dovoljne da promijeni smjer spina jednom od nesparenih elektrona. Uslijed takve ekscitacije klorofila fotonima svjetlosti te prijenosa energije na tripletno stanje kisika nastaje singletni kisik ($^1O_2$) (Gill i Tuteja 2010). U tom pobuđenom stanju $^1O_2$ ima dva elektrona s antiparalelnim spinovima i može reagirati s organskim molekulama. Stvaranje $^1O_2$ tijekom fotosinteze izrazito štetno djeluje na reakcijske centre klorofila (eng. *photosystem*, PS) PSI i PSII, kao i na cijeli fotosintetski aparat (Arora i sur. 2002).

Superoksidni radikal ($^{\bullet}O_2^-$) koji nastaje prijenosom elektrona na kisik, umjereno je reaktivan, no potiče daljnje reakcije u kojima nastaju izuzetno reaktivni i štetni radikali poput $^1O_2$ i $HO_2^{\bullet}$. Reakcijski centar klorofila PSI izvorno je mjesto nastanka $^{\bullet}O_2^-$.

Spontanom dismutacijom $^{\bullet}O_2^-$ nastaje vodikov peroksid (H_2O_2), a ta je reakcija značajno ubrzana u prisutnosti enzima superoksid dismutaze (SOD). Vodikov peroksid je umjereno

reaktivna molekula, no njegov suvišak u biljnim stanicama utječe na pojavu oksidacijskog stresa (Gill i Tuteja 2010). Peroksisomi, organeli koji sadrže enzime za oksidaciju masnih kiselina i aminokiselina, osobito produciraju H_2O_2, koji nastaje kao produkt enzimske reakcije SOD i različitih oksidaza (Noctor i Foyer 1998). Osim u peroksisomima i kloroplastu, H_2O_2 nastaje i u mitohondrijima biljaka u transportnom lancu i oksidacijskoj fosforilaciji (Braidot i sur. 1999). Kako je prethodno navedeno, hidroksilni radikal može nastati u željezom kataliziranoj Fentonovoj ili Haber-Weissovoj reakciji. Glavni štetni učinci H_2O_2 očituju se u poticanju lipidne peroksidacije i inaktivaciji enzima Cu/Zn SOD putem redukcije iona Cu^{2+} u ione Cu^{+} u reakcijskom središtu enzima. Osim štetnog djelovanja, H_2O_2 ima i pozitivnu ulogu. Naime, pri vrijednosti pH < 10, H_2O_2 je neutralna molekula i tako može difundirati kroz membrane. To mu svojstvo omogućuje ulogu signalne molekule (Inźe i Van Montagu 2002) i učinak na aktivaciju gena, čiji će produkti uspostaviti novi stabilni metabolizam u biljnom organizmu. Hidroksilni radikal ($OH^{\bullet}$) je najsnažniji poznati oksidans koji nastaje reakcijom H_2O_2 i $^{-}O_2^{\bullet}$ u prisutnosti manjih količina željeza pri neutralnoj vrijednosti pH prethodno prikazanom Fentonovom ili Haber-Weisovom reakcijom. Ione željeza u nekim uvjetima mogu zamijeniti ioni bakra. Dakle, toksičnost $^{-}O_2^{\bullet}$ i H_2O_2 proizlazi iz njihove mogućnosti da započnu kaskadu reakcija koja će rezultirati nastankom vrlo opasnog radikala $OH^{\bullet}$. Upravo taj radikal može inicirati peroksidaciju lipida te oštećenje molekule DNA i proteina (Arrora 2002, Gill i Tuteja 2010).

ROS nastali tijekom normalne aerobne metaboličke aktivnosti u stanici nemaju štetan utjecaj na biljne stanice zahvaljujući prisutnosti različitih obrambenih antioksidacijskih mehanizama koji uklanjaju ROS. Također, manje količine ROS neophodne su u mnogim biokemijskim procesima, uključujući i unutarstaničnu signalizaciju, pri diferencijaciji, ekspresiji gena te obrani od mikroorganizama (Schützendübel i Polle 2002, Schmidt i Schippers 2015). Naime, u stresnim uvjetima ROS imaju ulogu u aktivaciji stanične signalne kaskade. Kao signalne molekule, ROS mogu dovesti do ekspresije gena važnih za biosintezu antioksidacijskih enzima i drugih molekula potrebnih za obranu biljke od oksidacijskog stresa. Stoga je zaključak kako postoji korelacija između antioksidacijskog sustava i tolerancije biljke na stres (Perl-Trevers i Perl 2002), pa se ROS smatraju staničnim pokazateljima stresa i sekundarnim glasnicima koji su uključeni u signalni put odgovora na stres (Mittler 2004). No, ukoliko povećana razina ROS nije na vrijeme i učinkovito uklonjena, oni mogu izazvati oksidaciju proteina te posljedično inaktivaciju enzima, oksidaciju masnih kiselina u lipidima i oštećenje membrana, te oštećenje molekula DNA i RNA. To rezultira promjenama u strukturi i funkciji stanica, tkiva i organa, što u konačnici može izazvati i smrt stanice (Rada i sur. 2008).

2.4.2. Pokazatelji oksidacijskog stresa

Prisutnost ROS kao pokazatelja oksidacijskog stresa teško se mjeri, jer ROS imaju kratko vrijeme poluživota. Direktno određivanje ROS provodi se primjenom fluorescentne boje dihidroetidiuma (DHE), koja lako prolazi kroz membrane i vrlo uspješno detektira uglavnom stvaranje $^{-}O_2^{\bullet}$ (Domijan i Abramov 2011), kojeg zatim neutralizira SOD. U reakciji DHE s $^{-}O_2^{\bullet}$ nastaje crveni pigment 2-hydroksi etidij, koji se lako detektira fluorescencijskim mikroskopom (Wojtala i sur. 2014).

Prisutnost ROS može se detektirati i mjerenjem krajnjih produkata lančane reakcije, koji imaju znatno duže vrijeme poluživota (npr. lipidni peroksidi). Mjerljivi pokazatelji oksidacijskog stresa mogu biti i promjene u količini neenzimskih antioksidansa i u aktivnosti antioksidacijskih enzima. Za rano otkrivanje oksidacijskog stresa koriste se biokemijski pokazatelji kojima se određuju sadržaj ili aktivnost iz ekstrakata biljnih tkiva. Kako se metaboličke promjene uvijek javljaju i prije pojave vidljivih simptoma, određivanje biokemijskih pokazatelja vrlo je važno u procjeni štetnosti okolišnih čimbenika. Radi procjene djelovanja stresnih čimbenika, pogodne su i metode koje analiziraju izoforme antioksidacijskih enzima, jer uslijed stresnih učinaka dolazi do različite zastupljenosti pojedinih izoenzima (Aravind i Prasad 2005).

2.4.2.1. Lipidna peroksidacija

U normalnim biološkim uvjetima, molekula kisika neenzimskom oksidacijom može oduzeti elektrone biološkim molekulama, čime nastaju slobodni radikali. Višestruko nezasićene masne kiseline (eng. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA), koje su glavne strukturne jedinice membranskih lipida stanične membrane i membrane staničnih organela, česta su meta slobodnih radikala. Pri tome dolazi do lipidne peroksidacije, čiji je rezultat razgradnja višestruko nezasićenih masnih kiselina i nastanak lipidnih peroksida, koji su jedan od prvih pokazatelja oksidacijskog stresa u stanicama (Halliwell i Gutteridge 1990). Lipidna peroksidacija ne samo da dovodi do razgradnje višestruko nezasićenih masnih kiselina i narušavanja cjelovitosti bioloških membrana, već i do naknadnih oštećenja bioloških makromolekula produktima peroksidacije (Štefan i sur. 2007). Posljedice lipidne peroksidacije su smanjenje fluidnosti membrana, povećano propuštanje molekula čiji se prijenos u normalnim uvjetima odvija specifičnim kanalima, zatim oštećenje membranskih proteina te inaktivacija receptora ionskih kanala (Gill i Tuteja 2010), što dovodi do promjene u cjelokupnom fiziološkom funkcioniranju stanice (Labudda 2013).

Lipidna peroksidacija odvija se u tri faze: inicijacija, propagacija i terminacija. Inicijaciju mogu potaknuti H_2O_2 i O_2, no ona najčešće započinje odvajanjem atoma vodika iz metilenskih skupina ($-CH_2-$) nezasićenih masnih kiselina u prisutnosti $OH^{\cdot}$, pri čemu nastaje organski radikal ($R^{\cdot}$) i voda. U aerobnim uvjetima kisik će vezati lipidne radikale stvarajući tako peroksilni radikal ($ROO^{\cdot}$), koji će potaknuti lančanu reakciju peroksidacije odvajanjem atoma vodika od susjednih organskih molekula (PUFA) formirajući druge organske radikale (propagacija). Lipidni hidroperoksidi (ROOH), nastali kao rezultat ove reakcije, mogu se u prisutnosti iona Fe^{2+} pocijepati na različite reaktivne vrste poput lipidnih alkoksilnih radikala ($RO^{\cdot}$) epoksida, aldehida, primjerice malondialdehida (MDA) i alkohola. U tim reakcijama stvaranja visokoreaktivnih radikala, Fe^{2+} ima ulogu katalizatora (Fentonova ili Haber-Weiss-ova reakcija). U fazi terminacije, međusobnom reakcijom nastalih radikala nastaju stabilni produkti, koji dalje ne mogu nastaviti proces propagacije lančanih reakcija peroksidacije. Niz reakcija u nastavku prikazuje tri faze lipidne peroksidacije:

1. INICIJACIJA

$RH + OH^{\cdot} \rightarrow R^{\cdot} + H_2O$

(lipid) (lipidni alkilni radikal)

2. PROPAGACIJA

$R^{\cdot} + O_2 \rightarrow ROO^{\cdot}$

(lipidni peroksilni radikal)

$ROO^{\cdot} + RH \rightarrow ROOH + R^{\cdot}$

$ROOH \rightarrow RO^{\cdot}$

(epoksidi, hidroperoksidi, glikol, aldehidi - MDA)

3. TERMINACIJA

$R^{\cdot} + R^{\cdot} \rightarrow R + R$

(dimer masnih kiselina)

$R^{\cdot} + ROO^{\cdot} \rightarrow ROOR$

(most dimera peroksida)

$ROO^{\cdot} + ROO^{\cdot} \rightarrow ROOR + O_2$

(most dimera peroksida)

Osim što je lipidna peroksidacija vezana uz količinu H_2O_2 u stanici, izvor lipidnih radikala je i aktivnost enzima lipoksigenaze, koji katalizira hidroperoksidaciju polinezasićenih

masnih kiselina (Sofo i sur. 2004). Derivati te reakcije mogu se razgraditi do lipidnih radikala i tako započeti lanac reakcija lipidne peroksidacije.

Lanac reakcija radikala lipidne peroksidacije prekida se neenzimskim i enzimskim načinom. Antioksidans α-tokoferol sastojak je membrana topiv u lipidima, koji prekida lanac reakcija lipidne peroksidacije popravljajući radikale masnih kiselina doniranjem vodikova kationa radikalu lipida. Na taj način i sam postaje radikal, pa mu za oporavak treba vitamin C (askorbat) ili glutation. Dakle, α-tokoferol pomaže terminaciji lipidnih peroksilnih radikala, dok askorbinska kiselina regenerira tokoferol. U biljnoj stanici askorbat je kvantitativno dominantan antioksidans i njegova prisutnost je utvrđena u različitim staničnim odjeljcima, uključujući citoplazmu, jezgru, kloroplaste, mitohondrije, vakuolu te apoplast. Askorbinska kiselina je hidrofilni spoj koji djeluje u vodenom okolišu (npr. u citoplazmi ili apoplastu), dok je α-tokoferol hidrofobni spoj koji djeluje unutar fosfolipidnog dvosloja membrana. Njihovo djelovanje je sinergističko (Bloghina i sur. 2003).

Suprotno od slobodnih radikala, aldehidi su relativno stabilni, pa imaju sposobnost difuzije unutar i izvan stanice, a mogu napasti i udaljena ciljna mjesta. Promjena u sadržaju MDA stabilan je pokazatelj lipidne peroksidacije i predstavlja neinvazivni biomarker oksidacijskog stresa koji se često koristi za istraživanje radikalima posredovanih fizioloških i patoloških stanja (Meagher i Fitzgerald 2000). MDA je jedan od glavnih produkata lipidne peroksidacije koji, reagirajući s tiobarbiturnom kiselinom (eng. *thiobarbituric acid*, TBA), formira obojene produkte - tiobarbiturne reaktivne supstance (eng. *thiobarbituric acid reactive substances*, TBARS). U fiziološkim uvjetima MDA se nalazi u obliku enolatnog iona koji reagira s proteinima, pokazujući afinitet prema lizinskom aminokiselinskom ostatku. Gvanin je također ciljno mjesto napada MDA, što može izazvati mutacije (Štefan i sur. 2007). Kao zaštitu od potencijalne citotoksičnosti, stanice su razvile mehanizme uklanjanja MDA. Stvoreni peroksidi izazivaju preuredbu acilnih lanaca, usmjeravajući polarne hidroperokside prema površini membrane (Štefan i sur. 2007). Fosfolipaza A2, vezana za membranu, aktivira se peroksidacijom i cijepa peroksidirane lance. Nakon toga glutation peroksidaza (GPX) reducira oslobođene aldehide u alkohole. Popravak se završava reakcijom s acil-koenzimom A. Dobar primjer detoksifikacijskog procesa je oksidacija MDA u mitohondriju djelovanjem aldehid-dehidrogenaze (Siu i Draper 1982).

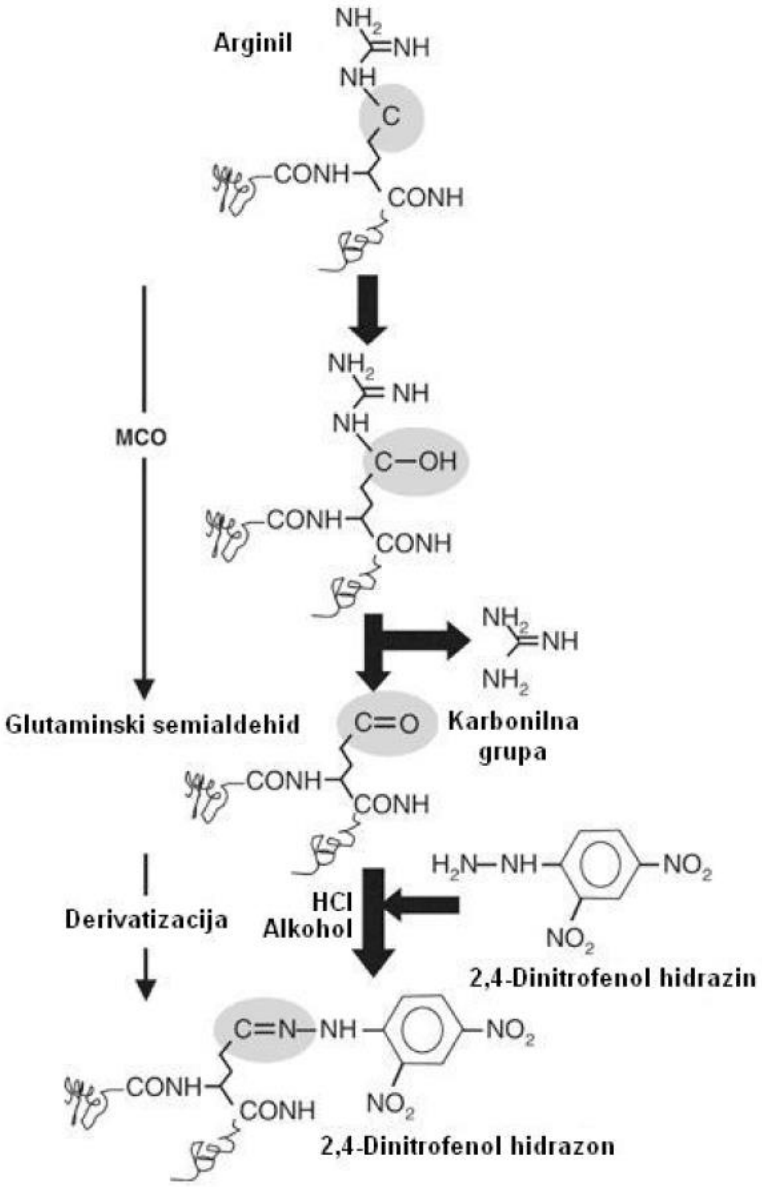
2.4.2.2. Oksidacija proteina

Oksidacija proteina je kovalentna modifikacija proteina, odnosno aminokiselina, potaknuta djelovanjem ROS. Izlaganje proteina molekulama ROS na staničnoj razini izaziva ne samo specifične modifikacije pojedinih aminokiselina, već i fragmentaciju peptidnih lanaca, agregaciju unakrsno vezanih produkata reakcije, promjene električnog naboja i njihovu povećanu osjetljivost na proteolizu (Alscher i sur. 1997). Modifikacije dovode do funkcionalnih promjena proteina, koje posljedično mijenjaju stanični metabolizam. Različiti oblici ROS djeluju različito u skladu sa svojom potencijalnom reaktivnosti, iako su oksidacijske promjene peptida izazvane uglavnom hidroksilnim radikalom ($OH^{\cdot}$), koji nastaje razgradnjom H_2O_2 u prisutnosti metalnih iona (Cu^{+} i Fe^{2+}). Na relativnu osjetljivost proteina utječu primarna, sekundarna i tercijarna struktura proteina.

Aminokiseline u peptidnom lancu razlikuju se u svojoj osjetljivosti na stres. Aminokiseline koje sadrže sumpor, cistein i metionin, izuzetno su osjetljive na oksidacijski stres. Naime, ROS mogu eliminirati vodikov atom iz cisteinskih ogranaka, formirajući tiolni radikal, koji se može povezati s drugim istovjetnim radikalom, formirajući disulfidni most. S druge strane, djelovanjem ROS na metioninske ogranke stvaraju se derivati metionin sulfoksida (Farr i Kogoma 1991). Ove su reakcije uz pomoć određenih enzima reverzibilne. Naime, većina bioloških sustava ima disulfid reduktaze i metionin sulfoksidaze koje oksidirane oblike prevode ponovo u cistein i metionin. Od ireverzibilnih oštećenja, vrlo je česta oksidacija aromatskih aminokiselina fenilalanin, tirozin i triptofan. Također, oksidacijom proteina koji sadrže treonin, lizin, prolin i arginin nastaju karbonili kao što su ketoamini, ketoaldehidi i deoksizoni (Stadtman 1986). Oksidacijska razgradnja proteina povećana je u prisutnosti metalnih kofaktora npr. željeza. Naime, derivati karbonila nastaju u direktnim reakcijama oksidacije postranih aminokiselinskih lanaca prolina, arginina, lizina i treonina koje su katalizirane metalima (eng. *metalcatalyzed oxidation*, MCO). Nadalje, karbonilni derivati lizina, cisteina i histidina mogu nastati u sekundarnim reakcijama s reaktivnim karbonilnim komponentama na ugljikohidratima (produkti glikooksidacije), lipidima i krajnjim produktima glikacije/lipoksidacije.

Fizikalno-kemijske promjene koje nastaju zbog karbonilacije aminokiselina uzrokuju gubitak identiteta aminokiselinskog bočnog lanca. Karbonilirani proteini gube svoju strukturu, što inhibira ili mijenja aktivnost proteina, odnosno enzima te povećava osjetljivost na proteolizu, a povećana razina nefunkcionalnih proteina u stanici uzrokuje poremećaj staničnih aktivnosti. Umjereno karbonilirani proteini se razgrađuju proteolizom, dok se teško karbonilirani proteini povezuju međusobno kovalentnim vezama u netopljive proteinske

agregate otporne na proteolitičku razgradnju (Romero-Puertas i sur. 2002). Proteinski karbonili koriste se kao biljezi procjene oksidacijskog oštećenja proteina jer su stabilni, a i formiranje karbonila je učestalije od ostalih oksidacijskih oštećenja proteina (Stadtman 1986). Razvijene su različite metode za detekciju i kvantifikaciju proteinskih karboniliranih grupa, a većina njih uključuje derivatizaciju karbonilnih grupa s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH), pri čemu nastaju stabilni 2,4-dinitrofenilhidrazoni (Slika 7.), koji se mogu kvantificirati (Levine 1994).



Slika 7. Karbonilacija i derivatizacija karboniliranog aminokiselinskog postranog lanca u proteinu s 2,4-dinitrofenilhidrazinom u svrhu detekcije nastalog hidrazona, kao pokazatelja razine oksidacije proteina (prilagođeno prema Nyström 2005).

2.4.2.3. Oštećenja molekule DNA

Oksidacijski stres može izazvati i različita oštećenja molekule DNA kao što su: oksidacija baza i fragmentacija nastalih produkata, nastanak jedno- i dvo- lančanih lomova, stvaranje unakrsnih veza unutar i izvan lanaca DNA te nastajanje unakrsnih veza molekule DNA sa produktima fragmentacije šećera (Balasubramanyam i sur. 2010).

Comet test ili gel elektroforeza jedne stanice (eng. *single cell gel electrophoresis assay*) jednostavna je metoda za utvrđivanje oštećenja molekule DNA, a temelji se na mjerenju lomova u lancu DNA. Jezgre stanica mehanički se izoliraju, tretiraju u smjesi otopine puferiranih soli i agaroze normalnog tališta te nanose na predmetna stakalca. Nakon provedene alkalne horizontalne elektroforeze uz vrijednost pH > 13, stakalca se boje etidijevim bromidom. Etidijev bromid se snažno veže na nukleinske kiseline tako što se umeće (interkalira) između parova baza, a pod UV svjetlom fluorescira. Analizom preparata fluorescencijskim mikroskopom uočavaju se strukture nalik kometima, a razlika u intenzitetu fluorescencije „glave“ i „repa“ kometa govori o broju lomova DNA. Što je veći broj lomova u molekuli DNA (jednostruki i/ili dvostruki), to je "rep" kometa veći i ispunjeniji sitnim dijelovima DNA. Postotak DNA u repu (% DNA), koji se mjeri računalnim programom, mjera je oštećenja DNA.

Prednosti ove tehnike su: sakupljanje podataka na razini pojedine stanice (čime se osigurava snažnija vrsta statističke analize), potreba za malim brojem stanica po uzorku (<10.000), velika osjetljivost za otkrivanje oštećenja DNA i prikladnost za analizu gotovo svake populacije eukariotskih stanica (Dhawan i sur. 2002). Comet test često se koristi u analizi genotoksičnih učinaka zračenja i kemikalija, uključujući pesticide, teške metale, nanočestice ili kompleksne kontaminirane medije (Santos i sur. 2015).

2.5. Antioksidacijski sustav

Antioksidansi su kemijske tvari koje reguliraju nastajanje slobodnih radikala, jer imaju sposobnost stabilizirati ih. Antioksidansi doniraju elektron slobodnim radikalima, pri čemu sami ne postaju slobodni radikali. Halliwell i Gutteridge (1989) definirali su antioksidanse kao tvari koje značajno usporavaju ili u potpunosti inhbiraju oksidaciju supstrata kada se u stanici nalaze u nižim koncentracijama od supstrata podložnog oksidaciji. Njihova je uloga dvojaka – inaktivacija slobodnih radikala, tj. doniranje elektrona kako bi se spriječila lančana reakcija prijenosa nesparenih elektrona i stvaranja novih radikala te prijenos slobodnih radikala u dijelove stanice gdje će njihov oksidacijski učinak biti manje štetan (Sies 1997).

Budući da ROS nastaju u različitim staničnim odjeljcima te se tako razlikuju po mogućnosti difuzije i reaktivnosti, biljnoj je stanici potreban kompleksan sustav obrane u svim staničnim dijelovima (Smirnof 2000). U okviru svog antioksidacijskog sustava, biljke posjeduju različite enzimske i neenzimske mehanizme za uklanjanje ROS, koji djeluju kada koncentracija slobodnih radikala ugrožava odvijanje normalnih fizioloških procesa (Sarvajeet i Narendra 2010).

U antioksidacijske enzime spadaju superoksid dismutaza (SOD), katalaza (CAT), askorbat peroksidaza (APX), pirogalol peroksidaza (PPX), glutation reduktaza (GR), monodehidroaskorbat reduktaza (MDHAR), dehidroaskorbat reduktaza (DHAR), glutation S – transferaza (GST) i glutation peroksidaza (GPX) (Mallick i Rai 2002). Neenzimski mehanizmi uključuju detoksikaciju ROS pomoću antioksidansa male molekulske mase kao što su: askorbinska kiselina, glutation, prolin, tokoferoli, karotenoidi i flavonoidi te drugi fenolni spojevi (Arora i sur. 2002, Gill i Tuteja 2010).

2.5.1. Superoksid dismutaza

Superoksid dismutaza (SOD) je metaloenzim koji djeluje na superoksidni radikal te predstavlja prvu liniju obrane od reaktivnih kisikovih spojeva u stanici (Arora i sur. 2002). Izoforme SOD nalaze se u citosolu, kloroplastima, peroksisomima i mitohondrijima. U viših biljaka opisana su četiri tipa izoenzima SOD, koja se razlikuju po metalnim kofaktorima. Svaki tip definiran je prema svom smještaju u stanici i prema tome koji metal koristi kao prostetičku skupinu (Mn^{2+}, Fe^{3+} ili Cu^{2+}/Zn^{2+}), pa se stoga nazivaju Mn-SOD, Fe-SOD i Cu/Zn-SOD (Alscher i sur. 1997, Ahmad i sur. 2010). Mn-SOD nalazi se u mitohondrijima i peroksisomima, Fe-SOD u kloroplastima, a Cu/Zn-SOD u kloroplastima, citosolu i peroksisomima (Alscher i sur. 2002). Svaki tip enzima nezavisno je reguliran, ovisno o stupnju stresa u pojedinom staničnom odjeljku (Takahashi i Asada 1983).

Poznato je da SOD igra važnu ulogu u obrani biljke od stresnih čimbenika, kao što su niska temperatura (Liu i sur. 2013), solni stres (Hernandez i sur 1995), suša (Huseynova i sur. 2014) te djelovanje teških metala (Tkalec i sur. 2014), ali i AgNP (Barbasz i sur. 2016).

Uklanjanjem superoksidnog radikala djelovanjem SOD smanjuje se rizik od nastanka hidroksilnog radikala putem Haber-Weiss-ove reakcije katalizirane metalom (Arrora i sur. 2002). SOD katalizira rekaciju disproporcioniranja dva superoksidna radikala na vodikov peroksid i molekularni kisik na slijedeći način:

$$2\ {}^{\bullet}O_2^- + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Reakcija je vrlo brza, a vodikov peroksid se dalje uklanja peroksidazom.

2.5.2. Peroksidaze

Peroksidaze čine grupu monomernih glikoproteina građenih od jednog polipeptidnog lanca sa vrlo širokim spektrom supstratne specifičnosti (Van Huystee i Cairns 1982). Sadrže protohematin IX kao prostetičku skupinu. Kataliziraju oksidaciju staničnih komponenti (npr. fenolnih spojeva, askorbinske kiseline, glutationa i dr.) kao supstrata (R predstavlja neki od mnogih supstrata koji mogu donirati vodik − alkoholi, askorbat, fenoli), koristeći vodikov peroksid ili organski hidroperoksid kao primatelj elektrona (Gaspar i sur. 1982).

$$RH_2 + H_2O_2 \rightarrow R + 2H_2O$$

U biljkama je prisutan veliki broj izoenzima peroksidaze smještenih u različitim staničnim odjeljcima. Imaju različite funkcije i svojstva, a molekulska masa im je u rasponu od 30 do 50 kDa (Lagrimini i Rothstein 1987, Hiraga i sur. 2001). Na temelju elektroforetske pokretljivosti koja ovisi izoelektričnoj točki, peroksidaze se često klasificiraju kao kisele i bazične (Yoshida i sur. 2003). Uključene su u procese diferencijacije stanica, biosinteze lignina, suberina i etilena, razgradnju auksina, zacjeljivanje rana te obranu od patogena (Gaspar i sur. 1982). Potvrđena je i njihova uloga u obrani pojedinih biljnih vrsta od stresa uslijed pojave viših razina teških metala (Lavid i sur. 2001). Općenito, različiti okolišni stresni čimbenici kao što su nepovoljna temperatura, solni stres, teški metali, patogeni, onečišćenje tla ili zraka uzrokuju promjenu u aktivnosti peroksidaza, pa su dobar pokazatelj stresa u biljkama (Sharma i Dubey 2005).

Prema razlikama u primarnoj strukturi, peroksidaze u biljkama i gljivama dijele se u tri klase (Welinder 1985):

klasa I - unutarstanični enzimi u biljkama, bakterijama i kvascima;

klasa II - izvanstanični enzimi u gljivama;

klasa III - tzv. biljne peroksidaze koje se transportiraju iz stanice ili u vakuolu.

U klasu I peroksidaza pripada unutarstanični enzim askorbat peroksidaza (APX). Ovaj je enzim dio glutation-askorbatnog ciklusa koji djeluje u citosolu i kloroplastima. APX ima važnu ulogu u pretvaranju ROS u slabije reaktivne oblike, što smanjuje mogućnost oksidacije staničnih komponenti i staničnih oštećenja (Karuppanapandian i sur. 2011). Glavna uloga APX je uklanjanje H_2O_2 te organskih hidroperoksida i lipidnih peroksida. APX uklanja H_2O_2 koristeći askorbat (AA) kao donor elektrona (supstrat). Da bi se reducirala jedna molekula H_2O_2 potrebne su dvije molekule askorbata, a produkt reakcije su dvije molekule vode i dvije molekule monodehidroksiaskorbinske kiseline (MDHA) (Asada 2000):

$$H_2O_2 + 2\ AA \rightarrow 2\ MDHA + 2\ H_2O$$

U usporedbi sa katalazom ili gvajakol-peroksidazom, APX ima veći afinitet prema H_2O_2 te stoga i važniju ulogu u održavanju razine ROS u stanicama tijekom oksidacijskog stresa (Gill i Tuteja 2010). Obitelj enzima APX sastoji se od najmanje pet izoformi koje imaju visoku specifičnost za askorbat kao donor elektrona. Izoforme APX podijeljene su u skupine ovisno o mjestu u stanici u kojemu se nalaze. Topive izoforme nalaze se u citosolu (cAPX), mitohondriju (mitAPX) i stromi kloroplasta (sAPX), dok su netopive izoforme vezane za membrane peroksisoma i glioksisoma (mAPX) te u tilakoidima kloroplasta (tAPX) (Caverzan i sur. 2012). Povećana ekspresija APX zabilježena je u biljkama izloženim različitim stresnim uvjetima kao što su solni stres (Balen i sur. 2013), suša (Sharma i Dubey 2005), visoke temperature (Caverzan i sur. 2012) te štetno djelovanje metala (Caverzan i sur. 2012, Tkalec i sur. 2014, Majsec i sur. 2016).

U klasu II peroksidaza pripadaju izvanstanične peroksidaze u gljivama (Hiraga i sur. 2001). Ovisno o metalu koji sadrže, dijele se na peroksidaze koje sadrže željezo – lignin peroksidaza (LiP) i mangan – mangan peroksidaza (MnP). Ovi enzimi (uz oksidazu laktazu) sudjeluju u razgradnji lignina, čvrstog fenilpropanskog polimera koji biljkama osigurava strukturnu stabilnosti i čvrstoću. Enzimi LiP i MnP su nespecifični enzimi koji sudjeluju u oksidacijskim reakcijama razgradnje aromatske strukture lignina, a nastali spojevi manjih

molekulskih masa transportiraju se unutar stanice i dalje ragrađuju (Chibbar i Van Huystee 1984).

Peroksidaze klase III prisutne su u staničnoj stijenci i apoplastu koji predstavlja kontinuirani sustav staničnih stijenki i međustaničnih prostora kojim se odvija kretanje vode i mineralnih tvari po zakonima difuzije u korijenu. Ion željeza (III) protohematina IX i dva aminokiselinska ostatka (distalni arginin i histidin) esencijalni su za katalitičku aktivnost peroksidaza klase III, koja uključuje izmjenu elektrona i protona. U standardnom peroksidacijskom ciklusu ove peroksidaze koriste H_2O_2 za različite oksidacijske reakcije, pri čemu reduciraju H_2O_2 uzimajući elektron$^-$ s različitih donora, npr. pirogalola ili gvajakola, odnosno fenolnih spojeva, zatim prekursora lignina, auksina ili različitih sekundarnih metabolita (Hiraga i sur 2001). Nadalje, peroksidaze klase III imaju ulogu u klijanju sjemenki i tijekom prvih dana štite biljku od patogena (Scialabba i sur. 2002), a mogu se aktivirati i u slučaju mehaničkog oštećivanja biljke, pri zarastanju rana (Reymond i sur. 2000), senescenciji (Jiménez i sur. 1997) i tijekom rasta i sazrijevanja plodova (Alexander i Grierson 2002). Pirogalol peroksidaza (PPX) pripada u skupinu peroksidaza klase III. Katalizira pretvorbu vodikovog peroksida u vodu, pri čemu joj kao suspstrat koji donira elektrone služi pirogalol, a reakcija je slijedeća:

$$\text{pirogalol} + H_2O_2 \rightarrow \text{purpurogalin} + 2\ H_2O$$

Postoji mnogo izoformi ovoga enzima koje je moguće pronaći u različitim staničnim odjeljcima (vakuola, Golgijevo tijelo, mitohondriji i dr.) (Anderson i sur. 1995). Nepovoljna temperatura, solni stres, metali i patogeni te onečišćenja tla i zraka uzrokuju promjene u aktivnosti ovih peroksidaza, pa se smatraju dobrim pokazateljima oksidacijskog stresa u biljkama (Sharma i Dubey 2005, Balen i sur. 2013, Cvjetko i sur. 2014a, Tkalec i sur. 2014, Majsec i sur. 2016, Cvjetko i sur. 2017, Cvjetko i sur. 2018).

2.5.3. Katalaza

Katalaza (CAT) ili H_2O_2-oksidoreduktaza je enzim koji se sastoji od četiri podjedinice (tetramer), a svaka sadrži atom željeza u aktivnom centru. Prisutna je u svim aerobnim eukariotima i važna za uklanjanje H_2O_2, koji u peroksisomima nastaje prilikom oksidacije masnih kiselina i fotorespiracije. U uvjetima oksidacijskog stresa ovaj enzim predstavlja neophodnu komponentu antioksidacijskog sustava.

Katalaza može ukloniti H_2O_2 na dva načina: a) direktnom dismutacijom ili b) oksidacijom alkohola, formaldehida ili nitrita vodikovim peroksidom:

a) $2\ H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2\ H_2O$

b) $H_2O_2 + RH_2 \rightarrow 2\ H_2O + R$

Ovo je enzim vrlo velike aktivnosti. Jedna molekula katalaze može reducirati ≈ 6 milijuna molekula H_2O_2 do H_2O i O_2 u jednoj minuti (Gill i Tuteja 2010). Iako ima veliku katalitičku aktivnost, ima slabu supstratnu specifičnost, jer treba istovremeno vezati dvije molekule H_2O_2 u aktivno mjesto (Dat i sur. 2000). Pokazuje nisku aktivnost za razgradnju organskih peroksida (Gill i Tuteja 2010).

Postoje tri glavne izoforme katalaze (CAT 1, CAT 2 i CAT 3). Geni koji ih kodiraju nalaze se na različitim kromosomima, a njihova je ekspresija nezavisno regulirana. Prve dvije izoforme nalaze se u peroksisomima i citosolu, dok se treća izoforma nalazi u mitohondrijima (Scandalios 1990, Rada i sur. 2008). Ekspresija gena za katalazu nije samo razvojno regulirana, već je osjetljiva na različite okolišne signale, kao što su niske temperature, svjetlost, biljni hormoni, ozon, povišeni salinitet, suša i teški metali pa stoga imaju važnu zaštitnu ulogu u odgovoru na oksidacijski stres uzrokovan upravo tim čimbenicima (Peng i sur 2009, Balen i sur. 2013, Tkalec i sur. 2014, Majsec i sur. 2016, Cvjetko i sur. 2017). Njihova aktivnost u stanici je stalna, a razina aktivnosti može se naglo smanjiti pri stresnim uvjetima koji često djeluju na razini translacije (Guan i sur. 2009).

2.6. Istraživanje proteoma biljaka izloženih stresu

Sekvenciranjem genoma modelnih biljaka biolozi nastoje otkriti ulogu i funkciju određenih gena i njihovih produkata te utvrditi kako biološke makromolekule utječu na razvoj i različite funkcije određenog organizma (Cvjetko i sur. 2014b). Proteini predstavljaju poveznicu između genoma i višestrukih staničnih aktivnosti. U genima je zapisan program razvitka i djelovanja živog organizma, a proteini su molekule koje ostvaruju taj genetički zapis. Da bi se informacija iz gena prevela u protein, treba se dogoditi niz važnih procesa u stanici kao što su: transkripcija molekule mRNA, njezina dorada i transport iz jezgre u citoplazmu, translacija proteina te kontrola stabilnosti i kvalitete i njihov transport do krajnjeg odredišta u stanici, kao i posttranslacijske modifikacije koje osiguravaju proizvodnju aktivne i funkcionalne proteinske molekule (Balen 2016). Analize strukture i funkcije proteina mogu se izvoditi na razini proteoma, sekretoma i interaktoma.

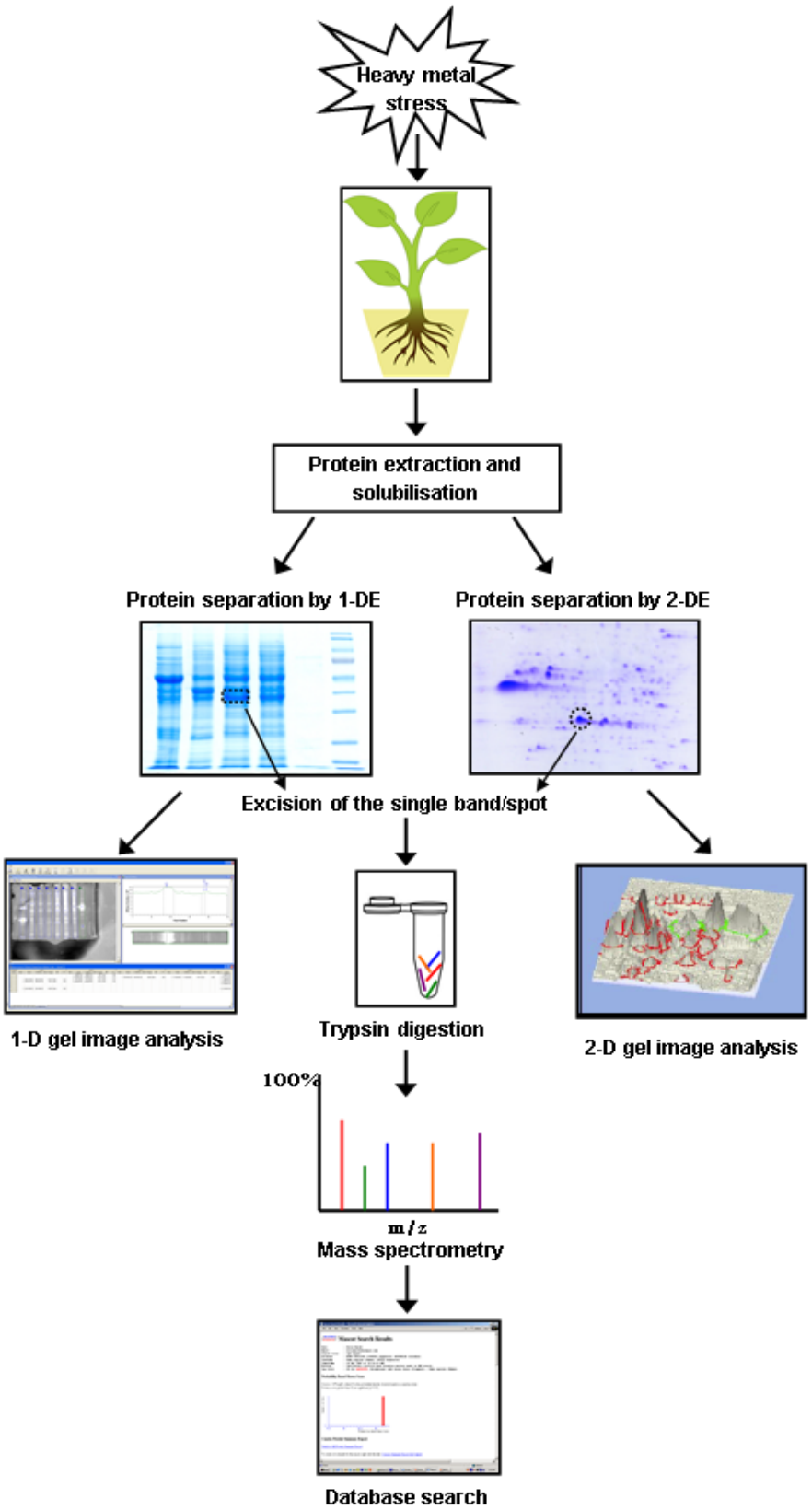
Izraz proteom izveden je iz engleskog izraza „*PROTEins expressed by a genOME*“, a obuhvaća sve proteine koje organizam, organ ili stanica sintetiziraju u svom životnom vijeku analogno izrazu genom, koji predstavlja sve gene jednog organizma, organa ili stanice. Proteom je stoga proteinski komplement genoma, a očituje se kao kvantitativna ekspresija genoma u stanici ili u organizmu pod precizno definiranim uvjetima. Za razliku od genoma, proteom je podložan promjenama, koje mogu biti izazvane unutarstaničnim i izvanstaničnim čimbenicima (Wilkins i sur. 2016), te je stoga u usporedbi s genomom proteom znatno kompleksniji sustav. Njegovoj složenosti pridonosi alternativno procesiranje primarnog transkripta, različite reverzibilne i ireverzibilne posttranslacijske modifikacije i ciljane degradacije proteina te mreže interakcija između samih proteina (Tate i sur. 2013).

U znanstvene discipline koje se bave analizom svih članova određene skupine bioloških molekula spadaju primjerice genomika, koja se bavi analizom gena; transkriptomika, koja proučava mRNA; metabolomika, koja se temelji na istraživanju kemijskih reakcija u kojima sudjeluju metaboliti specifičnih bioloških uzoraka; te proteomika, koja je relativno nova grana molekularne biologije. Proteomika je znanost koja se bavi sustavnom analizom ekspresije proteina, tj. kvantitativnim, ali i kvalitativnim promjenama u ekspresiji proteina pod specifičnim uvjetima (Anderson i Anderson 1998, Kraljević Pavelić i Pavelić 2009). Proteomika utvrđuje, odnosno potvrđuje postojanje određene skupine gena karakterizacijom ekspresijskog profila proteoma, npr. tkiva biljke koja je bila izložena stresu u odnosu na tkivo kontrolne biljke, koja nije bila izložena istom stresnom čimbeniku ili usporedbom genotipova iste biljne vrste − onog koji je tolerantan i onog koji nije tolerantan na isti stresni čimbenik

(Duressa i sur. 2011). Identifikacija proteina vodi do otkrića eksprimiranih gena koji igraju ulogu u mehanizmima tolerancije biljaka na stresne uvjete, pa istraživanja proteoma biljaka, osobito onih izloženih čimbenicima abiotičkog stresa, imaju veliki komercijalni potencijal (Salekdeh i sur. 2002).

2.6.1. Metode za analizu proteoma

Suvremene tehnike proteomike moćan su alat za identifikaciju uloga proteina u živim stanicama, što uključuje njihovu identifikaciju i kvantifikaciju, kao i obrasce njihove ekspresije, posttranslacijske modifikacije i interakcije protein-protein (Balen i sur. 2011). Kombiniranjem metoda moguće je unaprijediti analize proteoma. Primjerice, metode koje se temelje na gel elektroforezi i spektrometriji masa, primijenjene u kombinaciji, uspješno se koriste za razdvajanje, vizualizaciju i identifikaciju proteina uključenih u odgovor biljaka na stres (Zivy i de Vienne 2000). Specijaliziranim računalnim programima i u odnosu na podatke sadržane u bazama podataka, analiziraju se eventualne razlike u ekspresiji proteina nastale kao posljedica izlaganja biljke nekom uzročniku stresa. Shema kombiniranja tehnika u istraživanju proteoma prikazana je Slikom 8., a pojedinačne su tehnike detaljnije opisane u nastavku.



Slika 8. Shematski prikaz tehnika koje se koriste za istraživanje proteoma biljaka izloženih djelovanju teških metala (preuzeto iz Cvjetko i sur. 2014b).

2.6.1.1. Gel elektroforeza

Gel elektroforeza je jedna od najčešće korištenih tehnika za analizu proteinskih ekstrakata i osigurava učinkovito razdvajanje proteina. Elektroforezom nazivamo migraciju (putovanje) nabijenih čestica kroz otopinu zbog djelovanja električnog polja. U elektroforezi analitički podatak dobiva se na temelju razdvajanja analiziranih nabijenih čestica, što se događa u mediju između elektroda (Piljac 2006). Pokretljivost čestica tijekom elektroforeze ovisi o jakosti električnog polja, svojstvima čestica (neto naboj, veličina i oblik) te sredini u kojoj se čestice gibaju, što uključuje ionsku jakost, viskoznost i temperaturu. Ovom jednostavnom, brzom i osjetljivom tehnikom razdvajaju se uglavnom amfoterne molekule, što znači da ovisno o pH vrijednosti sredine u kojoj se nalaze mogu djelovati ili kao kiseline ili kao baze. Naime, proteini se sastoje od bazičnih i kiselih aminokiselinskih ostataka koje nose naboje, pa se ti aminokiselinski ostaci gibaju u električnom polju prema suprotno nabijenim elektrodama sve dok ne dostignu pH vrijednost pri kojoj je ukupan naboj proteina jednak nuli, što je vrijednosti izoelektrične točke proteina - pI (Lopez 2007). Ukoliko je pH vrijednost pufera u kojem se izvodi elektroforeza jednaka vrijednosti pI, molekula neće imati naboj i neće migrirati u električnom polju. Stoga je za elektroforezu važna vrijednost pH medija u kojem se izvodi elektroforeza kao i temperatura koju za elektroforezu proteinskih ekstrakata treba održavati na oko 25°C, budući da porast temperature utječe na difuziju razdvojenih proteinskih vrpci, kao i na moguću denaturaciju proteina.

Razlikuju se tzv. nativne i denaturirajuće elektroforetske tehnike. Nativim tehnikama analiziraju se proteini sa sačuvanom nativnom strukturom, a pogodne su za analizu enzima i složenih proteinskih smjesa. Denaturirajuće tehnike razdvajaju proteine kojima su disulfidne veze podjedinica razorene pomoću npr. ditiotreitola (DTT), 2-merkaptoetanola i natrijevog dodecil sulfata (SDS), pa proteini više nisu aktivni. Ovisno o razdvajanju proteina na osnovu njihovih fizikalno-kemijskih svojstava, razlikujemo jednodimenzionalne (1-DE) i dvodimenzionalne elektroforeze (2-DE). Razdvajanje proteina primjenom 1-DE zasniva se na razdvajanju proteina temeljem jednog fizikalno-kemijskog svojstva, kao što su npr. molekulska masa ili naboj, dok se primjenom 2-DE proteini razdvajanju na osnovi dva svoja svojstva, a najčešće se kombinira razdvajanje prema naboju i molekulskoj masi.

Od tehnika 1-DE, za razdvajanje proteina najčešće se koristi natrijev dodecil sulfat - poliakrilamid gel elektroforeza (eng. *sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) po Laemmli-u (Laemmli 1970). SDS-PAG elektroforeza temelji se na primjeni SDS-a, anionskog detergenta, koji u prisutnosti reagensa za razaranje disulfidnih

veza otapa, denaturira i disocira većinu proteina u pojedinačne polipeptidne lance i maskira naboj polipeptidnih lanaca. Na taj način svi proteini postaju negativno nabijeni, a neto naboj po jedinici mase je konstantan te kompleksi SDS-polipeptidi tijekom elektroforeze migriraju prema anodi različitim brzinama, ovisno o molekulskim masama pojedinih polipeptidnih lanaca. Za određivanje približne molekulske mase analiziranih proteina koriste se biljezi molekulskih masa (smjesa pročišćenih proteina poznatih molekulskih masa), koji se razdvoje, a potom i vizualiziraju zajedno s analiziranim uzorcima (Balen 2016).

Izoelektrično fokusiranje (IEF) je metoda visokog razlučivanja u kojoj se proteini razdvajaju na osnovu svog naboja uslijed prisutnosti kontinuiranog pH gradijenta, sve dok ne dosegnu izoelektričnu točku (pI), u kojoj nemaju naboj. Način na koji se uspostavlja pH gradijent za IEF je ugradnja niskomolekularnih amfoternih molekula (amfolita) u gel, a primjenom električnog polja stvara se pH gradijent, pa molekule proteina migriraju do mjesta na kojem se pH podudara s pI određenog proteina.

Osim navedenih 1-DE tehnika, koje su primjenjive za analize kompleksnih proteinskih smjesa, razvijene su i tehnike za razdvajanje specifičnih skupina proteina. Tako se npr. tehnika tricin-SDS-PAGE koristi za razdvajanje proteina i peptida malih molekulskih masa (<30 kDa), a tehnika Blue native PAGE (BN-PAGE) razvijena je za izolaciju enzimski aktivnih membranskih proteina pri pH 7,5.

Različite tehnike 1-DE uspješno se primjenjuju u analizama biljnih proteina (Ahsan i sur. 2010, Gallagher 2012, Peharec Štefanić i sur. 2012, Kurien i Scofield 2012), no glavni nedostatak svih 1-DE tehnika je u tome što na zadovoljavajući način mogu razdvojiti složene uzorke na stotinjak diskretnih zona te što jedna proteinska vrpca može sadržavati više potpuno različitih proteina, koji imaju sličnu jednu fizikalno-kemijsku značajku na temelju koje je provedeno razdvajanje proteina (Cvjetko i sur. 2014b).

S druge strane, 2-DE omogućava analizu vrlo složenih uzoraka s i po nekoliko tisuća proteina i njihovo međusobno razlučivanje, čak i kada imaju slična fizikalno-kemijska svojstva. Najpopularnija metoda 2-DE je kombinacija izoelektričnog fokusiranja (IEF) kao prve dimenziju, u kojoj se proteini razdvajaju na temelju naboja i SDS-PAG elektroforeze kao druge dimenzije, u kojoj se proteini razdvajaju prema molekulskoj masi (Balen i sur. 2011). Ovisno o uzorcima, razdvajanje u prvoj dimenziji (IEF) može biti u širokom (npr. pH 3-10) ili uskom (npr. pH 4,5-5,5) gradijentu pH. Danas se za izvođenje prve dimenzije uglavnom rabe komercijalno dostupni gotovi gelovi, tzv. imobilini, s već priređenim gradijentom pH, koji omogućavaju visoku rezoluciju, izvrsnu ponovljivost te mogućnost razdvajanja veće količine

proteina (Balen 2016). 2-DE pogodna je za analizu proteinske ekspresije u cijelim stanicama, pa čak i tkivima.

Nakon elektroforeze, razdvojene proteine moguće je vizualizirati različitim metodama bojanja. Najčešća metoda je bojanje bojom *Coomassie Brilliant Blue* (CBB), koja se u kiseloj sredini veže za amino skupine proteina. Za bojanje se koristi otopina 0,1% (*w/v*) CBB R-250 u metanolu, destiliranoj vodi i octenoj kiselini (9:9:2; *v/v/v*), a za odbojavanje ista otopina bez dodatka boje. Proteini su vidljivi kao plave vrpce, a količina proteina koja se nanosi za vizualizaciju dostatna je za identifikaciju proteina spektrometrijom masa. U odnosu na ovu tehniku, tehnika bojanja srebrovim nitratom ($AgNO_3$) znatno je osjetljivija, budući da se mogu vizualizirati proteinske vrpce koje sadrže male količine proteina (0,1 ng). Nedostaci ove metode su pozadinsko bojanje, nemogućnost nekih proteina da se oboje ili vrlo slabo oboje, a ova tehnika načelno nije kompatibilna sa spektrometrijom masa (Balen 2016). Najosjetljivija tehnika za vizualizaciju proteina u gelu je primjena fluorescentnih boja kao što su *Sypro Ruby*®, *Deep Purple*®, *LUCY*®, *Flamingo*®, itd. Gelovi se inkubiraju u otopini boje, a boja se razvija izlaganjem izvoru standardnog UV - transiluminarora ili transiluminatora s plavim svjetlom. Nakon vizualizacije proteina na gelovima, pristupa se analizi dobivenih proteinskih profila s ciljem pronalaženja kvalitativnih i/ili kvantitativnih razlika u ekspresiji proteina (Balen 2016). Budući da je nakon provedene 2-DE proteinska slika na gelu vrlo složena, gelovi se analiziraju računalnim programima, dok nakon 1-DE takva analiza nije nužna.

2.6.1.2. Imunodetekcija

Bez obzira na široku primjenu elektroforetskih tehnika u analizi proteinskih uzoraka, one ipak ne pružaju izravne informacije o identitetu i funkciji razdvojenih proteina. To je potaknulo razvoj tzv. *blotting* tehnika u kojima se razdvojeni proteini prenose i fiksiraju na površinu nekog tankog nosača, npr. na nitroceluloznu membranu ili na hidrofobnu polivinilidien difluoridnu (PVDF) membranu. Tehnika nazvana *Western blotting* izuzetno je pogodna za analizu složenih smjesa proteina dobivenih u gelovima nakon 1- i 2-DE (Balen i sur. 2011). Prijenos se provodi primjenom električnog polja okomitog na ravninu gela (tzv. elektroprijenos), a prednosti su jednostavnost, brzina i čistoća tehnike, što omogućuje analizu malih količina proteina i daje jasan rezultat (Balen 2011). Proteini fiksirani na membrani dostupni su za provođenje daljnje analize protutijelima ili drugim ligandima.

Ovisno o vrsti i veličini proteina koje je potrebno analizirati, odabire se jedan od dva osnovna tipa prijenosa proteina iz gela na membranu: mokri prijenos (eng. *wet blotting*) ili

polusuhi prijenos (eng. *semi-dry blotting*). Mokri prijenos se izvodi u uspravnoj kadici ispunjenoj puferom i prikladan je za hidrofobne ili velike proteini (>100 kDa). Može trajati između 1 i 16 h, a obično se izvodi pri konstantnom naponu. Polusuhi prijenos izvodi se u horizontalnim uređajima koji trebaju male količine pufera. Polusuhi prijenos prikladan je za hidrofilne proteine ili proteine malih masa (< 100 kDa) i traje do 2 h pri konstantnoj jačini struje. Za prijenos proteina u oba tipa prijenosa mogu se koristiti različiti tipovi membrana (Balen i sur. 2011).

Ključni korak nakon prijenosa proteina na membranu je tzv. blokiranje membrane, čime se blokiraju mjesta na membrani gdje nema proteina i na taj način reducira nespecifično vezanje protutijela na proteine ili membranu. Za blokiranje membrana koriste se različiti agensi kao npr. bezmasno mlijeko u prahu, detergent Tween 20® i goveđi serumski albumin (eng. *bovine serum albumin*, BSA). Nakon blokiranja membrane slijedi primjena odgovarajućeg protutijela, kojim se detektira željeni protein. Prvi korak je inkubacija membrane u otopini primarnog protutijela, nakon čega slijedi inkubacija membrane sekundarnim protutijelom, gdje primarno protutijelo veže sekundarno protutijelo, koje specifično prepoznaje molekule IgG iz vrste u kojoj je proizvedeno primarno protutijelo (Balen i sur. 2011).

Kako bi se vizualizirali proteini na koje su se vezala protutijela, sekundarna protutijela dolaze u kompleksu s enzimom. Najčešće korišteni enzimi su alkalna fosfataza i peroksidaza iz hrena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP), a koriste se za kolorimetrijsku ili kemiluminiscencijsku reakciju. Dodavanjem kromogenog supstrata alkalnoj fosfatazi ili peroksidazi iz hrena odvija se enzimska reakcija, čiji je produkt obojan i taloži se na mjestu vezanja protutijela. S druge strane, dodavanjem kemiluminiscencijskog supstrata alkalnoj fosfatazi ili peroksidazi iz hrena dolazi do emisije svjetla na onim mjestima gdje se nalaze sekundarna protutijela, a ta mjesta se vide kao zatamnjene vrpce. U nekim sustavima preskače se uporaba sekundarnih protutijela jer je primarno protutijelo već obilježeno enzimom, što se naziva direktna detekcija (Balen i sur. 2011).

2.6.1.3. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa (eng. *mass spectrometry*, MS) je analitička metoda za razdvajanje ioniziranih molekula na osnovu razlike u omjeru mase i naboja (*m/z*). Princip tehnike je da se molekule uzorka najprije ioniziraju, a zatim u električnom polju ubrzavaju i uvode u analizator, koji se sastoji od električnog polja i na njega okomito postavljenog magnetnog polja. Kada su ova polja jednake jakosti, kroz izlaz analizatora mogu proći samo ioni određene brzine. Radijus

putanje nabijene čestice koja se kreće kroz magnetno polje ovisi o gustoći magnetnog toka, naboju i brzini čestice, pri čemu je centripetalna sila koja djeluje na česticu uravnotežena silom magnetnog polja. Radijusi putanja čestica jednakog naboja, koje se kroz magnetno polje konstantne jakosti kreću jednakom brzinom, proporcionalni su masi čestica, što omogućuje da se iz radijusa putanja čestica odrede njihove relativne mase. Analizator zatim sortira ione, ovisno o omjeru njihove mase i naboja, a detektor ih prepoznaje, pa se kao rezultat dobije spektar masa, koji se dalje analizira usporedbom s podacima pohranjenima u bazama podataka.

Kao izvori iona koriste se ionizacija elektroraspršenjem (eng. *electrospray ionization,* ESI), koja omogućava sekvenciranje proteina *de novo* te daje podatke o aminokiselinskom sastavu izabranog triptičkog peptida; zatim matricom pomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem (eng. *matrix assisted laser desorption/ionization,* MALDI), koja se koristi za proteinske uzorke uklopljene u odgovarajuću matricu, gdje se uzorci dalje analiziraju laserom te poboljšana metoda MALDI, tzv. *surface-enhanced laser desorption/ionization* (SELDI). Analizator masa može biti kvadrupol (eng. *quadrupol*, Q), koji pomoću radio frekvencije i voltaže direktne struje funkcionira kao filtar masa ili analizator, a čiji se rad zasniva na mjerenju vremena leta iona (eng. *time of flight,* TOF), gdje se uključivanjem jakog akceleracijskog polja koji daje kinetičku energiju ionima, ioni s manjim vrijednostima *m/z* kreću brže, što rezultira razdvajanjem prema molekulskoj masi. Analizator TOF koristi se za gotovo neograničeni raspon molekulskih masa, vrlo je brz i ima izuzetno visoku osjetljivost. Osim toga, analizatori mogu doći i u kombinaciji više analizatora, pa tada gorimo o tandemskim tehnikama kao što su trostruki kvadrupol (eng. *triple quadrupole,* QQQ) te hibrid kvadrupola i analizatora koji mjeri vrijeme leta (eng. *quadrupole time-of-flight mass spectrometer,* Q-TOF). Za detekciju analita koriste se detektori, kao što su elektronsko pojačalo i scintilacijski brojač.

Pri istraživanju proteina vrlo često se koristi tehnika MALDI, budući da je relativno blaga tehnika ionizacije molekula, za koju analit ne mora biti hlapljiva smjesa molekula, a istovremeno može biti termolabilnih svojstava, zbog čega je tehnika pogodna za istraživanje proteina (Karas i Hillenkamp 1988). Mehanizam ionizacije nije u potpunosti razjašnjen, ali predložena je teorija koja se osniva na brzom prijenosu naboja između molekula matrice i analita u plinovitoj fazi. Ionizacija molekula rezultira spontanom fragmentacijom, a dobiveni se fragmenti ubrzavaju prema analizatoru (De Hoffmann i Stroobant 2007). MALDI tehnika najčešće generira jednostruko nabijene molekulske fragmente koji su uglavnom dobiveni protonacijom (Galić i Cindrić 2008).

Tehnika ionizacije MALDI najčešće se koristi u spektrometrima masa s analizatorom TOF (MALDI-TOF), a ova kombinacija odlikuje se visokom osjetljivošću, velikom brzinom

analiza i otpornošću na kontaminaciju uzoraka drugim molekulama, Spektrometar masa koji sadrži dva analizatora TOF odvojena kolizijskom ćelijom (uređaj MALDI-TOF/TOF) može se koristiti za sekvenciranje proteina kroz proces tandemske spektrometrije masa (eng. *tandem mass spectrometry*, MS/MS), koji uključuje snimanje spektra nekog uzorka, selektivno propuštanje nekoliko najjačih signala kroz prvi TOF uređaj, nasumično cijepanje odabranih peptida njihovim sudaranjem s molekulama dušika u kolizijskoj ćeliji i konačno razdvajanje dobivenih fragmenata u drugom TOF uređaju. Na kraju se fragmenti identificiraju pomoću složenih algoritama i pretraživanjem baza podataka (Paulo 2012). Prednost tehnike sekvenciranja proteina tehnikom MS/MS je da se individualni peptidi ne moraju razdvajati iz kompleksnih smjesa, za razliku od metode Edmanove odgradnje. Nadalje, brzina rada, točnost mjerenih masa, kvaliteta spektara MS/MS i osjetljivost instrumenata MALDI-TOF/TOF uvelike nadmašuje performanse klasičnog instrumenta MALDI-TOF (Medzihradszky i sur. 2000).

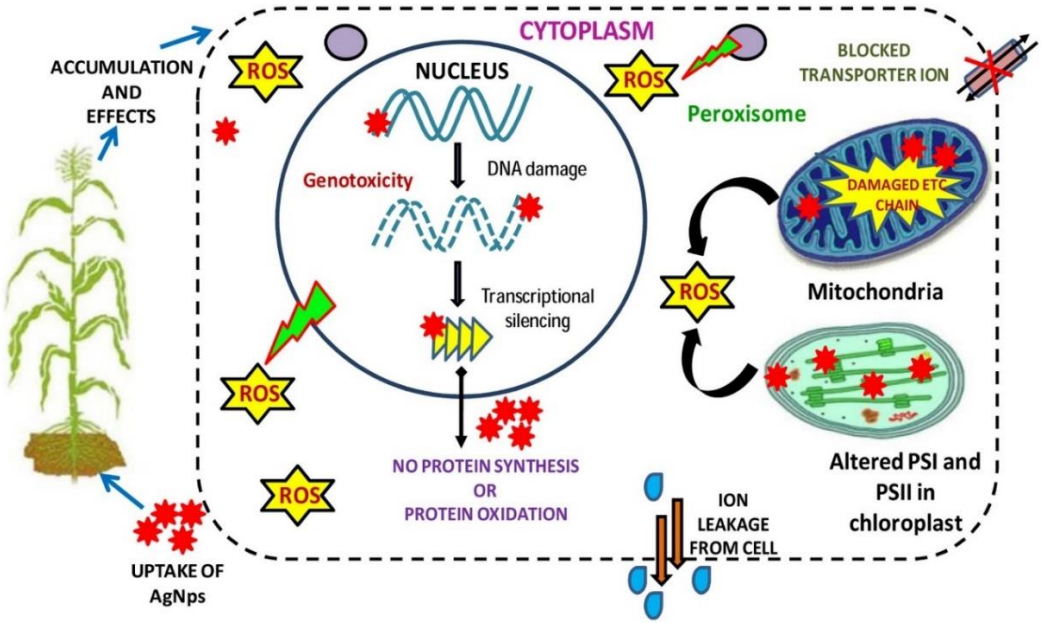
2.7. Dosadašnje spoznaje o učincima nanočestica srebra na biljke

Biljke mogu biti izložene nanočesticama srebra neizravno − putem proizvoda koje ljudi korištenjem oslobađaju u okoliš (Luoma 2008) i izravno − primjenom komercijalno dostupnih proizvoda korištenih u poljoprivredi (Sekhon 2014). Kako biljke igraju važnu ulogu u akumulaciji i biodistribuciji mnogih tvari otpuštenih u okoliš, postoji velika vjerojatnost da će na njih utjecati AgNP oslobođene u okoliš. Time biljke postaju potencijalni put za njihov transport i bioakumulaciju u hranidbene lance (Rico i sur. 2011), a potencijalni štetan učinak na okoliš mogao bi imati i štetan utjecaj na zdravlje ljudi (Beer i sur. 2012).

O sudbini i interakcijama nanočestica u biljnim stanicama postoje mnoga otvorena pitanja. Na biološku dostupnost AgNP mogu utjecati i sastav hranjive podloge, vodene otopine ili tla te površinski omotači, no samo je nekoliko istraživanja na biljkama uzelo u obzir ove aspekte (Coutris i sur. 2012, Cvjetko i sur. 2017).

Stanice korijena glavno su mjesto unosa AgNP (Slika 9.), koje u korijen ulaze zajedno s vodom i u njoj otopljenim tvarima (Tripathi i sur. 2017a) te prolaze kroz staničnu stijenku, koja služi kao prirodno sito (Navarro i sur. 2008) i plazmatsku membranu epidermalnog sloja korijena i odlaze dalje u vaskularno tkivo (Tripathi i sur. 2017a). Međutim, neka istraživanja su pokazala da obrambeni mehanizmi biljke, koji uključuju prijenos AgNP od korijena do listova, mogu sprječiti prijenos i akumulaciju AgNP u stabljici i listovima, potpuno ili djelomično (Yin i sur. 2012, Vannini i sur. 2014) te je stoga često toksičnost AgNP jače izražena u korijenu

biljke nego u listu. Osim toga, AgNP mogu uzrokovati nastanak novih pora u staničnoj stijenci (Navarro i sur. 2008), čime se njena propusnost povećava. Prema rezultatima nekih istraživanjima, prijenos AgNP kroz plazmatsku membranu potpomognut je endocitozom (Ovećka i sur. 2005, Farbega i sur. 2010), prilikom čega se stvara mjehurić koji obavija nanočesticu i konačno je transportira iz membrane u stanicu (Tripathi i sur. 2017a). Kako navode neki autori (Ma i sur. 2010), AgNP se nakon akumulacije u stanicama prenose preko plazmodezmija, koje povezuju stanice, te tako utječu na fiziološke, biokemijske i strukturne promjene (Tripathi i sur. 2017a).



Slika 9. Glavni fitotoksični učinci AgNP zabilježeni u različitim staničnim organelima biljne stanice (preuzeto iz Tripathi i sur. 2017a).

Toksičnost AgNP očituje se u smanjenju duljine korijenja i mase biljke, ima negativan utjecaj na rast klijanaca, a izaziva i morfološke promjene na korijenu, listu i na stabljici (Tripathi i sur. 2017a). Naime, u studijama u kojima se istraživala fitotoksičnost AgNP određivana je klijavost sjemenki i rast biljaka, pri čemu su neka istraživanja pokazala da klijanje sjemenki nije osjetljivo na izlaganje AgNP (Stampoulis i sur. 2009), dok su se biljna biomasa i količina klorofila pokazali kao osjetljiviji parametri (Anjum i sur. 2013). Zabilježena je i inhibicija rasta korijena rajčice (Song i sur. 2013) i luka (Cvjetko i sur. 2017) nakon tretmana nanočesticama srebra.

Fitotoksični učinci AgNP ovise o vrsti biljke, ali i o koncentraciji, veličini i stupnju agregacije samih AgNP (Tripathi i sur. 2017a). Također, okolišni uvjeti, kao što su temperatura, vrijeme i način izlaganja nanočesticama, utječu na fitotoksičnost AgNP. Treba imati na umu da

se toksični učinci koje AgNP imaju na biljke prenose na druge dijelove hranidbenog lanca, što dovodi do poremećaja u ravnoteži ekosustava (Tripathi i sur. 2017a).

Procjena oksidacijskog oštećenja lipida, proteina i molekule DNA, kao i promjene u aktivnosti antioksidacijskih enzima i količini antioksidansa često se koriste kao parametri u istraživanjima toksičnosti koja je izazvana metalima (Balen i sur. 2012, Tkalec i sur. 2014), ali su se tek nedavno počeli istraživati vezano uz toksične učinke AgNP na biljke. Naime, analize oksidacijskog oštećenja biološki važnih makromolekula, kao i promjene uočene u aktivnosti antioksidacijskih enzima dokazane su u nekim studijama utjecaja AgNP na biljke (Nair i Chung 2014b, Dimkpa i sur. 2013, Yasur i Rani 2013, Cvjetko i sur. 2017, Cvjetko i sur. 2018) te pružaju dokaze da oksidacijski stres može imati važnu ulogu u fitotoksičnosti AgNP. Nadalje, istraživanja su pokazala da AgNP mogu izazvati i citotoksičnost (Cvjetko i sur. 2017) i neke kromosomske aberacije (Kumari i sur. 2009) u stanicama korjenčića luka. Postoje i dokazi o promjenama u ekspresiji pojedinih proteina primarnog metabolizma i sustava stanične obrane (Ma i sur. 2010), utjecaju na reproduktivni ciklus biljke (Panda i sur. 2011, Anjum i sur. 2013), kao i na njen fotosintetski sustav (Tripathi i sur. 2017a). Ovi rezultati ukazuju na potrebu provođenja istraživanja učinaka AgNP na biljke temeljenih na analizi različitih parametara, uključujući biokemijske i fiziološke pokazatelje koji se smatraju jednim od ranih znakova onečišćenja okoliša (Anjum i sur. 2013).

Iako je primjena proteomike doprinijela povećanju spoznaja o odgovoru biljaka na stres izazvan teškim metalima (Hossain i Komatsu 2013), o proteinima koji su uključeni u odgovor na stres uzrokovan nanočesticama metala zna se vrlo malo. Istraživanja utjecaja AgNP na proteom većinom su provedena u animalnim i bakterijskim stanicama (Lok i sur. 2006, Gao i sur. 2011), dok je u svega nekoliko istraživanja koja podastiru rezultate učinaka AgNP u biljnim stanicama analiziran proteom. Primjerice, istraživanje proteoma biljke *Triticum aestivum* L. cv Blasco, koja je tretirana s AgNP, ukazuje na to da biljka u svom odgovoru na stres pokazuje različitu ekspresiju proteina uključenih u primarni metabolizam, što sugerira da metabolička adaptacija na stres igra važnu ulogu u prilagodbi biljke na stres izazvan nanočesticama srebra (Vannini i sur. 2014). Nadalje, uspoređivanje profila proteoma vrste *Eruca sativa*, koje su bile izložene tretmanima s AgNP ili $AgNO_3$, pokazalo je smanjenje ekspresije proteina nakon tretmana s AgNP u odnosu na $AgNO_3$ (Vannini i sur. 2013). Istim je istraživanjem evidentirano relativno malo preklapanje među proteinima koji su eksprimirani nakon ta dva tipa tretmana, što ukazuje na to da AgNP i ioni Ag^+ (iz $AgNO_3$) uzrokuju različite promjene u proteomu biljke.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijal

U ovom radu korištene su kemikalije proizvođača Sigma – Aldrich, osim ako nije drugačije navedeno.

3.1.1. Biljni materijal

Istraživanje sam provodila na duhanu (*Nicotiana tabacum* L.), sorta Burley, uzgojenom u sterilnim i kontroliranim uvjetima kulture *in vitro*. Pokuse sam provodila na dva biljna sustava:

1. klijancima duhana, koji su uzgajani na osnovnoj hranjivoj podlozi prema Murashige i Skoogu (MS) (Murashige i Skoog 1962),
2. odraslim biljkama duhana s razvijenim korijenovim sustavom i izdankom s diferenciranim listovima, koje su uzgojene na istoj hranjivoj podlozi MS kao i klijanci.

Klijanci su isklijavani i uzgajani na krutim hranjivim podlogama MS s dodatkom AgNP, $AgNO_3$ i omotača citrata 30 dana, nakon čega je tkivo uzorkovano i analizirano.

Odrasle biljke duhana rasle su 60 dana na krutim hranjivim podlogama MS, dok nisu u potpunosti razvile korijenov sustav i izdanak s diferenciranim listovima. Biljke su zatim prebačene u vodenu otopinu AgNP, $AgNO_3$ i omotača citrata i tretirane sedam dana.

3.2. Metode

3.2.1. Kultura biljnog tkiva

Sjemenke duhana sterilizirala sam inkubacijom u 50%-tnoj (*v/v*) otopini natrijevog hipoklorita (NaOCl) na mješalici 15 min. Zatim sam ih nekoliko puta isprala sterilnom H_2O i mikropipetom nasadila na sterilne hranjive podloge MS uz dodatak 500 mg L^{-1} soli MES (2-N-morfolino-etansulfonska kiselina), 1,5% saharoze i 1,1 g L^{-1} *Phytagel*-a, uz pH vrijednost 5,6 (Gichner i sur. 1999). Sastav hranjive podloge prikazan je u Tablici 2. Podloge sam sterilizirala autoklaviranjem pri 121 °C i tlaku od 0,15 MPa 20 min. Pri nasađivanju sjemenki metalni pribor sam dodatno sterilizirala 96%-tnim etanolom i spaljivanjem, a sjemenke nasađivala u aseptičkim uvjetima u komori s horizontalnim strujanjem zraka.

Za uzgoj klijanaca, 50 sjemenki duhana nasadila sam na 25 mL krute hranjive podloge MS u Petrijevoj zdjelici u kojoj su sjemenke isklijale i potom klijanci rasli 30 dana. Za uzgoj odraslih biljaka koristila sam krutu hranjivu podlogu MS u Erlenmeyerovim tikvicama od 300 mL. U svaku tikvicu dodala sam 50 mL hranjive podloge i nasadila po dvije sjemenke duhana. Nakon isklijavanja biljke su na istoj podlozi rasle 60 dana.

Klijanci i biljke uzgajani su u klima komori u kontroliranim uvjetima stalne temperature od 24 ± 1 °C u uvjetima dugog dana (16 h osvjetljenja i 8 h tame) uz umjetnu rasvjetu bijelih fluorescentnih svjetiljki (90 μEs^{-1} m^{-2}).

Tablica 2. Sastav hranjive podloge prema Murashige i Skoogu (MS) (Murashige i Skoog 1962). pH vrijednost podloge namještena je na 5,6

MAKROELEMENTI	mg L^{-1}	mM
KNO_3	1.900	18,80
NH_4NO_3	1.650	20,60
$CaCl_2 \times 2\ H_2O$	440	2,99
KH_2PO_4	170	1,25
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	370	1,50
MIKROELEMENTI	mg L^{-1}	µM
H_3BO_3	6,200	100,0
$CoCl_2 \times 6\ H_2O$	0,025	0,1
KI	0,830	5,0
$Na_2MoO_4 \times 2\ H_2O$	0,250	1,0
$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	0,025	0,1
$MnSO_4 \times 4\ H_2O$	22,300	100,0
$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	8,600	29,9
$FeSO_4 \times 7\ H_2O$	27,800	100,0
Na_2EDTA	37,300	100,0
ORGANSKI DODACI	mg L^{-1}	µM
m-inozitol	50,00	277,50
tiamin-HCl	0,05	0,15
saharoza	1.500,00	11,30
MES-kalijeva sol	500,00	3,77

3.2.2. Tretiranje biljnog materijala

Klijanci i odrasle biljke duhana izložene su djelovanju čestica AgNP (koje su bile stabilizirane citratnim omotačem), srebrovom nitratu ($AgNO_3$, Kemika Zagreb) te samom citratnom omotaču, odnosno trinatrijevom citratu ($Na_3C_6H_5O_7$).

Prvo sam pripremila matičnu otopinu AgNP koncentracije 1.030 µM i matičnu otopinu $AgNO_3$ koncentracije 100 mM te zatim dodala određene volumene matičnih otopina u hranjive podloge kako bi postigla željene koncentracije od 25, 50, 75, 100 i 500 µM. Koncentracije citrata u hranjivim podlogama bile su 10 i 100 µM $Na_3C_6H_5O_7$.

Za tretmane klijanaca, otopine AgNP, $AgNO_3$ i citrata dodala sam u krutu hranjivu podlogu nakon sterilizacije. Otopine sam izlila u plastične Petrijeve zdjelice (25 mL otopine po zdjelici), pričekala da se otopine u potpunosti ohlade i stvrdnu te na površinu svake hranjive podloge nasadila 50 sjemenki duhana. Sjemenke su na podlogama isklijale i klijanci su rasli 30 dana u prethodno navedenim uvjetima. Kontrolni materijal isklijan je i uzgojen na isti način, ali bez dodatka AgNP, $AgNO_3$ i omotača citrata. Nakon 30 dana uzorkovani su i analizirani cijeli kontrolni i tretirani klijanci.

Za pripremu tretmana za odrasle biljke, biljke koje su na krutoj podlozi rasle 60 dana prebacila sam u prethodno pripremljene vodene otopine AgNP, $AgNO_3$ i omotača citrata navedenih koncentracija. Biljke su tretirane sedam dana u uvjetima koji su opisani u poglavlju 3.2.1. Kontrolne biljke rasle su u deH_2O, bez dodatka AgNP, $AgNO_3$ i omotača citrata. Nakon sedam dana uzorkovane su kontrolne i tretirane odrasle biljke, a korijen i listovi analizirani su odvojeno.

3.2.3. Određivanje koncentracije srebra u biljnom tkivu

Pripremu uzoraka te određivanje koncentracije Ag u biljnom tkivu izvela sam primjenom metode EPA 3051a (2007).

3.2.3.1. Priprema uzoraka biljnog tkiva

Koncentraciju srebra mjerila sam u cijelim klijancima te korijenu i listovima odraslih biljaka. Prije pripreme uzoraka, tkivo koje je bilo u izravnom kontaktu sa otopinama AgNP i $AgNO_3$ (klijanci i korijen odraslih biljaka) isprala sam sa 0,01 M HNO_3, a zatim sa Milli-Q® vodom (ultračista voda električne provodljivosti 18,2 mΩ·cm pri 25 °C), kako bih uklonila Ag

koje se vezalo na biljno tkivo. Nakon ispiranja, klijance te korijen i listove sušila sam u sušioniku do konstantne mase pri 80 °C, 24 h.

3.2.3.2. Određivanje koncentracije srebra

Osušene uzorke biljnog tkiva usitnila sam u tarioniku. Zatim sam u teflonskim kivetama izvagala 0,02 do 0,06 g usitnjenog biljnog tkiva te ga razorila metodom mokre digestije uz dodatak 3 mL 65% HNO_3 i 1 mL 37% HCl u uređaju za mikrovalnu razgradnju ETHOS SEL (Milestone, Shelton, CT SAD). Odabrala sam program za digestiju od 4 min na 300 W, 1 min na 600 W, 1 minuta na 0 W i 2 min na 300 W. Nakon završene digestije i hlađenja kiveta na sobnoj temperaturi, sadržaj sam kvantitativno prebacila u odmjernu tikvicu od 50 mL te ga razrijedila s 1% HNO_3 do oznake.

Koncentraciju srebra akumuliranog u biljnom tkivu odredila sam tehnikom spektrometrije masa s induktivno spregnutom plazmom (eng. *inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS) na instrumentu ELAN DRC-e ICP-MS (Perkin Elmer, SAD). Princip rada instrumenta zasniva se na atomizaciji elementa u plazmi i utvrđivanjem koncentracije spektrometrijom masa. Naime, tekući se uzorci pomoću raspršivača u obliku aerosola unose u plazmu. Plazma je atomizirani plin argon (1%), ioniziran na visokim temperaturama od 5.500 do 8.000 K. Uzorci se u takvim uvjetima prevode u paru, a prisutni sastojci razlažu na sastavne atome (disocijacijom i atomizacijom). Slijedi analiza na spektrometru masa, gdje su ioni razdvojeni, a elementi se identificiraju prema odnosu masa/naboj (*m/z*). Koncentracija elementa je proporcionalna broju iona. Protok plina nosioca uzorka je 12,0 L min^{-1}, a protok uzorka 0,84 L min^{-1}. Koncentracije Ag u uzorcima biljnog tkiva određene su iz baždarnog pravca dobivenog iz niza standardnih otopina, pripremljenih od certificiranog referentnog materijala u kome je koncentracija srebra 1.000 mg L^{-1} (Ultra Scientific, Germany). Granica detekcije je bila 0,05 μg $g^{-1}_{\text{suhe tvari}}$, granica kvantifikacije 0,01 μg $g^{-1}_{\text{suhe tvari}}$, a područje linearnosti određivanja 1-200 μg L^{-1}. Rezultate sam prikazala kao srednju vrijednost od šest replika uz standardnu pogrešku.

3.2.4. Ekstrakcija topivih proteina iz biljnog tkiva i određivanje njihove koncentracije

Za ekstrakciju topivih proteina koristila sam svježe biljno tkivo: 0,4 g cijelih klijanaca te 0,4 g korijena i 0,2 g listova odraslih biljaka. Biljno tkivo koje je bilo u direktnom kontaktu sa AgNP ili $AgNO_3$ (klijanci i korijen odraslih biljaka) pažljivo sam isprala s Milli-Q®vodom, nakon čega sam provela postupak ekstrakcije proteina. U prethodno ohlađenom tarioniku, homogenirala sam prethodno izrezano tkivo uz dodatak 2 mL hladnog 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 i malu količinu polivinilpirolidona (PVP), koji sprječava djelovanje fenolnih spojeva. Homogenat sam potom centrifugirala 15 min na 20.000 *g* pri temperaturi od 4 °C, nakon čega sam supernatant prebacila u čiste plastične tubice i ponovo centrifugirala 60 min na 20.000 *g* pri 4 °C. Dobiveni supernatant prebacila sam ponovo u čiste plastične tubice.

Koncentracija ukupnih topivih proteina u ekstraktima uzoraka odredila sam metodom po Bradfordu (1976). Metoda se temelji na vezanju boje *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 na proteine. Slobodna boja postoji u više različitih ionskih oblika (pKa 1,15; 1,82 i 12,4), a anionski oblik (plavi) veže se na proteine i maksimalno apsorbira svjetlost pri valnoj duljini 595 nm. Količina proteina se procjenjuje određivanjem količine boje u plavom ionskom obliku mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 595 nm. Prvo sam pripremila Bradford matičnu otopinu (0,01% CBB G-250; 31,35% (*v/v*) etanol; 58,6% (*v/v*) H_3PO_4). Iz nje sam pripremila Bradford radnu otopinu (2,58% (*v/v*) etanol; 5,28% (*v/v*) H_3PO_4; 6% (*v/v*) Bradford matična otopina), koju sam zatim koristila za mjerenje koncentracije proteina. Baždarni pravac sam izradila pomoću otopina albumina goveđeg seruma (eng. *bovine serum albumin*, BSA) (Sigma, Njemačka) iz niza poznatih koncentracija (0,2 – 2,0 mg mL^{-1}) pripremljenih u 0,1 M kalij-fosfatnom puferu pH 7,0. Za mjerenje koncentracije pomiješala sam 980 µL Bradford radne otopine sa 20 µL proteinskog ekstrakta u plastičnoj tubici te potom promiješala na vortexu (IKA, Njemačka), a njezin sadržaj prebacila u kivetu. Intenzitet plavog obojenja nastalog pri reakciji proteina u uzorku s Bradfordovom otopinom, odnosno apsorbanciju, mjerila sam spektrofotometrijski (model spektrofotometra ATI/Unicam UV4-100, Cambridge, UK) na valnoj duljini od 595 nm. Koncentraciju ukupnih topivih proteina (mg proteina po mL otopine) u svakome uzorku dobila sam očitavanjem prethodno napravljene baždarne krivulje.

Uzroke s izmjerenom koncentracijom proteina koristila sam za određivanje sadržaja proteinskih karbonila te aktivnosti antioksidacijskih enzima: superoksid dismutaze (SOD), pirogalol peroksidaze (PPX), akorbat peroksidaze (APX) i katalaze (CAT). Proteinske ekstrakte sam također razdvajala gel elektroforezom s ciljem dobivanja proteinske slike topivih proteina i određivanja izoformi antioksidacijskih enzima te za imunodetekciju antioksidacijskih enzima.

3.2.5. Mjerenje parametara oksidacijskog stresa

3.2.5.1. Određivanje razine reaktivnih kisikovih spojeva – dehidroetidij test

Stvaranje ROS odredila sam primjenom fluorescentne boje dihidroetidium (DHE). koja lako prolazi kroz membrane i vrlo uspješno detektira uglavnom stvaranje $^{\bullet}O_2^-$. U reakciji DHE s $^{\bullet}O_2^-$ nastaje crveni pigment 2-hydroksi etidij, koji se lako detektira fluorescencijskim mikroskopom (Domijan i Abramov 2011).

Kontrolni i tretirani biljni materijal, koji je bio izrezan na sitne komadiće, inkubirala sam s 10 μL 10 μM DHE 25 min pri sobnoj temperaturi u plastičnoj tubici, u mraku. Uzorke sam potom isprala i prenijela na predmetno stakalce te analizirala fluorescencijskim mikroskopom (model Olympus BX-51, Olympus, Tokyo, Japan). Za ekscitaciju korištene su valne duljine od 450 − 490 nm, dok je emisija bilježena pri valnim duljinama od 520 nm i više. Fotografije su snimljene visokorezolucijskom kamerom (model Olympus DP70, Olympus, Tokyo, Japan), a analiza intenziteta fluorescencije provedena je primjenom računalnog programa Lucida 6.0 (Wirral, Velika Britanija) na 100 nasumično odabranih stanica po stakalcu. Dobiveni rezultati prikazani su prema relativnom intenzitetu u odnosu na odgovarajući kontrolni biljni materijal.

3.2.5.2. Određivanje razine lipidne peroksidacije – sadržaj malondialdehida

Razina lipidne peroksidacije u stanicama određena je mjerenjem sadržaja malondialdehida (MDA) metodom prema Heathu i Packeru (1968). U ohlađenom tarioniku homogenirala sam 0,4 g tkiva klijanaca te 0,4 g korijena i 0,2 g lista odraslih biljaka u 1.300 μL (2 x 650 μL) ekstrakcijskog pufera: 0,3% (*w/v*) tiobarbituratna kiselina (TBA) u 10% (*w/v*) trikloroctenoj kiselini (TCA). Dobivene ekstrakte prelila sam u plastične tubice za daljnju analizu.

Ekstrakte sam zagrijavala na termomikseru na 95 °C tijekom 30 min. Zagrijavanjem pri niskom pH lipidni peroksidi se raspadaju te nastaju produkti koji reagiraju sa TBA, od kojih je

najzastupljeniji MDA. Tijekom zagrijavanja tubice su bile otvorene (jer smjesa vrije), a zatim sam ih ohladila u posudi s ledom, čime je reakcija zaustavljena. Nakon toga sam uzorke centrifugirala 30 min na 20.000 *g* pri +4 °C.

Supernatant sam prelila sam u kivete i spektrofotometrijski izmjerila apsorbanciju na dvije valne duljine, 532 i 600 nm. Od vrijednosti očitane na 532 nm oduzela sam vrijednost očitanu na 600 nm, što predstavlja korekciju za nespecifično zamućenje. Kao slijepe probe koristila sam ekstrakcijski pufer, obrađen pod istim uvjetima kao i uzorci.

Koncentraciju lipidnih peroksida izrazila sam kao koncentraciju MDA u μmol g^{-1} svježe tvari uz primjenu molarnog apsorpcijskog koeficijenta ε = 155 mM^{-1} cm^{-1} za MDA prema jednadžbi:

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

gdje je:

A_{532} = apsorbancija izmjerena na 532 nm

A_{600} = apsorbancija izmjerena na 600 nm

ε = molarni apsorpcijski koeficijent (155 mM^{-1} cm^{-1})

m = masa tkiva (g)

l = duljina optičkog puta (1 cm)

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika ± standardna pogreška.

3.2.5.3. Određivanje sadržaja proteinskih karbonila

Oštećenje proteina uslijed oksidacijskog stresa odredila sam mjerenjem koncentracije proteinskih karbonila, za što sam koristila metodu prema Levine i sur. (1994). Za mjerenje sam pripremila 2 seta plastičnih tubica. U 200 μL ekstrakta, pripremljenog u 0,1 M kalij-fosfatnom puferu (pH 7,0) (poglavlje 3.2.4.), dodala sam 300 μL 10 mM otopine dinitrofenilhidrazina (DNPH) u 2 M HCl za cijepanje proteina. U drugi set tubica, za pripremu slijepe probe, dodala sam alikvot istog uzorka od 200 μL i 300 μL 2 M HCl. Pripremljene uzorke oba seta tubica promiješala sam na vortexu te ih inkubirala u mraku 1 h na sobnoj temperaturi uz protresanje svakih 15 min.

Nakon inkubacije u uzorke sam dodala 500 μL 10% (*w/v*) TCA za precipitaciju proteina te ih ostavila 5 min na -20 °C. Uzorke sam zatim centrifugirala 10 min na 20.000 *g* pri +4 °C,

nakon čega sam supernatant odlila, a nastali talog isprala 3 puta sa 500 μL otopine etanol/etilacetat u omjeru 1:1 (*v/v*), kako bi se uklonio nevezani reagens.

Talog sam zatim otopila u 1 mL 6 M ureje u 20 mM kalij-fosfatnom puferu pH 2,4, a kako bih ubrzala otapanje, koristila sam vortex. Spektrofotometrijski sam izmjerila apsorbanciju pri 370 nm. Prilikom mjerenja svaki je uzorak s DNPH imao svoju slijepu probu bez DNPH, kako je prethodno opisano.

Sadržaj nastalih proteinskih karbonila izračunala sam primjenom molarnog apsorpcijskog koeficijenta od 22 mM^{-1} cm^{-1} prema jednadžbi:

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

gdje je:

A_{370} = apsorbancija izmjerena na 370 nm

ε = molarni apsorpcijski koeficijent (22 mM^{-1} cm^{-1})

m = sadržaj proteina (mg mL^{-1})

l = duljina optičkog puta (1 cm)

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika ± standardna pogreška.

3.2.5.4. Određivanje oštećenja molekule DNA - Comet test

Oštećenja molekule DNA detektirala sam i izmjerila primjenom Comet testa (Gichner i sur. 2004). Jezgre stanica mehanički sam izolirala radeći rezove žiletom po biljnom tkivu uronjenom u 250 μL pufera Tris-HCl pH 7,5 pri 4 °C te ih pomiješala s jednakim volumenom otopine agaroze niskog tališta [eng. *low melting point*, LMP; 1% (*w/v*)], koja je pripremljena u puferiranoj otopini fosfatnih soli (eng. *phospate buffer saline*, PBS; 10 mM Na_2HPO_4, 1,7 mM KH_2PO_4, 130 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4) i zagrijana na 42 °C. Ovu smjesu nanijela sam na predmetna stakalca na kojima se nalazila 1%-tna (*w/v*) otopina agaroze normalnog tališta (eng. *normal melting point*, NMP) u deH_2O. Sve sam pokrila pokrovnim stakalcem i ostavila na ledu kako bi se agaroza stvrdnula.

Kadicu za horizontalnu elektroforezu napunila sam hladnim puferom za elektroforezu (1 mM Na_2EDTA i 300 mM NaOH, pH>13). Sa predmetnih stakalaca uklonila sam pokrovna stakalca te predmetna stakalca uronila u kadicu s puferom za elektroforezu 10 min kako bi došlo do denaturacije DNA. Nakon dentauracije, pokrenula sam elektroforezu pri 0,8 V cm^{-1} i 300

mA kroz 20 min. Stakalca sam potom isprala 3 puta po 5 min s neutralizacijskim puferom (400 mM Tris-HCl, pH 7,5) i na kraju uronila u deH_2O.

Stakalca su inkubirana 5 min sa 70 µL etidijevog bromida (20 µg mL^{-1}). Za svaki uzorak načinjene su po tri replike u dva neovisna pokusa, te sam sa svakog stakalca izabrala 150 jezgara za analizu fluorescencijskim mikroskopom s ekscitacijskim filtrom BP 520/09 nm i graničnim filtrom od 610 nm. Postotak DNA u repu (% DNA), kao primarna mjera oštećenja DNA, mjeren je računalnim programom Komet ver.5. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika ± standardna pogreška.

3.2.6. Spektrofotometrijsko određivanje aktivnosti antioksidacijskih enzima

3.2.6.1. Superoksid dismutaza

Aktivnost superoksid dismutaze (SOD; EC 1.15.1.1) odredila sam spektrofotometrijski prema metodi Beauchamp i Fridovicha (1971). U 800 µL reakcijske smjese sastava: 13 mM metionin, 75 µM nitroplavi tetrazolij (eng. *nitroblue tetrazolium*, NBT) i 0,1 M etilendiamintetraoctena kiselina (eng. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA), dodala sam 190 µL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,8 i 10 µL otopine 2 mM riboflavina (fotoreaktivna kemikalija koja generira superoksidne radikale). Nakon dodatka riboflavina, izmiješala sam reakcijsku smjesu u kivetama te ih na 8 min izložila djelovanju svjetlosti transiluminatora (15 W). NBT se reducira u prisutnosti superoksidnih radikala u netopivi plavo obojeni formazan, koji pokazuje apsorpcijski maksimum na valnoj duljini od 560 nm. Kao slijepa proba korištena je navedena smjesa koja nije bila izložena djelovanju svjetlosti.

Za daljnju analizu, u navedenoj reakcijskoj smjesi smanjivala sam količinu kalij-fosfatnog pufera i dodavala proporcionalnu količinu uzorka kontrole, ponavljajući postupak s različitim volumenima, kako bih dobila smanjenje apsorbancije od 50%. Uslijedio je identičan postupak sa svim prethodno pripremljenim proteinskim uzorcima (poglavlje 3.2.4.), kao i sa SOD standardima. SOD standardi su razrjeđenja otopina poznatih koncentracija, koje se kreću u rasponu od 0,025 do 1 U μL^{-1}. Nakon mjerenja, dobiveni rezultati su linearizirani na način da su vrijednosti aktivnosti maksimuma (neinhibirana kontrola) podijeljeni s rezultatima koji su dobiveni za uzorke, odnosno SOD standarde. Uz pomoć SOD standarda izradila sam baždarnu krivulju na temelju koje sam izračunala aktivnosti SOD za svaki pojedini uzorak. Jedna jedinica aktivnosti SOD-a predstavlja onu količinu enzima koja uzrokuje 50% inhibicije redukcije NBT-a pri 560 nm u prisutnosti riboflavina na svjetlosti. Aktivnost SOD izražena je kao U mg^{-1} proteina. Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika ± standardna pogreška.

3.2.6.2. Pirogalol peroksidaza

Za određivanje aktivnosti pirogalol peroksidaze (PPX; EC 1.11.1.7) koristila sam metodu prema Nakano i Asada (1981). Na početku sam pripremila reakcijsku smjesu koja se sastojala od 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera u kojem je otopljeno 0,126 g pirogalola te neposredno prije korištenja dodano 5,5 μL H_2O_2. Takav reagens potrebno je zamotati u foliju ili pohraniti u tamnu bocu. Kao slijepu probu koristila sam 980 μL navedene reakcijske smjese u koju sam dodala 20 μL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7,0. Uzorke za mjerenje pripremila sam miješanjem 980 μL reakcijske smjese sa 20 μL prethodno pripravljenih proteinskih ekstrakta (poglavlje 3.2.4.). Aktivnost enzima mjerila sam spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 430 nm svakih 15 sekundi tijekom 1 min.

Aktivnost PPX izrazila sam kao količinu nastalog produkta u μmol min^{-1} po mg proteina prema jednadžbi:

$$\mathrm{PPX} = \frac{\Delta A_{s.v.} \times 4 \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uz} \times m \times \varepsilon \times l} \quad [\mu\mathrm{mol\ min^{-1}\ mg^{-1}_{proteina}}]$$

gdje je:

$\Delta A_{s.v.}$ = srednja vrijednost promjene aposorbancije pri λ 430 nm u 15 s

4 = faktor korekcije $\Delta A_{s.v.}$ za izražavanje rezultata u minuti

$V_{r.s.}$ = volumen reakcijske smjese (1 mL)

F.R. = faktor razrjeđenja uzorka (1)

$V_{uz.}$ = volumen uzorka

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

l = duljina optičkog puta (1 cm)

m = mg proteina mL^{-1}

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika ± standardna pogreška.

3.2.6.3. Askorbat peroksidaza

Aktivnost askorbat peroksidaze (APX; EC 1.11.1.11) izmjerena je prema metodi autora Nakano i Asada (1981). Za mjerenje sam pripremila 10 mM EDTA, 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,0, 12 mM H_2O_2, 10 mM askorbinske kiseline te pufer 1 sastavljen od 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 i 500 µL 10 mM EDTA. Za slijepu probu pomiješala sam 800 µL pufera 1, 180 µL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera, 10 µL 10 mM askorbinske kiseline i 10 µL 12 mM H_2O_2. Za mjerenje aktivnosti APX u uzorcima, pomiješala sam 800 µL pufera 1, 180 µL prethodno pripravljenog proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.2.4.), 10 µL mM askorbinske kiseline i 10 µL 12 mM H_2O_2. Slijepe probe i uzorke stavila sam u kvarcne kivete, a aktivnost enzima sam mjerila spektrofotometrijski pri valnoj duljini od 290 nm. Zbog oksidacije askorbinske kiseline mjerila sam pad apsorbancije svaku sekundu tijekom 15 sekundi.

Aktivnost APX izrazila sam kao količinu nastalog produkta u µmol min^{-1} po mg proteina prema jednadžbi:

$$\mathrm{APX} = \frac{\Delta A_{s.v.} \times 60 \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uz} \times m \times \varepsilon \times l} \quad [\mu mol\ min^{-1}\ mg^{-1}_{proteina}]$$

gdje je:

$\Delta A_{s.v.}$ = srednja vrijednost promjene apsorbancije pri λ 290 nm u 15 s

60 = faktor korekcije $\Delta A_{s.v.}$ za izražavanje rezultata u minuti

$V_{r.s.}$ = volumen reakcijske smjese (1 mL)

F.R. = faktor razrjeđenja uzorka (1)

$V_{uz.}$ = volumen uzorka

ε = molarni apsorpcijski koeficijent (2,8 $mM^{-1}\ cm^{-1}$)

l = duljina optičkog puta (1 cm)

m = mg proteina mL^{-1}

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika ± standardna pogreška.

3.2.6.4. Katalaza

Za određivanje aktivnosti enzima katalaze (CAT; EC 1.11.1.6) koristila sam metodu prema Aebi (1984), koja se temelji na praćenju sniženja apsorbancije reakcijske smjese pri 240 nm (UV-područje). Sniženje absorbancije rezultat je enzimske razgradnje H_2O_2, koji pokazuje maksimum apsorbancije pri 240 nm. Za pripravu reakcijske smjese pomiješala sam 50 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 sa 51 µL otopine H_2O_2. Kao slijepu probu koristila sam smjesu od 950 µL reakcijske otopine i 50 µL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7,0. Za mjerenje aktivnosti CAT u uzorcima pomiješala sam 950 µL reakcijske smjese i 50 µL prethodno pripremljenih proteinskih ekstrakta (poglavlje 3.2.4.). Enzimsku aktivnost mjerila sam spektrofotometrijski tijekom 2 min, svakih 10 sekundi pri 240 nm. Uslijed utroška H_2O_2 kao supstrata, apsorbancija je kontinuirano padala.

Aktivnost CAT izrazila sam kao količinu utrošenog H_2O_2 u µmol min^{-1} po mg proteina prema jednadžbi:

$$CAT = \frac{\Delta A_{s.v.} \times 6 \times V_{r.s.} \times F.R.}{V_{uz} \times m \times \varepsilon \times l} \; [\mu mol\ min^{-1}\ mg^{-1}_{proteina}]$$

gdje je:

$\Delta A_{s.v.}$ = srednja vrijednost promjene apsorbancije pri λ 240 nm u 10 s

6 = faktor korekcije $\Delta A_{s.v.}$ za izražavanje rezultata u minuti

$V_{r.s.}$ = volumen reakcijske smjese (1 mL)

F.R. = faktor razrjeđenja uzorka (1)

$V_{uz.}$ = volumen uzorka

ε_{240} = molarni apsorpcijski koeficijent (40 mM^{-1} cm^{-1})

l = duljina optičkog puta (1 cm)

m = mg proteina mL^{-1}

Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost šest replika ± standardna pogreška.

3.2.6.5. Statistička obrada podataka

Svi dobiveni podaci prikazani u tablicama i grafikonima iskazani su kao srednja vrijednost šest replika ± standardne pogreške. Podatke sam statistički obradila računalnim programom Statistica 12.0 (Start Soft Inc., SAD) za analizu varijance (*analysis of variance* – ANOVA), nakon čega sam provela *Newman – Keuls* test. Pri tumačenju statistički obrađenih rezultata značajnom sam smatrala razliku na razini $P \leq 0,05$.

3.2.7. Određivanje sastava izoformi antioksidacijskih enzima

3.2.7.1. Razdvajanje proteina nativnom poliakriamid gel elektroforezom (PAGE)

Enzime u stanicama moguće je naći u velikom broju izoformi, koje se mogu razdvojiti nativnom elektroforezom (eng. *native-polyacrylamide gel electrophoresis,* PAGE). Razdvajanje izoformi enzima moguće je zbog njihove različite elektroforetske pokretljivosti, koja ovisi o gustoći naboja molekule, molekulskoj masi i izoelektričnoj točki (Balen i sur. 2011). Za određivanje sastava izoformi antioksidacijskih enzima SOD, PPX, APX i CAT koristila sam proteinske ekstrakte pripremljene u 50 mM kalij fosfatnom puferu pH 7,0 na prethodno opisani način (poglavlje 3.2.4.).

Za izvođenje elektroforeze pripremila sam diskontinuirani poliakrilamidni gel između dviju staklenih ploča (Laemmli 1970), koji se sastojao od gornjeg gela za sabijanje i donjeg gela za razdvajanje, koje sam pripremila kako je navedeno u Tablici 3. Gelovi za elektroforezu u nativnim uvjetima pripremaju se bez dodatka natrijevog dodecil sulfata (eng. *sodium dodecyl sulfate*, SDS), kako bi se zadržala aktivnost enzima, očuvala njihova konformacija i interakcija među proteinskim podjedinicama. U sendvič složen od staklenih ploča ulila sam prvo gel za razdvajanje te ga nadsvodila s 20%-tnim etanolom kako bih spriječila kontakt sa zrakom. Nakon polimerizacije gela za razdvajanje, odlila sam etanol te površinu gela i prostor između ploča isprala s reH_2O. Zatim sam pripremila gel za sabijanje, između ploča stavila češljeve i ostavila gel da se polimerizira. Nakon polimerizacije, gelove sa staklenim pločama prenijela sam na elektrodni nosač, postavila sve zajedno u kadicu uređaja za elektroforezu PROTEAN® II xi cell (Bio-Rad, SAD), u koju sam ulila elektrodni pufer (30 g Tris, 244 g glicin, 6 M HCl do pH 8,3 i deH_2O do 1 L), kojeg sam prethodno razrijedila 10 ×. Za razdvajanje izoenzima APX, elektrodni pufer je sadržavao i 2 mM askorbat.

Tablica 3. Sastav otopina za pripremu gelova za elektroforezu u nativnim uvjetima

Otopine	**Gel za razdvajanje (10%)**	**Gel za sabijanje (4%)**
reH_2O	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)
29,2% (*w/v*) akrilamid/0,8% (*w/v*) bisakrilamid (AA/Bis)	13,2 mL	1,3 mL
10% (*w/v*) amonijev peroksodisulfat (APS)	200 µL	50 µL
tetrametiletilendiamin (TEMED)	20 µL	10 µL

Neposredno prije nanošenja u jažice, proteinske ekstrakte sam pomiješala s 10 µL 0,5% (*w/v*) otopine saharoze i boje bromfenol plavo (eng. *bromphenol blue*, BFB). Saharoza služi kako bi se uzorcima povećala gustoću i osiguralo njihovo sjedanje u jažice, a boja BFB olakšava praćenje tijeka elektroforeze. Na gel sam nanosila 100 µg proteina po jažici.

Proteine sam razdvajala primjenom vertikalne anodne diskontinuirane poliakrilamid-gel elektroforeze u nativnim uvjetima na navedenom uređaju pri 4 °C. Prvih 45 min elektroforeza je tekla pri 100 V kako bi uzorci ušli u gel za razdvajanje, nakon čega sam napon povisila na 220 V i držala ga konstantnog do kraja elektroforeze. Kako bih vizualizirala izoforme pojedinih enzima, nakon završetka elektroforeze gelove sam inkubirala u otopinama supstrata, ovisno o istraživanom enzimu.

3.2.7.2. Dokazivanje izoformi superoksid dismutaze

Za otkrivanje izoformi enzima SOD primijenila sam metodu prema Beauchamp i Fridovich (1971). Gel sam inkubirala 25 min u 50 mL 50 mM kalij fosfatnog pufera pH 7,8, u kojem sam otopila 100 mg NBT. Zatim sam gel prebacila u otopinu 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,8 u koju sam dodala 100 µL 2 mM riboflavina i 425 µL TEMED i inkubirala u tami 15 min. Gel sam zatim izložila djelovanju fluorescentne svjetlosti (transiluminator) do pojave akromatskih vrpci na plavičastoj podlozi, koje su predstavljale izoforme enzima SOD.

3.2.7.3. Dokazivanje izoformi pirogalol peroksidaze

Za detekciju vrpci PPX u gelu koristila sam metodu prema Chance i Maehly (1955). Gel sam prvo inkubirala 30 min u 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,0. Nakon toga je slijedila inkubacija od 20 min u 100 mL 50 mM kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 u koji sam dodala 0,252 g pirogalola i 40 µL H_2O_2. Nakon 5-10 min pojavile su se žuto-smeđe vrpce izoenzima PPX. Gel sam odmah skenirala, jer se stajanjem obojenje brzo gubi.

3.2.7.4. Dokazivanje izoformi askorbat peroksidaze

Nakon završetka elektroforeze gel sam inkubirala 3 puta po 10 min u reakcijskoj smjesi koja je sadržavala 20 mM askorbat u 50 mM kalij fosfatnom puferu pH vrijednosti 7,0. Uslijedila je inkubacija u trajanju od 20 min u 50 mM kalij-fosfatnom puferu pH 7,0 koji je sadržavao 4 mM askorbat i 2 mM H_2O_2 te jednominutno ispiranje u 50 mM kalij- fosfatnom puferu pH 7,0. Gel je zatim inkubiran u otopini koja je sadržavala 2,45 mM NBT i 28 mM TEMED u 50 mM kalij fosfatnom puferu pH vrijednosti 7,8 (Mittler i Zilinskas 1993). U toj otopini gel se nalazio 10 do 15 min, nakon čega su se izoforme APX pojavile kao akromatske vrpce na plavo-ljubičastoj podlozi.

3.2.7.5. Dokazivanje izoformi katalaze

Detekciju aktivnosti i broja izoformi katalaze provodila sam prema protokolu Woodbury i sur. (1971). Gel sam na početku ispirala u deH_2O 3 puta po 15 min. Uslijedila je inkubacija od 10 min u 100 mL deH_2O, kojoj sam dodala 51 µL H_2O_2. Nakon kratkog ispiranja u deH_2O, gel sam inkubirala u smjesi 1%-tne otopine (*w/v*) $FeCl_3$ i 1%-tne otopine (*w/v*) $K_3Fe(CN)_6$, do pojave žuto obojenih vrpci izoformi enzima CAT na zelenoj podlozi. Gel sam nekoliko puta ispirala u deH_2O, u kojoj sam ga i pohranila neko vrijeme.

3.2.7.6. Obrada rezultata

Gelove sam skenirala (model skenera HP ScanJet 3.400C, Hewlett-Packard Company, Palo Alto, CA, SAD), a dobivene slike analizirala vizualno, usporedbom dobivenih vrpca na gelovima. Podaci su dobiveni iz tri neovisna eksperimenta.

3.2.8. Analiza ekspresije ukupnih topivih proteina

Za analizu ekspresije ukupnih topivih proteina koristila sam natrijev dodecil sulfat – poliakrilamid gel elektroforezu (eng. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). To je jednodimenzionalna elektroforeza (1-DE) u denaturirajućim uvjetima, koja se temelji na razdvajanju proteina prema njihovoj molekulskoj masi.

3.2.8.1. Razdvajanje ukupnih proteina natrijev dodecil sulfat – poliakrilamid gel elektroforezom (SDS-PAGE)

Elektroforetsko razdvajanje denaturiranih proteina (SDS-PAGE) provela sam prema metodi po Laemmliju (1970). Otopine za gelove za SDS-PAG elektroforezu pripremila sam prema uputama iz Tablice 3. uz dodatak 10%-tne otopine SDS (100 µL u gel za razdvajanje i 50 µL u gel za sabijanje). Priprema proteinskih ekstrakata i određivanje koncentracije proteina izvedena je na način opisan u poglavlju 3.2.4. Uzorke za nanošenje na gel pripravila sam miješanjem određenih volumena proteinskih ekstrakata s puferom za denaturaciju uzoraka (ovisno o koncentraciji proteina izmjerenoj u svakome od uzoraka), kako bih postigla ujednačene koncentracije proteina u svim uzorcima. Sastav pufera za denaturaciju prikazan je u Tablici 4. Uzorke sam denaturirala zagrijavanjem pri 95 °C, 5 min u termomikseru uz kontinuirano miješanje. Za bojanje gelova bojom CBB u jažice sam nanosila 12 µg proteina, a za bojanje gelova srebrovim nitratom ($AgNO_3$) 6 µg proteina po jažici. Kao biljege molekulskih masa koristila sam mješavinu proteina poznatih molekulskih masa u rasponu od 14,4 do 116,0 kDa (*Unstained Protein Molecular Weight Marker*, Thermo Scientific, SAD).

Tablica 4. Sastav pufera za denaturaciju proteina

Otopine	**Volumeni (mL)**
glicerol	8,00
20% (*w/v*) natrijev dodecil sulfat (SDS)	5,00
0,5 M Tris-HCl (pH 6,9)	6,25
β-merkaptoetanol	2,50
0,5% (*v/v*) bromfenol plavo	0,50
reH_2O	do 25

Nakon nanošenja uzoraka, ploče s gelovima postavila sam na elektrodni nosač i u prostor između gelova ulila elektrodni pufer sastava: 30 g Tris, 144 g glicina, 10 g SDS, 6,0 M HCl (do pH 8,3) i reH_2O (nadopunjeno do 1 L), koji sam prije uporabe razrijedila 10 ×. Elektroforezu sam izvodila u kadici *PROTEAN® II xi cell* (Bio-Rad, SAD) priključenoj na izvor vode, koja je kontinuirano cirkulirala kroz sustav kako bi se održala konstantna temperatura. Napon struje iznosio je 100 V prvih 45 min (dok se uzorci nisu koncentrirali i ušli u gel za razdvajanje), a zatim je postavljen na 220 V do kraja. Nakon elektroforeze, gelovi su obojani bojom CBB ili srebrovim nitratom.

3.2.8.2. Bojanje gelova bojom *Coomassie Brilliant Blue* i srebrovim nitratom

Bojanje gela bojom CBB izvela sam kako je opisano u Balen i sur. (2011). Nakon elektroforeze, gel sam inkubirala u otopini za bojenje [0,1% (*w/v*) CBB R-250, 45% (*v/v*) metanol, 10% (*v/v*) ledena octena kiselina] 2 h na sobnoj temperaturi na tresilici. Nakon toga je uslijedilo odbojavanje u otopini sastava: 10% (*v/v*) octena kiselina i 20% (*v/v*) metanol, također na sobnoj temperaturi na tresilici, pri čemu sam otopinu za odbojavanje mijenjala nekoliko puta, sve dok se pozadina gela nije u potpunosti obezbojila. Nakon toga gel sam izvadila iz otopine i skenirala.

Bojanje gela srebrovim nitratom ($AgNO_3$) izvodila sam kako su opisali Blum i sur. (1987). Nakon elektroforeze, gel se 1 h inkubirao u otopini za fiksiranje (50% etanol, 12% octena kiselina, 500 µL formaldehid i destilirana voda do 1 L), nakon čega sam ga 3 puta po 20 min ispirala u otopini 30%-tnog etanola. Uslijedila je obrada u otopini $Na_2S_2O_3$ u trajanju od 1 min, te ispiranje u reH_2O 3 puta po 20 sekundi. Nakon toga gel je 20 min inkubiran u otopini za impregniranje (200 mg $AgNO_3$, 75 µL formaldehid i reH_2O do 100 mL) te ispiran s reH_2O 2 puta po 20 sekundi. Razvijanje vrpci provedeno je u otopini za sastava: 6 g Na_2CO_3, 50 µL formaldehida, 2 mL otopine $Na_2S_2O_3$ i reH_2O do 100 mL. Nakon što su vrpce postale vidljive, razvijanje sam prekinula upotrebom otopine sastava: 50% etanol, 12% octena kiselina i deH_2O, nakon čega sam gelove skenirala i analizirala ekspresiju pojedinačnih proteina.

3.2.9. Određivanje ekspresije antioksidacijskih enzima imunodetekcijom proteina na membrani

Imunodetekciji proteina na membrani prethodila je SDS-PAG elektroforeza, za koju sam prethodno pripremila gelove prema sastavu prikazanom u Tablici 5. U jažice sam nanosila proteinske uzorke pomiješane s puferom za denaturaciju uzoraka, kako je opisano u poglavlju 3.2.8.1. Na gelove sam nanosila 10 µg proteina po jažici. Elektroforezu sam provodila u kadici *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* (Bio-Rad, SAD), prvih 15 min pri 100 V, nakon čega sam napon povećala na 200 V do kraja elektroforeze.

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

Otopine	**Gel za razdvajanje (12 %)**	**Gel za sabijanje (4 %)**
reH_2O	3,5 mL	3,05 mL
Tris-HCl	2,5 mL (1,5 M; pH 8,8)	1,25 mL (0,5 M; pH 6,8)
29,2% (*w/v*) akrilamid/0,8% (*w/v*) bisakrilamid (AA/Bis)	4 mL	0,665 mL
10% (*w/v*) natrijev dodecil sulfat (SDS)	100 µL	50 µL
10% (*w/v*) amonijev peroksodisulfat (APS)	50 µL	35 µL
tetrametiletilendiamin (TEMED)	5 µL	8 µL

Nakon završetka SDS-PAG elektroforeze, gel sam pripremila za elektroprijenos na nitroceluloznu membranu. U staklenu posudu ulila sam pufer za prijenos (28 mM Tris, 192 mM glicin, 10% (*v/v*) metanol, pH=8,3) te u njega položila otvoreni plastični okvir uređaja (crnom stranom prema dolje). Na njega sam stavila spužvicu i filtar papir *Whatmann* te nitroceluloznu membranu koju sam prethodno namočila u reH_2O. Gel sam položila na nitroceluloznu membranu, preklopila ga drugim filtar papirom i spužvicom te preklopila okvir uređaja pazeći da između membrane i gela ne zaostanu mjehurići zraka. Plastični okvir sam postavila u vertikalni sustav za elektroprijenos *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad, SAD), na način da membrana bude okrenuta prema + (pozitivnoj) elektrodi i pokrenula prijenos koji je trajao 1 h na 60 V.

Nakon prijenosa membranu sam obojila bojom *Rouge Ponceau* S, koja reverzibilno boji sve proteine, a nakon ispiranja u deH_2O grafitnom olovkom sam ucrtala biljege molekulskih

masa. Membranu sam zatim dodatno odbojila u 25 mL pufera TBS (eng. *Tris-buffered saline*, Tris; 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5) i pripremila otopinu A koja se sastojala od 500 mL pufera PBS, 1% detergenta Tween 20 i 2% mlijeka u prahu (*w/v*) (za protutijela anti-APX, -CAT i -SOD), odnosno 5% (*w/v*) mlijeka u prahu (za protutijelo anti-peroksidazu iz hrena; eng. *horseradish peroxidase*, HRP).

Membrane sam prvo inkubirala 60 min u 30 mL otopine A, a nakon toga u 30 mL otopine A uz dodatak odgovarajućeg primarnog protutijela na 4 °C preko noći (Tablica 6.). Sljedeći dan membrane sam isprala 3 puta po 10 min sa 20 mL otopine A. Uslijedila je inkubacija membrana u otopini A uz dodatak 3 µL odgovarajućeg sekundarnog protutijela (Tablica 6.) u trajanju od 60 min. Potom sam membrane ispirala 2 puta po 10 min sa 20 mL otopine B (1 × PBS-pufer i 1% Tween 20) te ih obradila otopinama za kemiluminiscenciju (*ECL Western blotting substrate*, Promega za CAT i HRP te *Western-Sure® Chemiluminescent Western blotting reagent*, LI-COR Biosciences za APX i SOD). Membrane sam zatim skenirala na uređaju za kemiluminiscenciju (model C-DiGit Chemiluminescence Western Blot Scanner, LI-COR, SAD).

Tablica 6. Prikaz protutijela (Agrisera, Švedska) i njihovih razrjeđenja korištenih za imunodetekciju antioksidacijskih enzima

Analizirani enzim	**Primarno protutijelo**	**Razrjeđenje**	**Sekundarno protutijelo**	**Razrjeđenje**
APX	Poliklonalno protutijelo kunićji anti-APX	1:1.000	anti-kunićji IgG-HRP	1:30.000
CAT	Poliklonalno protutijelo kunićji anti-CAT	1:1.000	anti-kunićji IgG-HRP	1:30.000
SOD	Poliklonalno protutijelo kunićji anti-Cu/Zn SOD	1:1.000	anti-kunićji IgG-HRP	1:30.000
HRP	Poliklonalno protutijelo ovčji anti-HRP	1:2.000	anti-ovčji IgG-HRP	1:30.000

3.2.10. Analiza proteina dvodimenzionalnom elektroforezom

Dvodimenzionalna gel elektroforeza (2-DE) objedinjuje dva jednodimenzionalna elektroforetska postupka (1-DE), od kojih svaki razdvaja proteine na osnovi različitih fizikalno-kemijskih svojstava: npr. izoelektričnog fokusiranja (prva dimenzija), u kojoj su proteini razdijeljeni prema naboju i poliakrilamidnu gel elektroforezu (druga dimenzija), u kojoj su proteini razdijeljeni prema masi.

3.2.10.1. Fenolna ekstrakcija ukupnih topivih proteina

Od svake vrste tkiva (klijanci, korijen i list) tretiranog sa 100 μM AgNP i 100 μM $AgNO_3$ te kontrolnog tkiva (ukupno dvanaest uzoraka; 4 kontrolna uzorka, 4 uzorka nakon tretmana s AgNP i 4 uzorka nakon tretmana s $AgNO_3$) izvagala sam po 0,15 g liofiliziranog tkiva. Oba tretmana primjenila sam u koncentraciji od 100 μM, budući da sam pri toj koncentraciji tretmana s AgNP uglavnom izmjerila promjene u mjerenim parametrima u odnosu na kontrolu. Naime, pri na nižim koncentracijama tretmana s AgNP nije bilo statistički značajnih promjena kod detekcije oksidacijskog stresa i aktivnosti odabranih enzima. Pripremila sam ekstrakcijski pufer (Tablica 7.) i pohranila ga u posudu s ledom. Za svaku od repliku provela sam postupak fenolne ekstrakcije ukupnih topivih proteina prema metodi koju su opisali Pavoković i sur. (2012).

Tablica 7. Sastav pufera za fenolnu ekstrakciju ukupnih topivih proteina. PMSF otopljen u 96%-tnom etanolu i 2% β-merkaptoetanol dodaju se neposredno prije upotrebe

Kemikalija	**Masa/volumen**
Tris	6,0570 g
EDTA	1,8612 g
saharoza	23,9610 g
KCl	0,7456 g
fenilmetilsulfonil fluorid (PMSF)	0,0174 g
96% etanol	2 mL
2% (*v/v*) β-merkaptoetanol	2 mL
reH_2O	do 100 mL

Izvagano i liofilizirano tkivo stavila stavila u ohlađeni tarionik, kako bi ekstrahirani proteini ostali neoštećeni (niska temperaturu smanjuje aktivnost proteinaza), te ga homogenizirala. Na tkivo sam zatim dodala 6 mL ekstrakcijskog pufera u obrocima po 1 mL, a nakon svakog dodavanja smjesu sam promiješala tučkom. Homogenat sam, nakon predzadnjeg dodavanja obroka od 1 mL, prebacila u plastičnu Falcon tubu od 15 mL, a tarionik sam zatim isprala posljednjim obrokom pufera te pridružila ostatak homogene smjese iz tarionika u smjesu u tubi. Sadržaj tube promiješala na vorteksu (IKA, Njemačka) te inkubirala smjesu 10 min u ledu na miješalici. Potom sam sadržaju u tubi dodala 6 mL fenola i sve zajedno promiješala na vorteksu te inkubirala 10 min na miješalici pri sobnoj temperaturi pri sobnoj temperaturi. Homogenat s dodanim puferom i fenolom centrifugirala sam na centrifugi (Sigma 3K30, Sigma, Njemačka) 15 min na 3.900 *g* pri 4 °C. Nakon toga sam pipetom prebacila supernatant - fenolnu fazu, u čistuu Falcon tubu od 15 mL. Na odvojeni supernatant dodala sam 5 mL ekstrakcijskog pufera i promiješala sadržaj na vorteksu, pa tube ponovno horizontalno položila u posudu s ledom te inkubirala na miješalici 3 min. Sadržaj tuba sam zatim centrifugirala 15 min na 3.900 *g* pri 4 °C. Konačno, supernatant sam prebacila u čistu Falcon tubu od 15 mL i dodala 4 volumena ledeno hladne precipitacijske otopine (0,1 M amonijev acetata u metanolu; čuva se na -20 °C). Sadržaj tube sam promiješala okretanjem u ruci i stavila na precipitaciju preko noći na -20 °C da se istalože proteini.

Istaložene proteine sedimetirala sam centrifugiranjem tijekom 15 min na 3.900 *g* pri 4 °C, nakon čega sam supernatant izlila u otpad. Zatim sam svaki talog, koji je ostao u Falcon tubama, isprala 3 × s po 3 mL ledeno hladne precipitacijske otopine. Tijekom ispiranja taloga tube su cijelo vrijeme bile položene u ledu. Nakon svakog ispiranja, uzorke sam centrifugirala 10 min na 3.900 *g* pri 4 °C. Ispiranje taloga ponovila sam još 2 ×, centrifugirajući uzorke na već opisan način između svakog ispiranja. Kako bi sačuvala male količine proteina koje prilikom pipetiranja zaostaju u nastavcima pipeta, nastavke sam koristila prilikom sva tri ispiranja taloga. Nakon trećeg desetominutnog centrifugiranja izlila sam supernatant i na zaostali talog u tubama dodala 3 mL ledenog acetona. Sadržaj tuba sam centrifugirala na isti način, supernatant uklonila te tube položila horizontalno u digestor kako bi se u njima na zraku osušio preostali talog. Sa sadržajem u Falcon tubama dalje sam radila izvan posude s ledom.

Osušeni talog resuspendirala sam u 500 µL pufera za izoelektrično fokusiranje (IEF pufer) s dodatkom ditiotreitola (DTT) i amfolita. IEF pufer priredila sam otapanjem 5,4 g ureje i 0,2 g 3-[(3-kolamidopropil)dimetilamonijev]-2-hidroksi-1-propansulfonata (CHAPS) u odmjernoj tikvici (ukupan volumen 10 mL), koju sam zatim uronila u posudu s toplom vodom, jer urea kristalizira na sobnoj temperaturi. Nakon toga sam IEF pufer u alikvotima od 1 mL

pohranila na -20 °C. U otopljeni alikvot pufera sam neposredno prije upotrebe dodala DTT (2,0 mg mL^{-1}) i amfolite (5,2 µL mL^{-1}). IEF pufer sastoji se od kemikalija koje će u pojedinom koraku pripreme uzorka spriječiti neželjen proces agregacije proteina (urea), pojačati topljivost hidrofobnih proteina (CHAPS), onemogućiti oksidaciju proteina (DTT), deaktivirati proteaze i razoriti disulfidne mostove, što će dovesti do disocijacije oligomernih i multiproteinskih kompleksa na izdvojene podjedinice. Amfoliti su amfoterne molekule visokog puferskog kapaciteta, koje se pod djelovanjem električnog polja gibaju i zaustavljaju u mjestima vrijednosti izoelektričnih točaka, formirajući uske zone i tvoreći tako kontinuirani gradijent pH potreban za provođenje izoelektričnog fokusiranja (Lopez 2007). Osušeni talog ne otapa se lako u IEF puferu, pa sam prvo talog otapala uvlačenjem i ispuštanjem sadržaja pipetom od 1 mL, pazeći pritom da se sadržaj tube ne zapjeni. Nastavke za pipetu sam ostavila u Falcon tubama, koje sam zatim stavila u stalak i ostavila 10 min na tresilici. Navedeni postupak otapanja taloga sam ponovila još jednom, nakon čega sam tekući sadržaj tube prebacila u čiste Eppendorf tubice od 1,5 mL i centrifugirala (Eppendorf, Njemačka) 5 min na 20.800 *g* pri sobnoj temperaturi. Supernatant sam pipetom prebacila u čiste Eppendorf tubice od 1,5 mL, a talog i korištene tubice bacila.

3.2.10.2. Određivanje koncentracije proteina u ekstraktima za 2-DE

Supernatant dobiven fenolnom ekstrakcijom koristila sam kao sirovi ekstrakt u kojemu sam određivala koncentraciju proteina modificiranom spektrofotometrijskom metodom po Bradfordu (Faurobert i sur. 2007). Od originalne Bradford (1976) metode, ova se metoda razlikuje po dodatku 0,1 M HCl. Kiselina HCl se dodaje kako bi zakiselila otopinu, što pospješuje vezanje proteina za boju CBB koja je sastavni dio Bradford otopine (usprkos interferenciji nekih komponenta IEF pufera).

U Falcon tubicama sam pomiješala 0,1 M HCl, uzorak, reH_2O i Bradford radnu otopinu (više u poglavlju 3.2.4.), a volumeni i redoslijed dodavanja prikazani su u Tablici 8. U slijepu probu umjesto uzorka odpipetirala sam IEF pufer. Sadržaj Falcon tuba kratko sam promiješala na vorteksu i ostavila 10 min u mraku (Bradford otopina je osjetljiva na svjetlo), nakon čega sam uzorke prebacila u kivetu. Koncentraciju proteina, koja je proporcionalna intenzitetu plavog obojenja, u uzorcima sam odredila očitavanjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina BSA poznatih koncentracija (0,2 - 2,0 mg mL^{-1}) pripremljenih u IEF puferu spektrofotometrom (model UV/VIS UV4-100, Unicam, Engleska), pri valnoj duljini od 595 nm. Očitavanjem baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancije otopina BSA

poznatih koncentracija pripremljenih u IEF puferu, utvrdila sam koncentraciju proteina u svakom od uzoraka.

Tablica 8. Sastav otopina za spektrofotometrijsko mjerenje koncentracije proteina nakon fenolne ekstrakcije prema modificiranoj metodi po Bradfordu (Faurobert i sur. 2007)

Otopina s uzorkom		**Slijepa proba**	
0,1 M HCl	10 μL	0,1 M HCl	10 μL
uzorak	20 μL	IEF pufer	20 μL
reH_2O	70 μL	reH_2O	70 μL
Bradford radna otopina	3,5 mL	Bradford radna otopina	3,5 mL

3.2.10.3. Rehidracija imobilina

U uzorke poznatih koncentracija proteina, dodala sam 5 μL boje bromfenol plavo, promiješala ih na vorteksu i centrifugirala 5 min na 20.800 *g* pri sobnoj temperaturi. U posudu za rehidraciju prebacila sam po 400 μL svakog uzorka u pojedinačne jažice i u njih stavila imobiline (eng. *immobiline drystrip*) duljine 13 cm s nelinearnim gradijentnim gelom (pH 3-10) okrenutim prema dnu posude pazeći da nema mjehurića zraka. Imobiline uronjene u otopine proteinskih uzoraka prelila sam s 900 μL mineralnog ulja (*Immobiline DryStrip Cover Fluid*, GE Healthcare®, SAD) kako bih spriječila isušivanje gelova i ostavila da se rehidriraju preko noći (12-16 h) na sobnoj temperaturi.

3.2.10.4. Izoelektrično fokusiranje – prva dimenzija

Izoelektrično fokusiranje (IEF) je metoda razdvajanja proteina u prisutnosti kontinuiranog gradijenta pH uslijed kojeg proteini, zbog bazičnih i kiselih aminokiselinskih ostataka koji nose naboje, migriraju dok ne dosegnu zonu s vrijednošću pH koja odgovara njihovoj izoelektričnoj točki (Balen i sur. 2011).

Nakon rehidracije, imobiline sam ocijedila na papirnatom ručniku i postavila ih na keramičku podlogu na uređaj za izoelektrično fokusiranje (model Ettan IPGphor 3, GE, Healthcare, UK). Na krajeve imobilina uzdužno sam postavila elektrodne papiriće, koje sam prethodno navlažila sa 150 μL deH_2O, tako da je pola elektrodnog papirića bilo na gelu, a pola izvan njega. Zatim sam pričvrstila elektrode, tako da sjednu i na gel i na elektrodni papirić. Cijeli keramički nosač prekrila sam sa 110 mL mineralnog ulja (*Immobiline DryStrip Cover Fluid*, GE Healthcare®, SAD) i pokrenula izoelektrično fokusiranje pod uvjetima: 0-500 V u trajanju od 1 h, 500-1.000 V 1 h, 1.000-8.000 V 1 h te 8.000 V do kraja programa dok se nije

postiglo ukupno 35.000 V h. Nakon završetka izoelektričnog fokusiranja, imobiline sam spremila ih na -80 °C.

3.2.10.5. Ekvilibracija imobilina

Prije pokretanja druge dimenzije, imobiline sam izvadila iz zamrzivača i ostavila 5 min da se otapaju na sobnoj temperaturi, nakon čega sam ih inkubirala na tresilici 15 min u 2,5 mL ekvilibracijskog pufera s dodatkom 100 mg DTT, kako bi se reducirali postojeći disulfidni mostovi unutar proteina. Sastav pufera za ekvilibraciju imobilina je bio slijedeći: 18 g ureje, 1,66 mL Tris-HCl (pH 8,8), 5 mL 20% (*w/v*) SDS-a i reH_2O do 50 mL. Ekvilibracijski pufer čuva se na sobnoj temperaturi, a DTT i jodacetamid (IAA) se zasebno otopaju u puferu, neposredno prije upotrebe. Nakon prvog inkubiranja, imobiline sam ocijedila na papirnatom ručniku i prebacila u pufer za ekvilibraciju s dodatkom 125 mg IAA (koji onemogućava stvaranje novih disulfidnih mostova između cisteinskih ostataka unutar proteina alkilacijom sulfhidrilnih skupina) i ponovo inkubirala 15 min na tresilici. Svrha ekvilibracije je omogućiti proteinima u gelu da u potpunosti reagiraju s SDS-om, kako bi mogli pravilno migrirati prema drugoj dimenziji, dok DTT i IAA sprječavaju renaturaciju proteina (Balen i sur. 2011).

3.2.10.6. SDS-PAG elektroforeza – druga dimenzija

Nakon izoelektričnog fokusiranja, uslijedilo je provođenje analize drugom dimenzijom, pomoću 12%-tne vertikalne SDS-PAGE, prema metodi kako ju je opisao Laemmli (1970), u sustavu *PROTEAN II xi Cell* (Bio-Rad, SAD).

Za provođenje SDS-PAG elektroforeze pripremila sam otopinu za gelove kako je navedeno u Tablici 9. Nakon polimerizacije gelova, ekvilibrirane imobiline uronila sam u elektrodni pufer sastava: 30 g Tris-a, 144 g glicina, 10 g SDS, 6,0 M HCl (do pH 8,3) i reH_2O (nadopunjeno do 1 L) te ih položila na SDS gel priređen za razdvajanje proteina. Na komadić *Whatmann* filtar papira kapnula sam 3 µL biljega molekulskih masa te ga stavila na gel uz desni (-) kraj trake. Sve sam zatim prelila 0,5% otopinom agaroze u elektrodnom puferu s dodatkom boje bromfenol plavo i pričekala da se stvrdne. Nakon što se agaroza stvrdnula, sendvič od staklenih ploča pričvrstila sam na elektrodni nosač te ga prenijela u kadicu s elektrodnim puferom. Pokrenula sam elektroforezu koja se odvijala pri konstantnom naponu od 100 V prvih 45 min, a zatim pri naponu od 220 V do kraja elektroforeze (oko 3 h).

Tablica 9. Sastav 12%-tnog gela za drugu dimenziju

Otopina	**Volumen**
1,5 Tris- HCl pH 8,8	15 mL
29,2% (*w/v*) akrilamid/0,8% (*w/v*) bisakrilamid (AA/Bis)	24 mL
10% (*w/v*) natrijev dodecil sulfat (SDS)	600 µL
10% (*w/v*) amonijev peroksodisulfat (APS)	300 µL
tetrametiletilendiamin (TEMED)	25 µL
reH_2O	do 60 mL

3.2.10.7. Vizualizacija razdvojenih proteina bojom *Coomassie Brilliant Blue*

Nakon SDS-PAGE, gelove sam inkubirala 90 min na tresilici u otopini za bojanje (0,1% (*w/v*) CBB R-250, 45% (*v/v*) metanol, 10% (*v/v*) ledena octena kiselina), pri sobnoj temperaturi, kako je opisano u Balen i sur. (2011). Gelove sam nakon bojanja stavila na odbojavanje u otopinu sastava 10% (*v/v*) octena kiselina i 10% (*v/v*) etanol na tresilici pri sobnoj temperaturi. Otopinu za odbojavanje sam nekoliko puta zamijenila svježom, sve dok se pozadina gela nije obezbojila, nakon čega sam gelove skenirala i pohranila u 10% octenoj kiselini na 4 °C do daljnje analize.

3.2.10.8. Snimanje i analiza gelova

Nakon provedene 2-DE, reprezentativne primjerke gela svakog tretmana analizirala sam računalnim programom Image Master 2D Platinum (GE healtcare, SAD). Tako sam dobila kvantitativni i kvalitativni razlikovni prikaz ekspresijskih profila proteina kontrolnog i tretiranih uzoraka. Proteine koji su različito eksprimirani u kontrolnom i tkivu izloženom tretmanu s AgNP te $AgNO_3$, odabrala sam za daljnju analizu spektrometrijom masa na instrumentu MALDI-TOF/TOF. Odabrala sam one proteinske mrlje koje su po svom postotku volumena bile barem 1,5 × više ili manje izražene u uzorcima u odnosu na kontrolu.

3.2.11. Analiza proteina spektrometrijom masa

Spektrometrija masa (eng. *mass spectrometry*, MS) je analitička tehnika za identifikaciju i kvantifikaciju raznovrsnih smjesa molekula, pa se njome mogu analizirati pojedinačni intaktni proteini, ali i smjesa peptida koja je nastala digestijom proteina. Spektrometriju masa koristila sam kako bih identificirala proteine iz tretiranih tkiva duhana, koji su na 2-D gelu pokazali pojačanu ili smanjenu (1,5 ×) ekspresiju u odnosu na kontrolni uzorak.

3.2.11.1. Priprema uzoraka za digestiju u gelu

Odabrane proteinske mrlje izrezala sam iz gela pomoću plastičnog nastavka za pipetu kojem sam odrezala oko 0,5 cm od vrha. Izrezane komadiće gela prebacila sam u Eppendorf tubice od 1,5 mL u koje sam prethodno dodala 1 mL otopine za odbojavanje sastava 10% (*v/v*) octena kiselina i 40% (*v/v*) metanol. Proteine sam u otopini za odbojavanje inkubirala na termomikseru (model Termomixer comfort, Eppendorf, Njemačka) na 550 rpm preko noći na i pri sobnoj temperaturi. Komadiće gela koji se nisu obezbojili zagrijavala sam u mikrovalnoj pećnici do obezbojenja (na programu *defrost*).

3.2.11.2. Digestija proteina u gelu

Nakon što su se komadići gela potpuno odbojili, pipetom sam od tih komadića gela pažljivo odvojila otopinu za odbojavanje. Učinkovit način za odvajanje otopine za odbojavanje je staviti na manji nastavak za pipetu na veći, budući da je komadić gela bezbojan i sitan (da se u nastavak osim otopine za odbojavanje ne uvuče i gel). Zatim sam na komadiće gelova dodala 500 μL 50 mM pufera amonijev hidrogenkarbonata (NH_4HCO_3), koji stvara optimalan pH za djelovanje tripsina (pH=7,8). Gelovi su zatim inkubirani na sobnoj temperaturi 5 min uz protresanje na 650 rpm na termomikseru. Nakon isteka vremena odvojila sam otopinu i dodala ponovno 500 μL NH_4HCO_3 i inkubirala na termomikseru. Postupak sam ponovila još dva puta, s tim da sam pri posljednjem dodatku otopine uzorak inkubirala 30 min, čime se postiže optimalna vrijednost pH za rad proteaze tripsina. Nakon polusatne inkubacije, uklonila sam otopinu te komadićima gela dodala 500 μL otopine koja je sadržavala 50% (*v/v*) 50 mM NH_4HCO_3 (pH 7,8) i 50% acetonitril te inkubirala sljedećih 30 min u termomikseru na 650 rpm pri sobnoj temperaturi. Zatim sam tu sam otopinu bacila, a u Eppendorf tubice dodala 100 μL 100%-tnog acetonitrila. Komadiće gelova sam pri sobnoj temperaturi inkubirala 5 min na

termomikseru. Nakon inkubacije u čistom acetonitrilu gel se skupio i pobijelio. Acetonitril sam potom uklonila iz Eppendorf tubica, koje sam stavila na sušenje uparavanjem u vakuum centrifugi (model Concentrator 5301, Eppendorf, Njemačka), 30 min na 45 °C. U Eppendorf tubice od 200 µL pažljivo sam prebacila osušene gelove i dodala 10 µL otopine tripsina koncentracije 10 µg mL^{-1}, koja je pripremljena otapanjem matične otopine tripsina koncentracije 1 mg mL^{-1} u 25 mM NH_4HCO_3 (pH 7,8). Uzorci su inkubirani preko noći (18 h) na 37 °C u termomikseru na 500 rpm.

3.2.11.3. Ekstrakcija peptida iz gela

Nakon digestije, sadržaj u tubicama centrifugirala sam u centrifugi (model MiniSpin, Eppendorf, Njemačka) u trajanju od nekoliko sekundi, kako bih sav pufer s tripsinom sabila na dno tubice. Zatim sam taj isti pufer prebacila u Eppendorf tubice od 1,5 mL i uparavala u vakuum centrifugi 30 min pri 45 °C. Komadićima gela u Eppendorf tubicama od 0,2 mL dodala sam 10 µL otopine za ekstrakciju, tj. 50% (*v/v*) otopine 5%-tne trifluoroctene kiseline (TFA) u acetonitrilu, pa ih inkubirala 30 min u ultrazvučnoj kupelji (model Ultrasonic Cell Disruptor XL, Misonix Inc., SAD) pri sobnoj temperaturi. Zatim sam Eppendorf tubice od 0,2 mL dodatno inkubirala 15 min na termomikseru na 500 rpm pri sobnoj temperaturi, a potom ekstrakte spojila s osušenim tripsinskim puferima te komadiće gela bacila. Ekstrakte peptida stavila sam na sušenje u vakuum centrifugu 30 min pri 45 °C te ih zatim pospremila na -80 °C.

3.2.11.4. Pročišćavanje peptida

Za pročišćavanje peptida koristila sam automatizirani uređaj za pripremu uzoraka (model AssayMAP Bravo Automated Liquid Handling Platform, Agilent Technologies, SAD), koji koristi kromatografske kolone. Tehnologija *AssayMAP* ima modificiranu 96-kanalnu robotsku „ruku“ opremljenu s preciznim protočnim špricama, koje se spajaju na kromatografske kolone kroz posebnu sondu. Postupak pročišćavanja peptida temelji se na principu tekućinske kromatografije obrnutih faza. Kolona (eng. *reversed phase-small*, RP-S) se kondicionira nizom otapala rastuće polarnosti, nakon čega se na kolonu nanosi uzorak. Peptidi iz uzorka vežu se na čestice punila elektrostatskim interakcijama. Molekule soli koje se ne vežu na punilo ispiru se polarnim otapalom (vodenom otopinom TFA), dok se peptidi eluiraju otapalom manje polarnosti (vodenom otopinom acetonitrila).

Prije pročišćavanja, osušenim peptidima u mikrotitarskoj pločici dodala sam 45 µL 0,1%-tne TFA. Tako pripremljenu pločicu postavila sam u instrument *AssayMa*p *BRAVO*

Platform te sam pripremila otopine za kondicioniranje kolone i otopinu za eluciju peptida s kolone. Svaku pripremljenu otopinu odpipetirala sam u plastične nosače (12 *column low profile polyro resevoirs*) te postavila u instrument *AssayMA*p *BRAVO Platform* na programom predviđeno mjesto. Također, dodala sam i prazne plastične nosače predviđene za skupljanje organskog otapala s kolone, kao i praznu mikotitarsku pločicu za sakupljanje pročišćenih peptida (eluat). Naposljetku, instrumentu sam zadala program pročišćavanja peptida koji je trajao 90 min. Kolone su prvo kondicionirane sa 100 μL pripremnog pufera (Tablica 10.) brzinom od 300 μL min^{-1}, a zatim sa 100 μL ekvilibracijskog pufera (Tablica 10.) brzinom od 10 μL min^{-1}, nakon čega je uslijedilo nanošenje uzorka (svih 45 μL) brzinom od 5 μL min^{-1}, te elucija peptida otopinom za eluciju peptida s kolone (35 mL acetonitrila, 15 mL reH_2O i 50 mL TFA), u volumenu od 25 μL brzinom od 3 μL min^{-1}. Tako dobivene pročišćene uzorke osušila sam u vakuumskoj centrifugi i koristila za daljnju analizu.

Tablica 10. Sastav otopina za kondicioniranje kolone

Pripremni pufer		**Pufer za ekvilibraciju**	
acetonitril	25 mL	reH_2O	50 mL
reH_2O	25 mL	TFA	50 μL
TFA	50 μL		

3.2.11.5. Analiza peptida spektrometrom masa

Pročišćene peptide koji su bili osušeni resuspendirala sam pipetom u 2 μL matrice, koja se sastojala od otopine α-ciano-4-hidroksicimetne kiseline (CHCA) koncentracije 5 mg mL^{-1}, u smjesi acetonitrila i 0,1% TFA u omjeru 1:1. Matrica u tehnici matricom potpomognute ionizacije uz desorpciju laserskim zračenjem (eng. *matrix-sssisted laser desorption/ionization*, MALDI) djeluje kao nosač peptida, koji se nakon zagrijavanja i fotoionizacije laserom, raspršuje u vakuumu spektrometra masa zajedno s peptidima. Taj princip ovu MALDI tehniku ionizacije uzoraka čini pogodnom za prevođenje velikih nehlapivih molekula (npr. peptida) iz čvrste u plinovitu fazu (Karas i Hillenkamp 1988).

Nakon otapanja peptida u matrici, uzorke sam nanijela na MALDI pločicu na kojoj je, istodobno s matricom, kristalizirao i analit i na taj se način uklopio u kristale matrice. Pločicu sam nakon sušenja na zraku stavila u spektrometar masa MALDI-TOF/TOF (model 4.800 Plus Analyzer, Applied Biosystems, SAD). Na analit uklopljen u kristale matrice usmjerava se kratki

laserski puls jakog intenziteta zračenja (UV ili IR). Molekule matrice desorbiraju zrake te uslijed oslobađanja velike količine topline dolazi do sublimacije površinskog sloja kristala matrice i oslobađanja intaktnog analita iz nje.

Analizatori masa u uređaju mjere vrijeme leta (eng. *time of flight*, TOF), tj. ono vrijeme za koje čestica prođe kroz uređaj. U odnosu na brzinu čestice, koja ovisi o njenoj masi, analizatori određuju veličinu čestica i ovisno o tome ispisuje se spektar masa. Prema potrebi, analizatori masa mogu cijepati i odabrane čestice propuštene kroz prvi TOF uređaj u kolizijskim ćelijama i određivati im masu propuštanjem kroz drugi TOF uređaj uz ispis spektra MS/MS. Parametri analize peptida ovom tehnikom navedeni su u Tablici 11.

Tablica 11. Parametri analize peptida spektrometrom masa MALDI-TOF/TOF

Tip analize	**MS**	**MS/MS**
Detekcija iona	pozitivna	pozitivna
Zrcalo	reflektron	reflektron
Broj snimaka/spektara	80	120
Raspon masa (Da)	900-4.000	900-4.000
Brzina snimanja (Hz)	200	200
Kolizijski plin	uključen	uključen

3.2.11.6. Obrada podataka – identifikacija proteina

Dobivene spektre masa MS/MS koristila sam za daljnju pretragu spektralne baze podataka *NCBIprot/green plants* pomoću specijaliziranog računalnog programa MASCOT (verzija 2.1., *Matrix Science*, UK). Monoizotopne mase peptida korištene su za MS i MS/MS pretraživanje baze podataka sa slijedećim parametrima pretrage: MS/MS tolerancija mase fragmenta, 0,5 Da; tolerancija mase prekursora, 0,3 Da; maksimalni broj propuštenih cijepanja, 1; i naboj peptida +1. Iz dobivenih spektara MS/MS iščitava se slijed aminokiselina fragmentiranih peptida na temelju razlike u masama između pojedinih signala spektra. Fragmentirane peptide posebni algoritmi računalnog programa (*ProteinPilot™ Software*, SCIEX, SAD) vezanog uz instrument MALDI-TOF/TOF preklapaju i slažu u cjelinu.

Iz iščitanog aminokiselinskog slijeda uz pomoć alata MASCOT se identificira protein kojem pripada ta sekvenca uspoređivanjem izmjerenih masa signala dobivenih spektara (uzoraka) s teorijski izračunatim masama peptida pohranjenim u bazama podataka.

Nadalje, za svaki identificirani protein, tj. pronađeni homologni protein iz druge biljne vrste, pronašla sam pretragom baze podataka *UniProt* biološke procese u kojima protein sudjeluje. Proteine sam zatim kategorizirala prema zajedničkim biološkim procesima.

4. REZULTATI

4.1. Koncentracija srebra u biljnom tkivu

Koncentracije Ag koje su akumulirali klijanci te listovi i korijenje odraslih biljaka duhana nakon tretmana s AgNP i $AgNO_3$ prikazane su u Tablici 12., a izražene su u $\mu g\ g^{-1}$ suhe tvari. U kontrolnim tkivima klijanaca, korijenja i listova odraslih biljaka sadržaj Ag bio je ispod razine detekcije instrumenta (< 0,0001 $\mu g\ g^{-1}$ suhe tvari).

4.1.1. Klijanci

Klijanci su akumulirali Ag već pri najnižim koncentracijama AgNP, a koncentracija Ag rasla je s povećanjem koncentracije AgNP u podlogama. Najveća koncentracija Ag izmjerena je u klijancima koji su tretirani najvišom koncentracijom AgNP (500 μM), a bila je 33,7% veća od koncentracije Ag izmjerene nakon tretmana s najnižom koncentracijom (25 μM). Tretmani sa 50, 75, 100 i 500 μM AgNP nisu pokazali međusobno statistički značajnu razliku u koncentraciji Ag, ali su svi rezultirali značajno većom akumulacijom Ag u odnosu na tretman sa 25 μM AgNP (Tablica 12.).

Što se tiče tretmana s $AgNO_3$, najveća koncentracija Ag izmjerena je također nakon tretmana s koncentracijom od 500 μM (44,3% veća u odnosu na tretman s najnižom koncentracijom) i bila je statistički značajno veća u odnosu na ostale tretmane. Među koncentracijama Ag izmjerenim nakon tretmana s 50, 75 i 100 μM $AgNO_3$ nije bilo statistički značajne razlike, ali su ovi tretmani pokazali značajno veću akumulaciju Ag u odnosu na tretman s 25 μM $AgNO_3$.

Usporedba tretmana sa AgNP i $AgNO_3$, pokazala je da između koncentracija od 25, 50, 75 i 100 μM nije bilo statistički značajne razlike u koncentraciji Ag, za razliku od tretmana s 500 μM $AgNO_3$ u kojem je akumulacija Ag bila značajno veća u odnosu na tretman s 500 μM AgNP.

Tablica 12. Koncentracije Ag izmjerene u klijancima te korijenu i listu odraslih biljaka duhana. Prikazani rezultati predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Vrijednosti označene različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). Vrijednost < 0,0001 µg g^{-1} predstavlja granicu kvantifikacije instrumenta

Tretman		Koncentracija Ag (µg g^{-1} suhe tvari)		
		KLIJANCI	ODRASLE BILJKE	
			KORIJEN	LIST
	Kontrola	<0,0001[a]	< 0,0001[a]	< 0,0001[a]
AgNP (µM)	25	229,3 ± 62,8[b]	1247,4 ± 122,0[b]	12,1 ± 2,6[b]
	50	297,5 ± 41,0[c]	1395,2 ± 351,5[b]	13,9 ± 2,6[b]
	75	298,2 ± 24,5[c]	1712,1 ± 80,8[bc]	19,0 ± 1,0[b]
	100	315,4 ± 28,3[c]	1742,2 ± 192,8[bc]	36,3 ± 3,4[c]
	500	345,4 ± 41,7[c]	2480,1 ± 141,9[d]	79,2 ± 5,2[d]
$AgNO_3$ (µM)	25	269,3 ± 32,9[b]	1121,5 ± 136,2[b]	18,2 ± 4,0[b]
	50	332,2 ± 45,3[c]	1450,9 ± 436,2[b]	21,4 ± 7,3[b]
	75	335,0 ± 37,2[c]	1741,7 ± 134,5[bc]	23,0 ± 4,1[b]
	100	374,0 ± 22,4[c]	1747,4 ± 150,0[bc]	38,3 ± 5,4[c]
	500	484,0 ± 21,9[d]	2399,1 ± 310,6[cd]	82,2 ± 3,9[d]

4.1.2. Odrasle biljke

U korijenju odraslih biljaka koncentracije akumuliranog Ag bile su višestruko veće u odnosu na koncentracije Ag izmjerene u klijancima i listovima. Naime, u odnosu na koncentraciju Ag akumuliranog u korijenu, vrijednosti izmjerene u listu bile su nakon tretmana s AgNP manje za 30 do 100 puta, a nakon izlaganja biljke tretmanu s $AgNO_3$ manje za 30 do 70 puta (Tablica 12.). Nadalje, usporedbom rezultata dobivenih analizom akumuliranog Ag u klijancima i korijenu vidljivo je da su klijanci nakon tretmana s AgNP akumulirali 5 do 7 puta manje Ag, a nakon tretmana s $AgNO_3$ 4 do 5 puta manje Ag. Najveća vrijednost izmjerena je nakon tretmana s najvećom koncentracijom AgNP (500 µM) i u odnosu na tretman s najnižom koncentracijom od 25 µM AgNP rezultirala je povećanjem koncentracije Ag od 49,7 %. Koncentracije akumuliranog Ag izmjerene nakon tretmana s 25, 50, 75 i 100 µM AgNP nisu se međusobno statistički značajno razlikovale, ali su bile značajno snižene u odnosu na tretman s 500 µM AgNP.

Kao i u tretmanima s AgNP, najveća koncentracija Ag u korijenu duhana izmjerena je nakon tretmana biljaka s najvišom koncentracijom $AgNO_3$ (500 µM), a bila je statistički

značajno povećana u odnosu na koncentraciju Ag izmjerenu nakon izlaganja biljaka 25 i 50 μM $AgNO_3$. Tretmani sa 75 i 100 μM nisu pokazali statistički značajnu razliku u akumulaciji Ag u odnosu na tretmane s ostalim ispitanim koncentracijama $AgNO_3$.

Uspoređujući akumulaciju Ag u korijenju biljaka nakon tretmana s AgNP i $AgNO_3$, uočila sam da nema statistički značajne razlike između tretmana istih koncentracija.

Koncentracije Ag izmjerene u listovima odraslih biljaka rasle su s porastom primjenjenih koncentracija AgNP i $AgNO_3$. Nakon oba tipa tretmana, najveća koncentracija Ag u listovima izmjerena je nakon izlaganja biljaka 500 μM AgNP i $AgNO_3$, i bila je statistički značajno veća u odnosu na koncentracije Ag izmjerene u svim ostalim tretmanima. Izlaganje biljaka tretmanima sa 100 μM AgNP i $AgNO_3$ rezultiralo je akumulacijom srebra, koja je bila statistički značajno veća u odnosu na tretmane s 25, 50 i 75 μM koji se međusobno nisu značajno razlikovali.

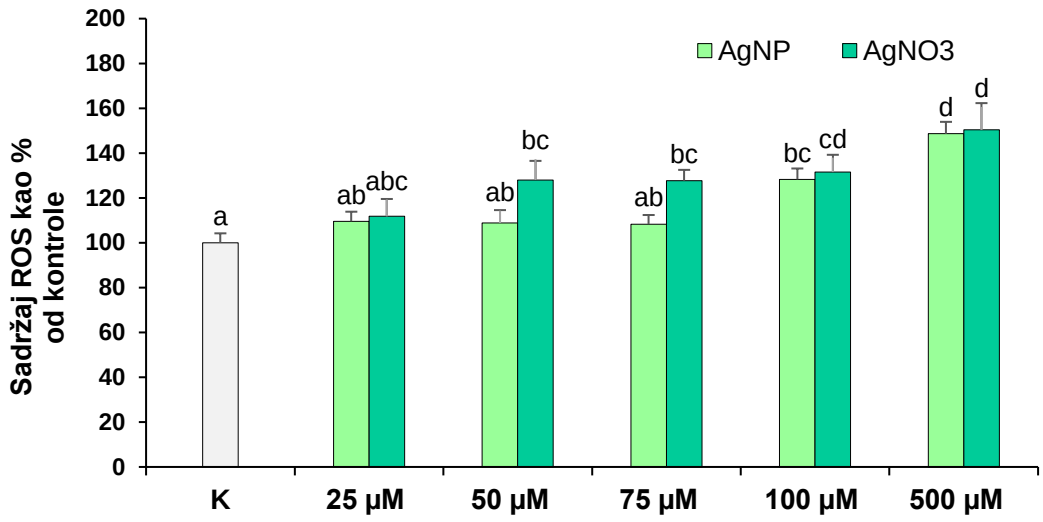
4.2. Parametri oksidacijskog stresa

4.2.1 Razina reaktivnih kisikovih spojeva

Reakcija ROS s dehidroetidijem omogućila je direktno utvrđivanje razine ROS, odnosno razine oksidacijskog stresa u klijancima te u korijenju i listovima duhana koji su bili izloženi tretmanima sa AgNP i $AgNO_3$.

4.2.1.1 Klijanci

Statistički značajan porast sadržaja ROS u odnosu na kontrolu zabilježen je pri tretmanima od 100 i 500 μM AgNP, dok su tretmani sa $AgNO_3$ pokazali značajno povećanje već od koncentracije od 50 μM (Slika 10.). Najveće vrijednosti izmjerene su nakon tretmana sa 500 μM AgNP i $AgNO_3$. Između tretmana sa istim koncentracijama AgNP i $AgNO_3$ nije bilo statistički značajne razlike (Slika 10.). Primjeri analiziranih fotografija pri određivanju sadržaja ROS u stanicama klijanaca duhana prikazani su u Prilogu 1. (AgNP) i u Prilogu 2. ($AgNO_3$).

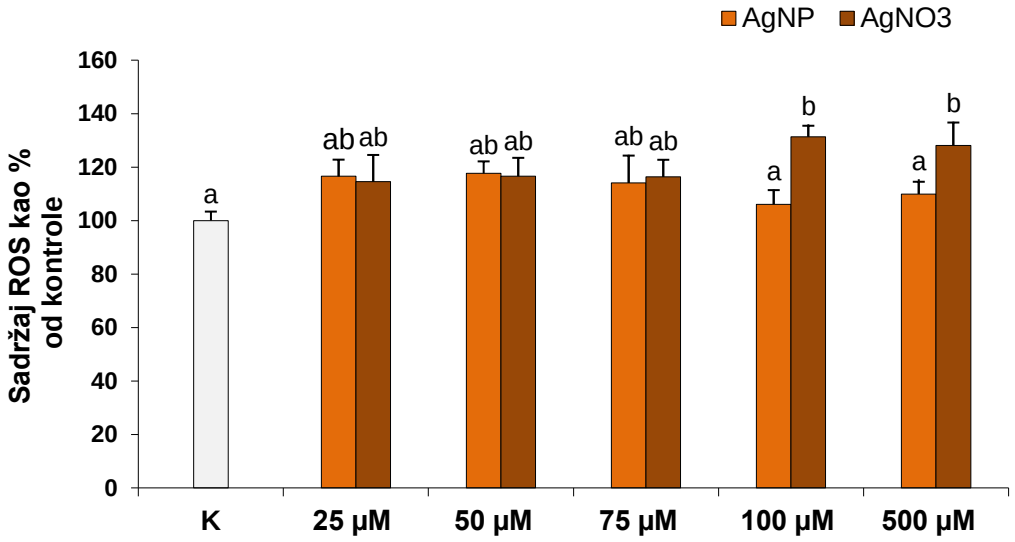


Slika 10. Sadržaj ROS u klijancima duhana koji su rasli 30 dana na podlogama s dodatkom AgNP i $AgNO_3$. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju relativan intenzitet u odnosu na kontrolu koja je izražena kao 100%, a dobiveni su kao srednje vrijednosti intenziteta fluorescencije izmjerenog u 100 stanica ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

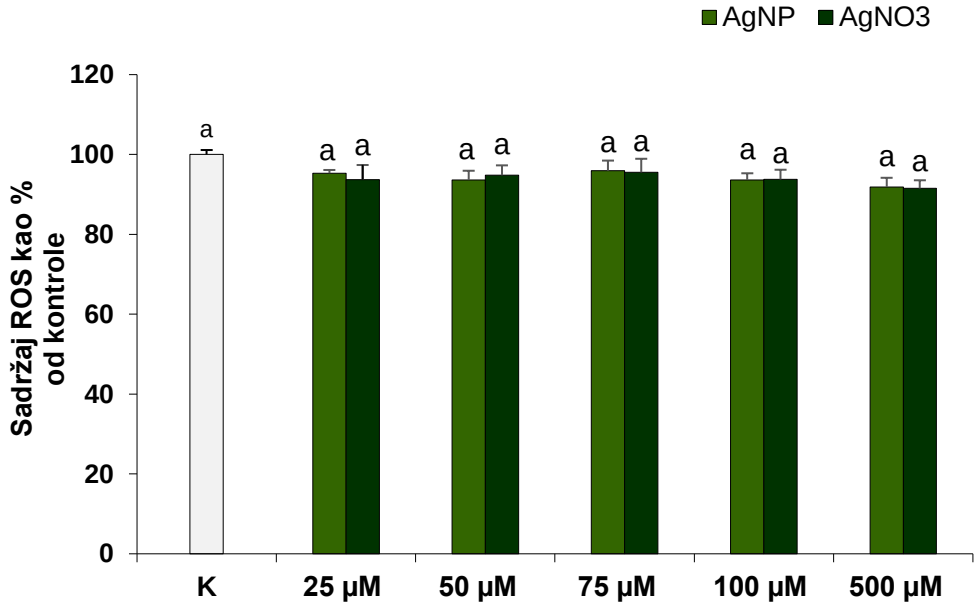
4.2.1.2 Odrasle biljke

I u korijenu te u listu odraslih biljaka utvrđena je prisutnost ROS. Korijenje biljaka nije pokazalo statistički značajnu razliku u sadržaju ROS u odnosu na kontrolu niti na jednoj ispitanoj koncentraciji AgNP. S druge strane, 100 i 500 µM $AgNO_3$ pokazali su značajno veće vrijednosti u odnosu na kontrolu i odgovarajuće koncentracije AgNP (Slika 11.). Primjeri analiziranih fotografija pri određivanju sadržaja ROS u stanicama korijena duhana prikazani su u Prilogu 3. (AgNP) i u Prilogu 4. ($AgNO_3$).

Vrijednosti sadržaja ROS u listovima biljaka duhana nisu se pokazale statistički značajno različite od kontrole nakon tretmana na svim ispitanim koncentracijama AgNP i AgNO3 (Slika 12.). Primjeri analiziranih fotografija pri određivanju sadržaja ROS u stanicama lista duhana prikazani su u Prilogu 5. (AgNP) i u Prilogu 6. ($AgNO_3$).



Slika 11. Sadržaj ROS u korijenu odraslih biljaka duhana. Biljke su tretirane sedam dana u vodenim otopinama AgNP i $AgNO_3$. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju relativan intenzitet u odnosu na kontrolu koja je izražena kao 100%, a dobivene su kao srednje vrijednosti intenziteta fluorescencije izmjerenog u 100 stanica ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.



Slika 12. Sadržaj ROS u listovima odraslih duhana. Biljke su tretirane sedam dana u vodenim otopinama AgNP i $AgNO_3$. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju relativan intenzitet u odnosu na kontrolu koja je izražena kao 100%, a dobivene su kao srednje vrijednosti intenziteta fluorescencije izmjerenog u 100 stanica ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

4.2.2. Razina lipidne peroksidacije – sadržaj malondialdehida

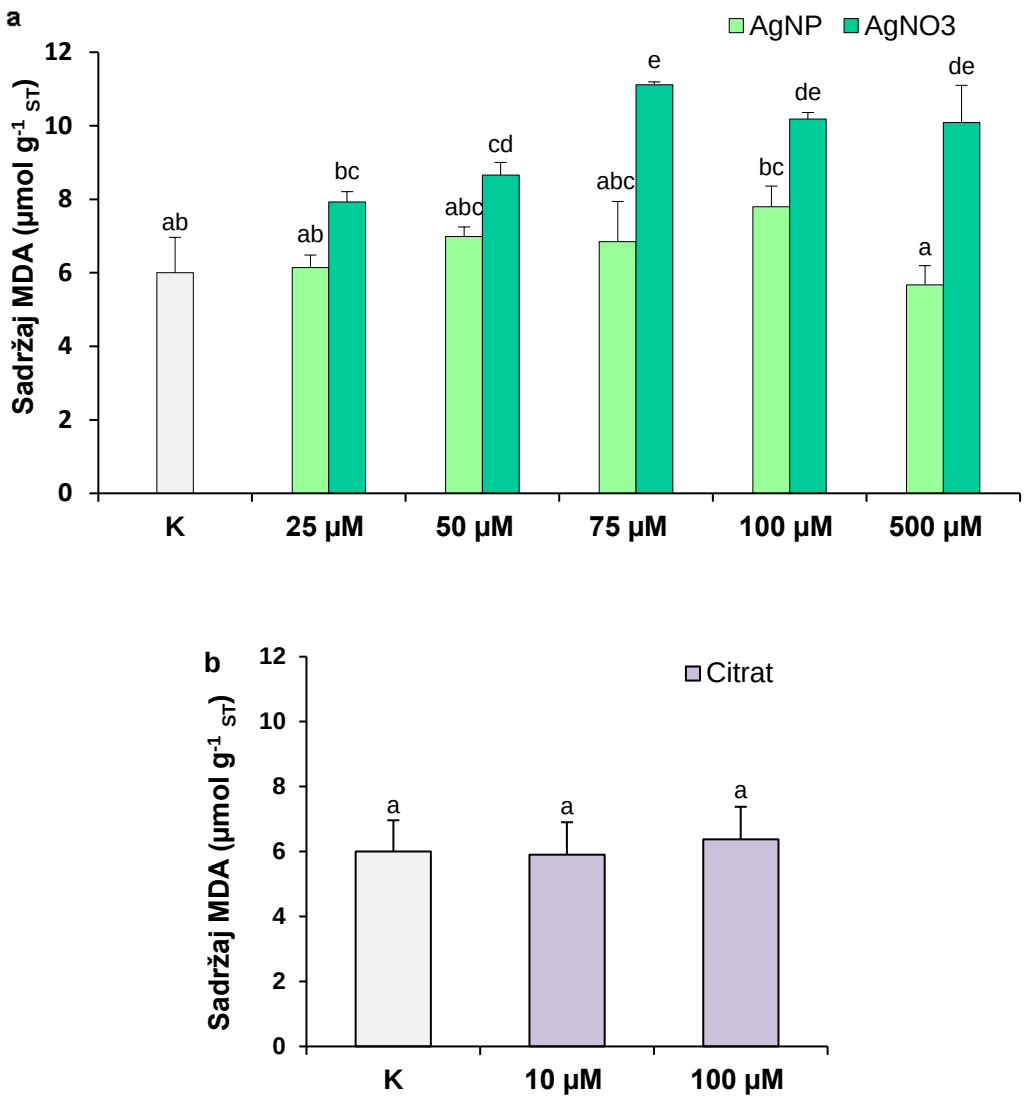
Lipidna peroksidacija procijenjena je određivanjem sadržaja malondialdehida (MDA) u klijancima te korijenju i listovima odraslih biljaka duhana koje su bile izložene tretmanima sa AgNP i $AgNO_3$. Sadržaj MDA određen je i u klijancima i korijenju odraslih biljaka nakon tretmana sa 10 μM i 100 μM citrata.

4.2.2.1. Klijanci

Niti jedan od ispitanih tretmana s AgNP nije pokazao statistički značajnu razliku u sadržaju MDA u odnosu na kontrolu, dok su tretmani s $AgNO_3$ izazvali značajno povećanje već pri koncentraciji od 50 μM. Značajno najveća vrijednost izmjerena je pri tretmanu od 75 μM $AgNO_3$, a tretmani sa 100 i 500 μM rezultirali su nešto nižim sadržajem MDA, koji je ipak bio statistički značajno veći od vrijednosti dobivenih u tretmanima sa 25 i 50 μM $AgNO_3$ (Slika 13a.).

Ukoliko se usporede vrijednosti sadržaja MDA nakon tretmana klijanaca s AgNP i $AgNO_3$, može se zaključiti da navedeni tretmani pokazuju međusobnu statistički značajnu razliku pri višim koncentracijama od 75, 100 i 500 μM, pri čemu je tretman s $AgNO_3$ izazvao značajno više vrijednosti sadržaja MDA (Slika 13a.).

Nakon tretmana klijanaca sa 10 i 100 μM citratom nije zabilježena statistički značajna promjena u sadržaju MDA u usporedbi s kontrolom (Slika 13b.).



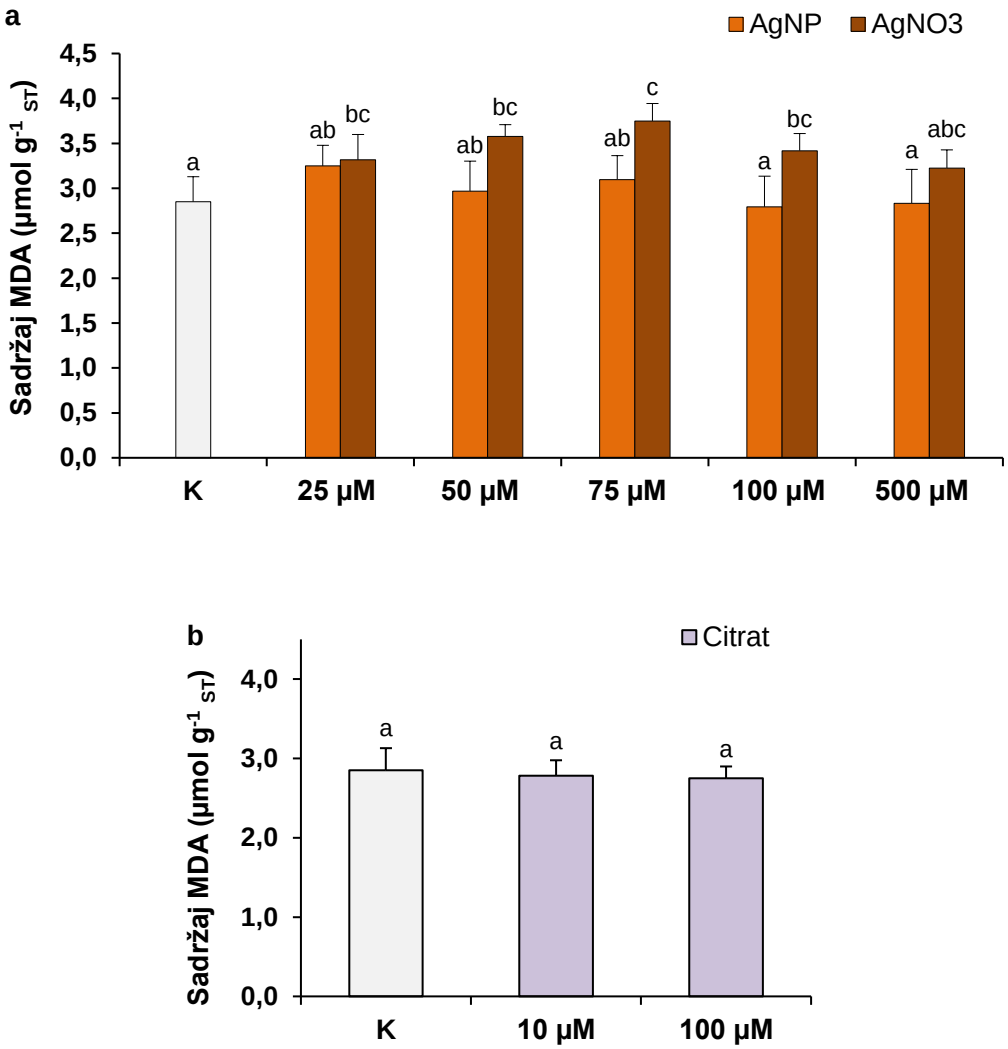
Slika 13. Sadržaj MDA u klijancima duhana koji su rasli 30 dana na podlogama s dodatkom a) AgNP i $AgNO_3$, te b) citrata. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola, ST – svježe tkivo.

4.2.2.2. Odrasle biljke

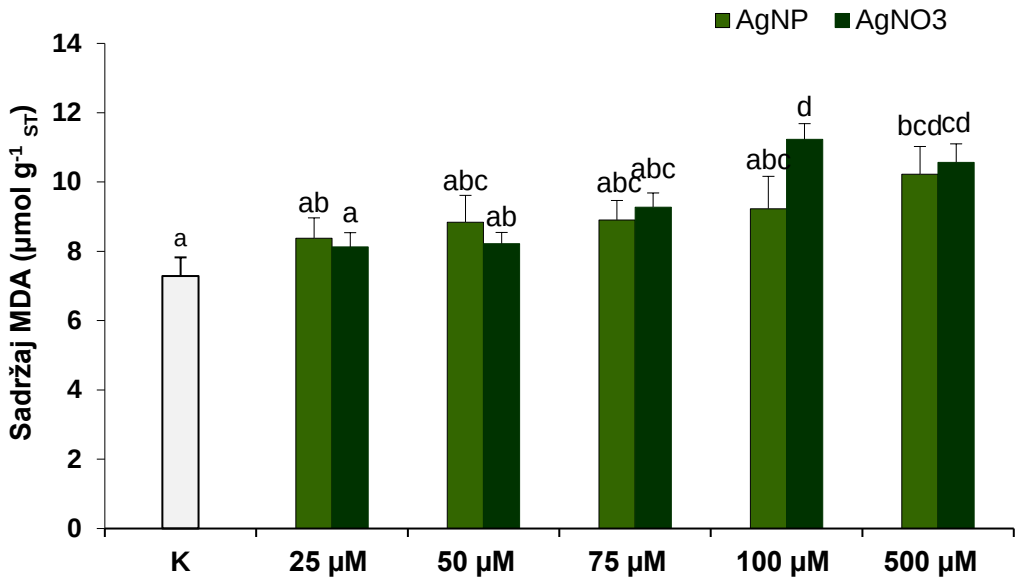
U tkivu korijenja nakon tretmana s AgNP nije zabilježena statistički značajna promjena sadržaja MDA niti sa jednom ispitanom koncentracijom u odnosu na kontrolu (Slika 14a.). Značajan porast razine lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu uočen je nakon svih tretmana s $AgNO_3$, osim nakon tretmana s najvišom koncentracijom od 500 µM $AgNO_3$ (Slika 14a.). Usporedba vrijednosti sadržaja MDA dobivenih nakon tretmana sa AgNP i $AgNO_3$ pokazala je značajno povećanje u tretmanima sa 75 i 100 µM $AgNO_3$ u odnosu na iste koncentracije AgNP (Slika 14a.).

Statistički značajan porast sadržaja MDA u tkivu lista izmjeren je samo nakon tretmana s najvišom koncentracijom AgNP u odnosu na kontrolu, dok su u tretmanima s $AgNO_3$ značajno povećanje pokazale koncentracije od 100 i 500 µM (Slika 15a). Usporedba sadržaja MDA izmjerenih pri istim koncentracijama AgNP i $AgNO_3$ pokazala je statisitčki značajno povećan sadržaj MDA u tretmanu sa 100 µM $AgNO_3$ u odnosu na AgNP (Slika 15a).

Sadržaj MDA u korijenju odraslih biljaka koje su bile tretirane sa 10 i 100 µM citrata nije pokazao statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (Slika 14b.).



Slika 14. Sadržaj MDA u korijenu odraslih biljaka duhana. Biljke su tretirane sedam dana u vodenim otopinama a) AgNP i $AgNO_3$, te b) citrata. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola, ST – svježe tkivo.



Slika 15. Sadržaj MDA u listu odraslih biljaka duhana. Biljke su tretirane sedam dana u vodenim otopinama AgNP i $AgNO_3$. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola, ST – svježe tkivo.

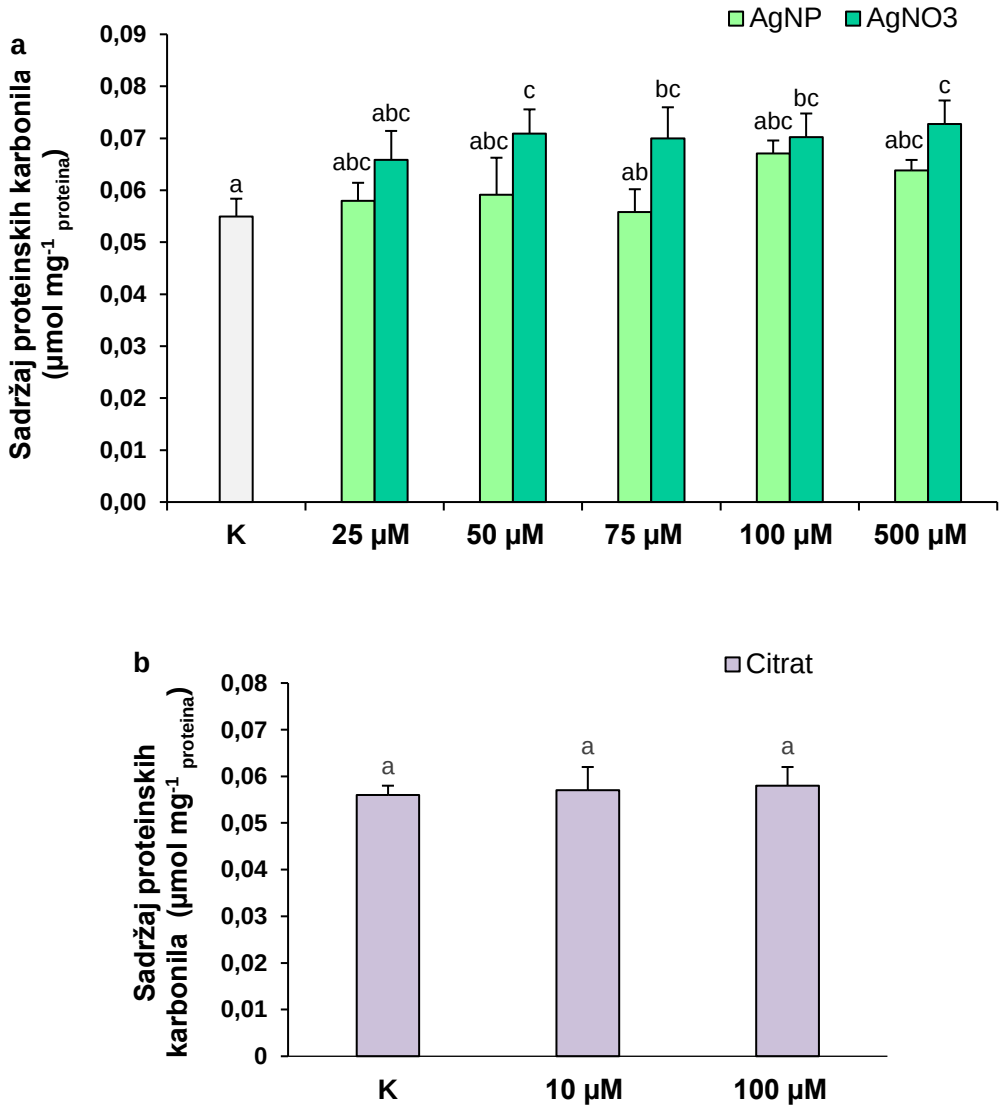
4.2.3. Sadržaj proteinskih karbonila

Sadržaj proteinskih karbonila izmjeren je s ciljem određivanja razine oksidacije proteina, odnosno stupnja njihovog oštećenja, nakon tretmana s AgNP i $AgNO_3$ u klijancima te korijenu i listovima odraslih biljaka duhana.

4.2.3.1. Klijanci

U tretmanima s AgNP nije zabilježena statistički značajna promjena u sadržaju proteinskih karbonila u odnosu na kontrolu (Slika 16a.). U klijancima koji su rasli na podlogama s $AgNO_3$, statistički značajan porast razine proteinskih karbonila u odnosu na kontrolu zabilježen je nakon tretmana s 50, 75, 100 i 500 µM $AgNO_3$. Sadržaji proteinskih karbonila u tretmanima s $AgNO_3$ nisu se međusobno statistički značajno razlikovali (Slika 16a.). Usporedbom rezultata dobivenih nakon tretmana s AgNP i $AgNO_3$ vidljivo je kako između istih koncentracija nema statistički značajne razlike, iako su klijanci rasli na podlogama s $AgNO_3$ pokazali veće vrijednosti u odnosu na AgNP (Slika 16a.).

Nakon tretmana klijanaca sa 10 i 100 µM citratom nije zabilježena statistički značajna promjena u sadržaju proteinskih karbonila u usporedbi s kontrolom (Slika 16b.).

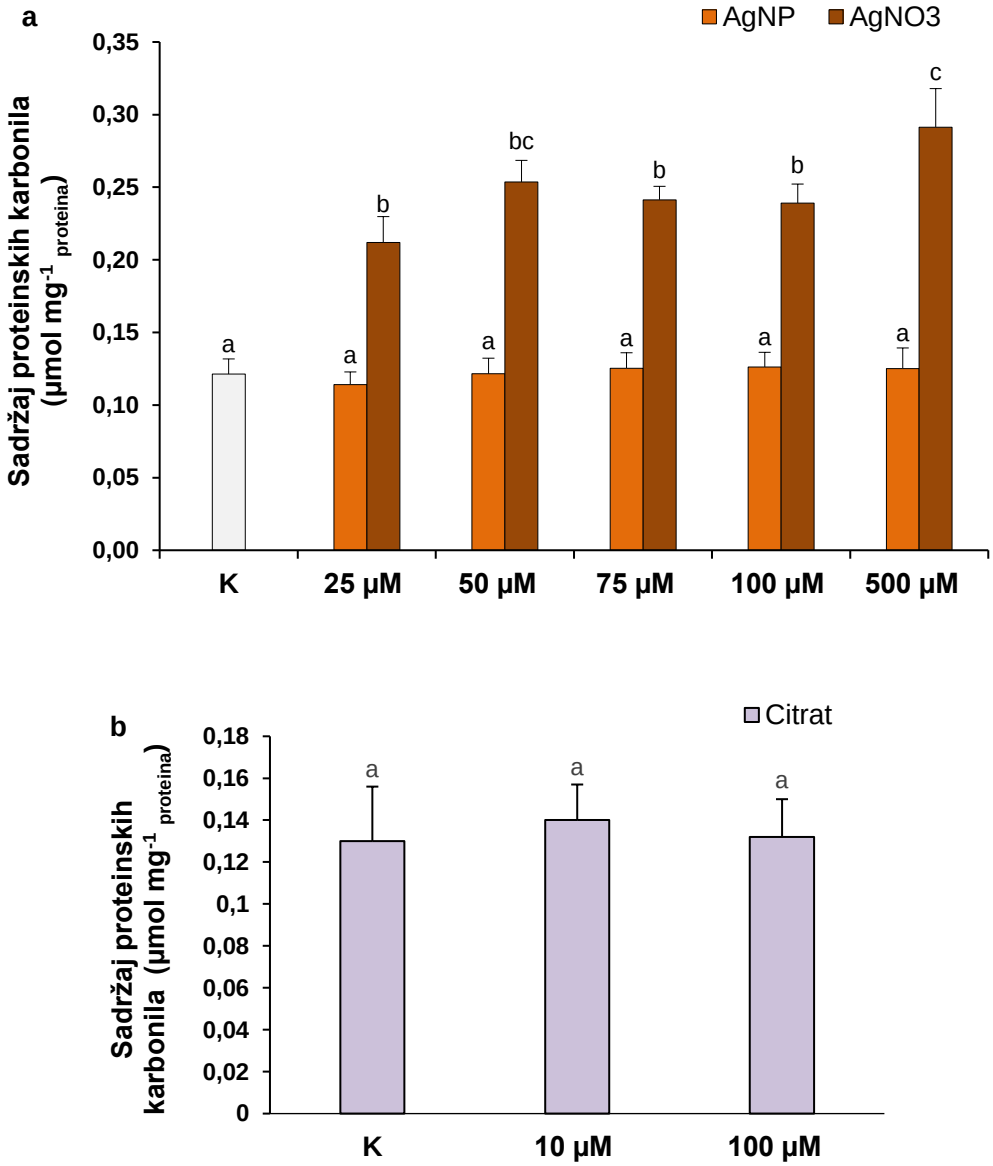


Slika 16. Sadržaj proteinskih karbonila u klijancima duhana koji su rasli 30 dana na podlogama s dodatkom a) AgNP i $AgNO_3$, te b) citrata. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

4.2.3.2. Odrasle biljke

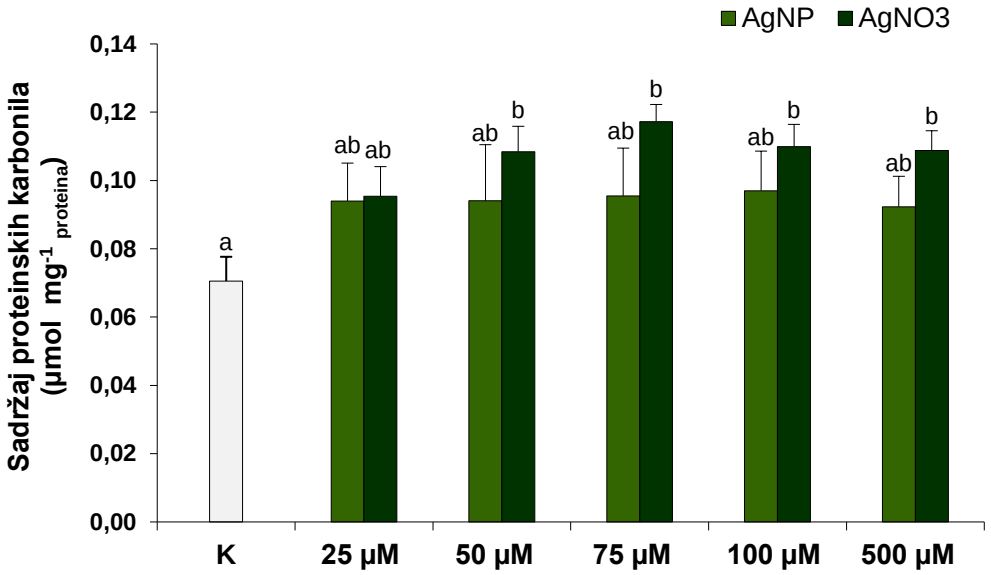
Tretmani s ispitanim koncentracijama AgNP nisu povećali sadržaj proteinskih karbonila u korijenu u odnosu na kontrolu (Slika 17a.). Nasuprot tome, sadržaj proteinskih karbonila statistički je značajno porastao u odnosu na kontrolu već nakon tretmana s najnižom koncentracijom $AgNO_3$, dok je najveća vrijednost zabilježena nakon izlaganja najvećoj koncentraciji od 500 µM $AgNO_3$ (Slika 17a.). Usporedba izmjerenih vrijednosti u tretmanima s AgNP i $AgNO_3$ pokazala je značajno povećanje sadržaja proteinskih karbonila u svim tremanima s $AgNO_3$ u odnosu na iste koncentracije AgNP (Slika 17a.).

Sadržaj proteinskih karbonila u korijenju odraslih biljaka koje su bile tretirane sa 10 i 100 µM citrata nije pokazao statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (Slika 17b.).



Slika 17. Sadržaj proteinskih karbonila u korijenu odraslih biljaka duhana. Biljke su tretirane sedam dana u vodenim otopinama a) AgNP i $AgNO_3$, te b) citrata. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

U tkivu lista nije uočena statistički značajna promjena sadržaja proteinskih karbonila u odnosu na kontrolu nakon izlaganja tretmanima s AgNP (Slika 18.). Međutim, porast vrijednosti zabilježen je u svim tretmanima s $AgNO_3$, izuzev tretmana s najnižom koncentracijom od 25 µM (Slika 18.). Izmjerene vrijednosti sadržaja proteinskih karbonila u listu nisu pokazale statistički značajne razlike između AgNP i $AgNO_3$ tretmana istih koncentracija (Slika 18.).



Slika 18. Sadržaj proteinskih karbonila u listu odraslih biljaka duhana. Biljke su tretirane sedam dana u vodenim otopinama AgNP i $AgNO_3$. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola, ST – svježe tkivo.

4.2.4. Oštećenje molekule DNA

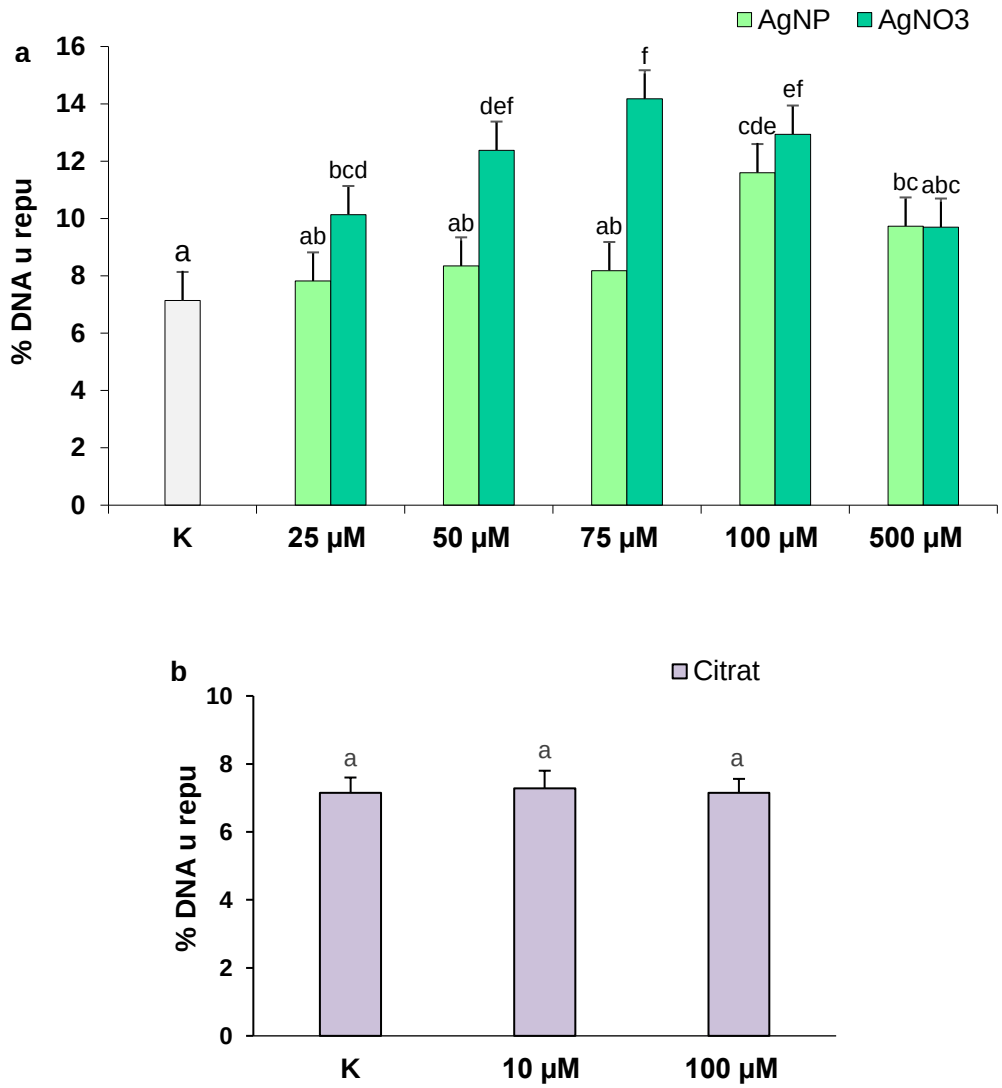
Mjerenja postotka DNA u repu provedena su s ciljem određivanja razine oštećenja molekule DNA, kao posljedice oksidacijskog stresa, nakon tretmana s AgNP i $AgNO_3$.

4.2.4.1. Klijanci

Između ispitanih koncentracija AgNP, dvije najveće (100 i 500 µM) izazvale su statistički značajno povećanje oštećenja DNA u odnosu na kontrolu, pri čemu je najveća vrijednost izmjerena nakon tretmana sa 100 µM AgNP (Slika 19a.). Klijanci tretirani sa $AgNO_3$ pokazali su statistički značajno povećane vrijednosti na svim primijenjenim koncentracijama. Najveće oštećenje DNA zabilježeno je nakon djelovanja 75 µM $AgNO_3$, nakon čega su se

vrijednosti postupno smanjivale na tretmanima sa 100 i 500 µM $AgNO_3$ (Slika 19a.). Usporedba tretmana s AgNP i $AgNO_3$ pokazala je značajno povećanje oštećenja DNA pri 50 i 75 µM $AgNO_3$ u odnosu na iste koncentracije AgNP (Slika 19a.).

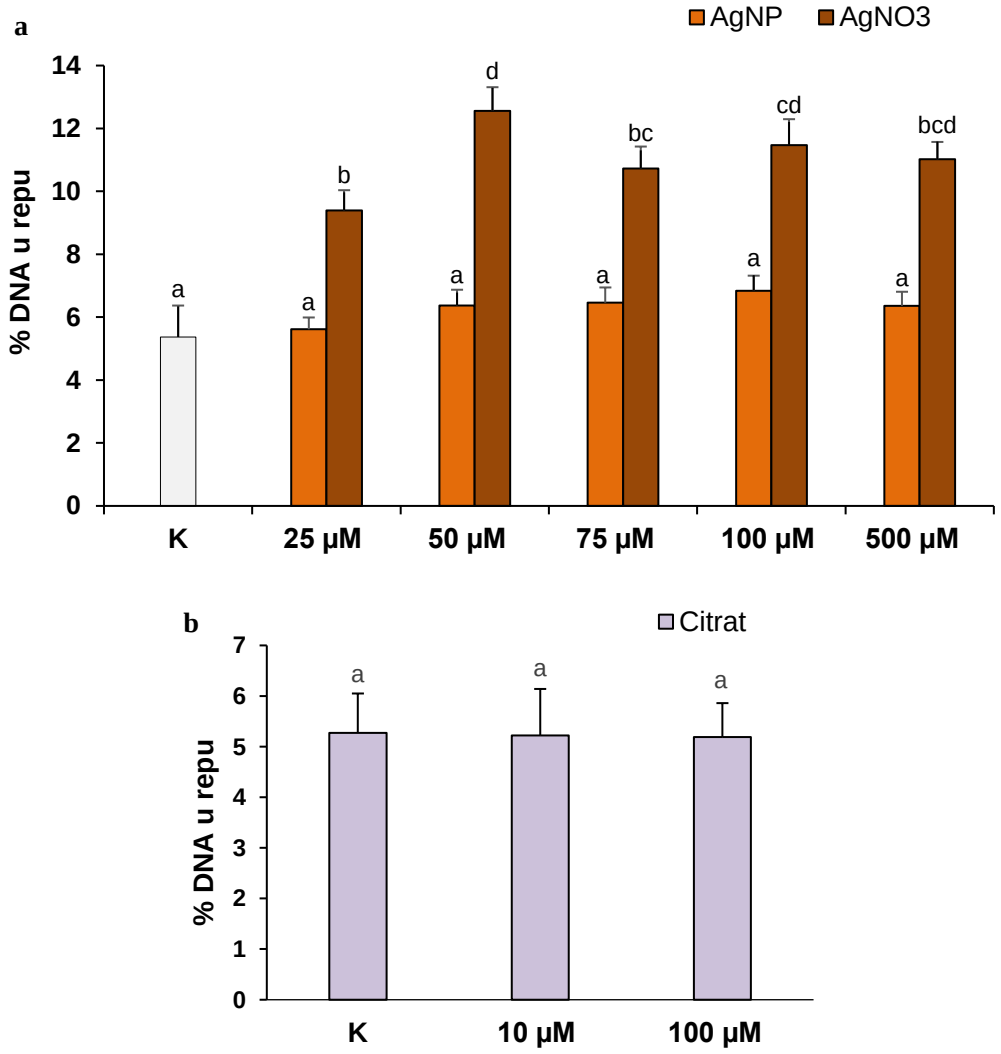
Nakon tretmana klijanaca sa 10 i 100 µM citratom nije zabilježena statistički značajna promjena postotku DNA u repu u usporedbi s kontrolom (Slika 19b.).



Slika 19. Postotak DNA u repu u klijancima duhana koji su rasli 30 dana na podlogama s dodatkom a) AgNP i $AgNO_3$, te b) citrata. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

4.2.4.2. Odrasle biljke

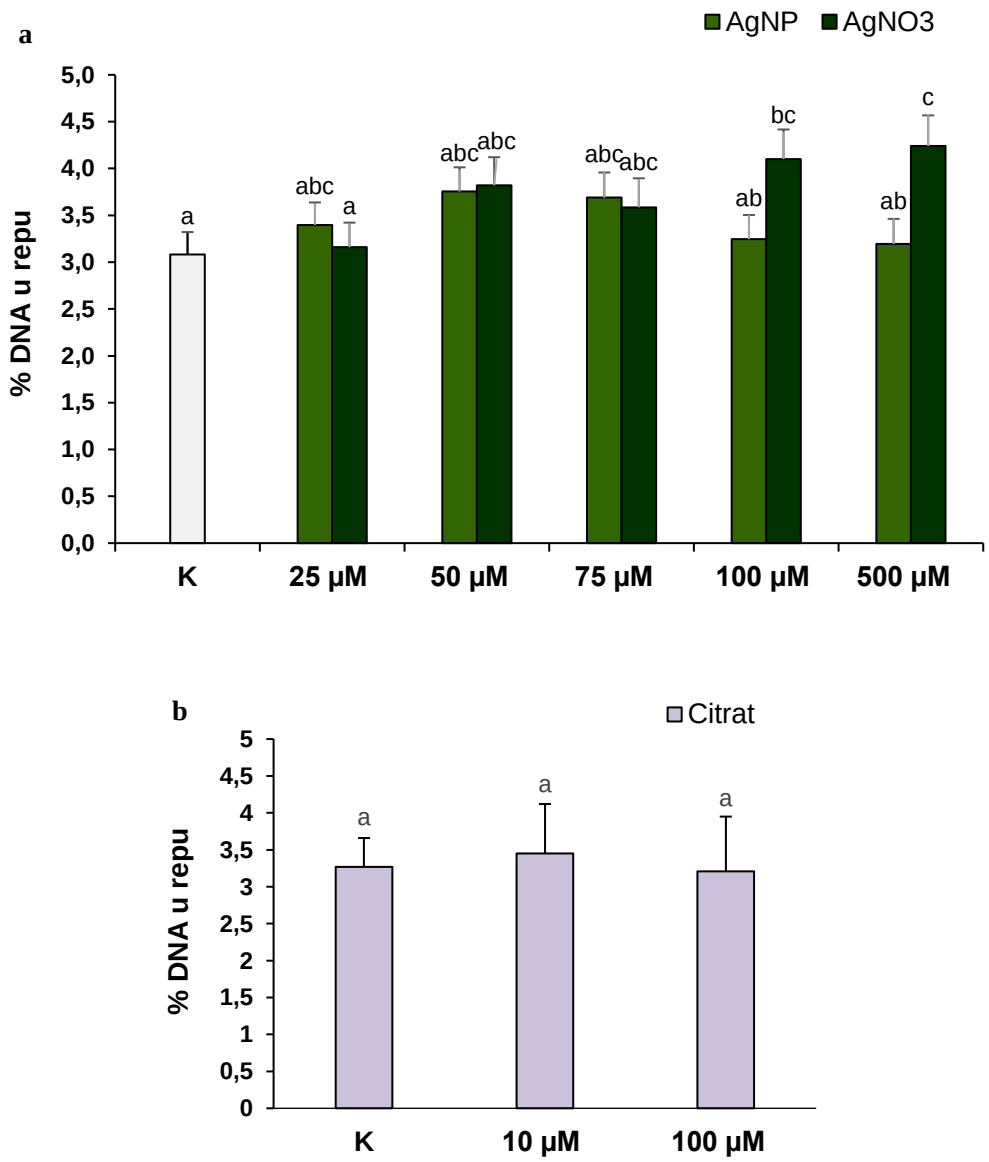
Niti jedna od ispitanih koncentracija AgNP nije izazvala statistički značajnu promjenu % DNA u repu u korijenu odraslih biljaka u odnosu na kontrolu (Slika 20a.). Tretmani sa $AgNO_3$ uzrokovali su značajan porast vrijednosti pri svim koncentracijama, a najveća vrijednost izmjerena je nakon tretmana s 50 µM $AgNO_3$ (Slika 20a.). Svi tretmani sa $AgNO_3$ pokazali su statistički značajno povećanje oštećenja DNA u odnosu na tretmane s istim koncentracijama AgNP (Slika 20a.). Oštećenje molekule DNA u korijenju tretiranih sa 10 i 100 µM citrata nije pokazao statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (Slika 20b.).



Slika 20. Postotak DNA u repu u korijenu odraslih biljaka duhana. Biljke su tretirane sedam dana u vodenim otopinama a) AgNP i $AgNO_3$, te b) citrata. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

Rezultati mjerenja oštećenja DNA u listu pokazali su da niti jedan tretman sa AgNP nije izazvao statistički značajne promjene u odnosu na kontrolu (Slika 21a.). Statistički značajno povećanje vrijednosti u odnosu na kontrolu, ali i na tretman s AgNP zabilježeno je samo nakon tretmana sa 100 i 500 µM $AgNO_3$ (Slika 21a.).

Postotak DNA u repu u listu odraslih biljaka koje su bile tretirane sa 10 i 100 µM citratom nije pokazao statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu (Slika 21b.).



Slika 21. Postotak DNA u repu u listu odraslih biljaka duhana. Biljke su tretirane sedam dana u vodenim otopinama a) AgNP i $AgNO_3$, te b) citrata. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

4.3. Aktivnost antioksidacijskog sustava

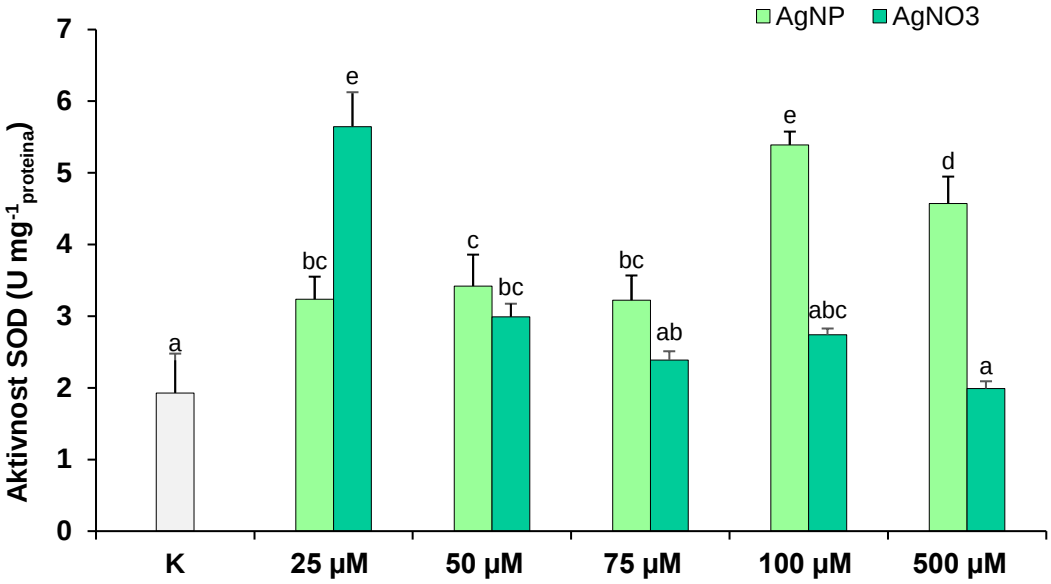
Aktivnost antioksidacijskog sustava duhana procijenila sam spektrofotometrijskim mjerenjem aktivnosti enzima superoksid dismutaze (SOD), pirogalol peroksidaze (PPX), askorbat peroksidaze (APX) i katalaze (CAT) u klijancima te korijenju i listovima odraslih biljaka duhana nakon tretmana sa AgNP i $AgNO_3$ te u klijancima i korijenju odraslih biljaka nakon izlaganja citratu. Također aktivnost ovih enzima sam utvrdila i određivanjem sastava njihovih izoformi.

4.3.1. Aktivnost superoksid dismutaze

4.3.1.1. Klijanci

Aktivnost SOD statistički se značajno povećala nakon svih primjenjenih koncentracija AgNP u odnosu na kontrolu, a najveći porast zabilježen je nakon tretmana sa 100 i 500 μM AgNP (Slika 22.). U klijancima koji su tretirani sa $AgNO_3$ statistički značajno povećanje aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu utvrđeno je samo pri 25 i 50 μM $AgNO_3$; najveća aktivnost izmjerena je pri 25 μM, a s porastom koncentracije $AgNO_3$ vrijednosti su se smanjile (Slika 22.).

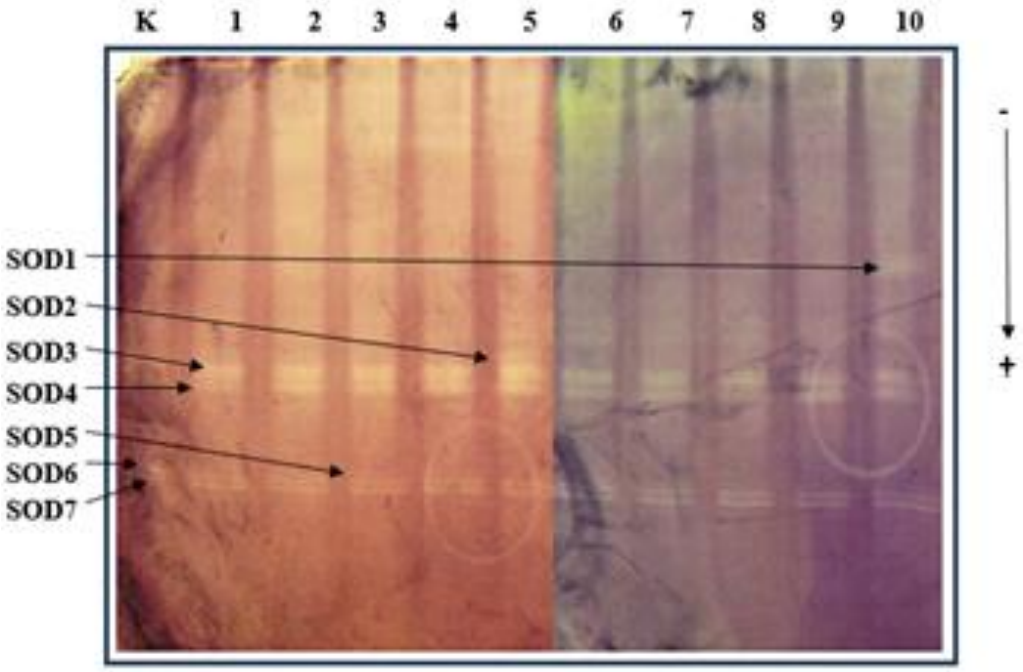
Usporedba aktivnosti izmjerenih nakon tretmana sa AgNP i $AgNO_3$ pokazala je statistički značajne razlike na koncentracijama od 25, 100 i 500 μM. Naime, na koncentraciji od 25 μM, tretman sa $AgNO_3$ rezultirao je statistički značajno većom aktivnošću SOD u odnosu na tretman sa AgNP, dok je na koncentracijama od 100 i 500 μM značajno veća vrijednost zabilježena nakon tretmana sa AgNP (Slika 22.).



Slika 22. Aktivnost SOD u klijancima duhana koji su rasli 30 dana na podlogama s dodatkom AgNP i $AgNO_3$. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

Sastav izoenzima SOD prikazana je na Slici 23. Ne gelu je razdvojeno sedam izoformi, koje su prema rastućoj pokretljivosti označene kao SOD1 – SOD7. Intenzitet vrpci pojedine izoforme nije bio jednakog intenziteta u svakome od uzoraka. Vrpca SOD1 bila je karakteristična samo za klijance koji su rasli na podlozi s najvišom koncentracijom $AgNO_3$, dok je vrpca SOD2 bila slabog intenziteta u svim tretmanima osim pri 500 µM AgNP. Izoforma SOD3 bila je jače izražena u tretiranim klijancima nego u kontroli, a intenzitet vrpce bio je slabiji nakon tretmana s $AgNO_3$ nego s AgNP. Vrpca SOD4 nije bila prisutna u kontroli, ali je uočena u svim tretiranim klijancima; intenzitet vrpce postupno se pojačavao porastom koncentracije AgNP, dok je pri svim koncentracijama $AgNO_3$ bila ujednačenog intenziteta. Izoforma SOD5 nije bila vidljiva u kontroli, ali je uočena nakon tretmana sa 75 µM AgNP i svim koncentracijama $AgNO_3$ s jednakim intenzitetom. Izoforme SOD6 i SOD7 bile su prisutne kao vrpce jednakog intenziteta u kontroli i svim tretiranim klijancima.

U kontroli nisu detektirane izoforme SOD1, SOD4 i SOD5. U klijancima tretiranim sa AgNP bile su vidljive sve izoforme osim SOD1, i to s jačim intenzitetom u odnosu na kontrolu. U klijancima tretiranim sa $AgNO_3$ bile su prisutne sve navedene izoforme; vrpce SOD2, SOD3 i SOD4 bile su slabijeg intenziteta u odnosu na tretmane sa AgNP, ali i dalje jače izražene nego u kontroli.

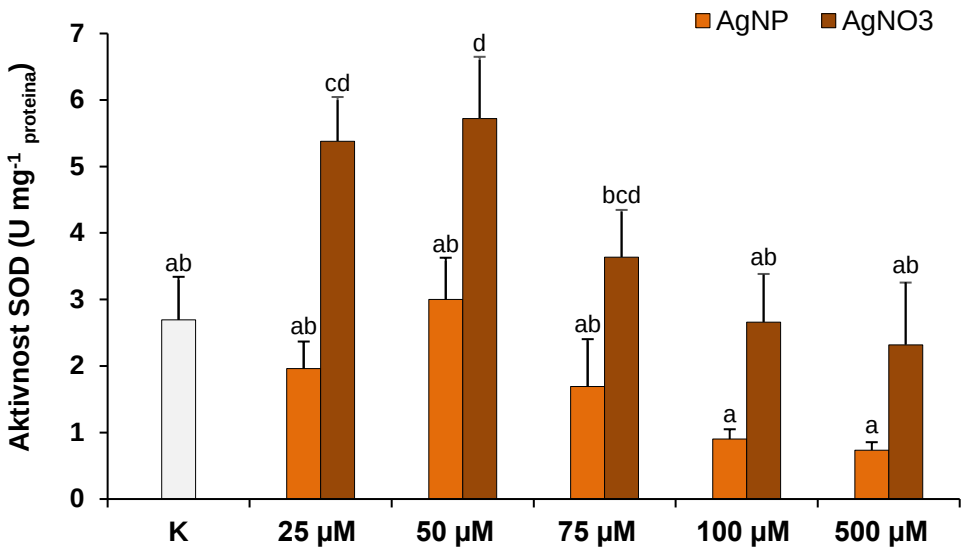


Slika 23. Aktivnost i izoforme SOD u uzorcima klijanaca duhana koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale AgNP i $AgNO_3$, nakon razdvajanja u gelu. K – kontrola, 1 – 25 µM AgNP, 2 – 50 µM AgNP, 3 – 75 µM AgNP, 4 – 100 µM AgNP, 5 – 500 µM AgNP, 6 – 25 µM $AgNO_3$, 7 – 50 µM $AgNO_3$, 8 – 75 µM $AgNO_3$, 9 – 100 µM $AgNO_3$, 10 – 500 µM $AgNO_3$. Strelicama su označene pojedine izoforme enzima.

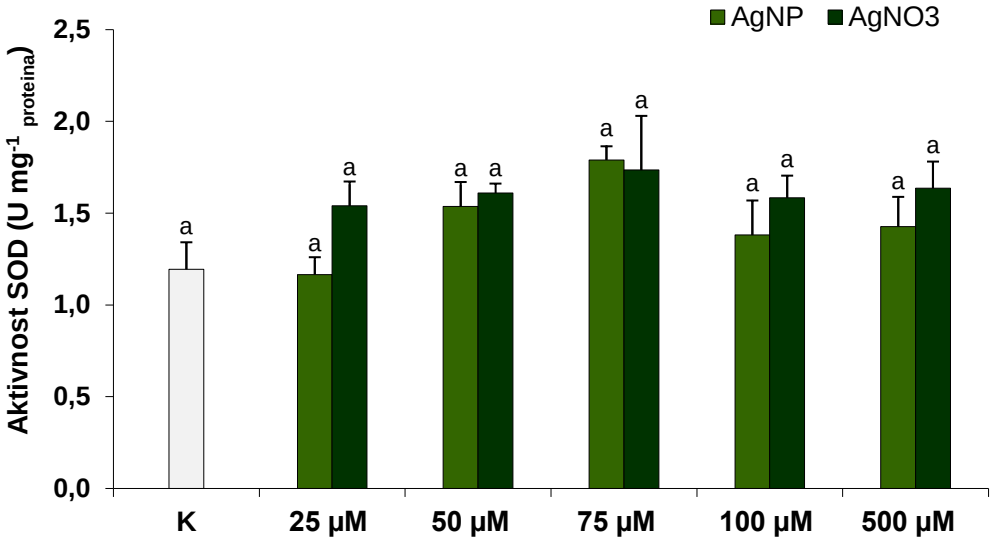
4.3.1.2. Odrasle biljke

Tretmani sa AgNP nisu izazvali statistički značajnu razliku u aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu, iako su pri tretmanu najvećim koncentracijama od 100 i 500 µM izmjerene niže vrijednosti (Slika 24.). Nakon tretmana sa $AgNO_3$, statistički značajno povećanje aktivnosti SOD izmjereno je na nižim koncentracijama (25 i 50 µM) u odnosu na kontrolu (Slika 24.). Na koncentracijama od 25 i 50 µM $AgNO_3$ aktivnost SOD u korijenju odraslih biljaka bila je statistički značajno veća u odnosu na iste koncentracije tretmana sa AgNP (Slika 24.).

Niti jedan od ispitanih tretmana s AgNP i $AgNO_3$ nije rezultirao statistički značajnom promjenom u aktivnosti SOD u listovima duhana u odnosu na kontrolu (Slika 25.).

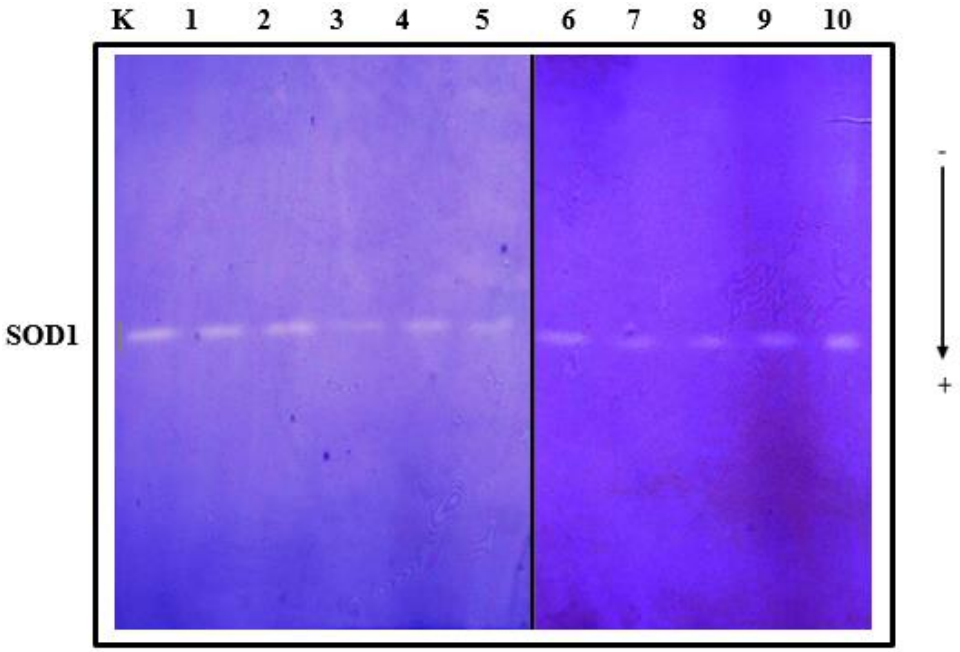


Slika 24. Aktivnost SOD u korijenu odraslih biljaka duhana. Biljke su tretirane sedam dana u vodenim otopinama AgNP i $AgNO_3$. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

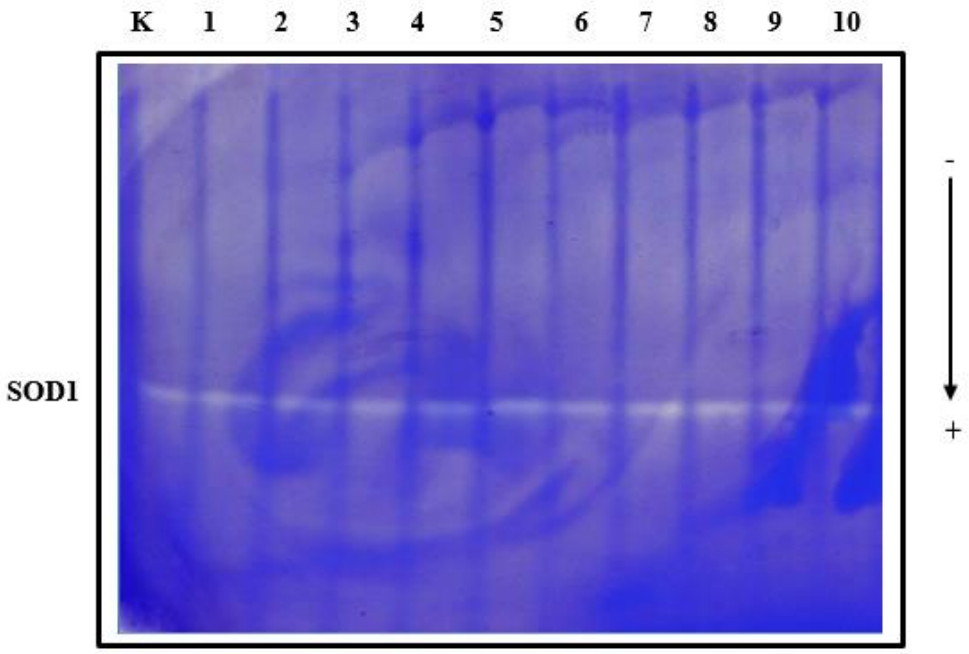


Slika 25. Aktivnost SOD u listu odraslih biljaka duhana. Biljke su tretirane sedam dana u vodenim otopinama AgNP i $AgNO_3$. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

U tkivu korijenja (Slika 26.) i listova (Slika 27.) biljaka duhana nakon primjene svih koncentracija tretmana sa AgNP i $AgNO_3$ vidljiva je samo jedna izoforma enzima, označenog kao SOD1, koja je u svim uzorcima bila jednakog intenziteta.



Slika 26. Aktivnost i izoforme SOD u gelu nakon nativne PAG elektroforeze u korijenu odraslih biljaka duhana koje su tretirane sedam dana u vodenim otopinama AgNP i $AgNO_3$. K – kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$.



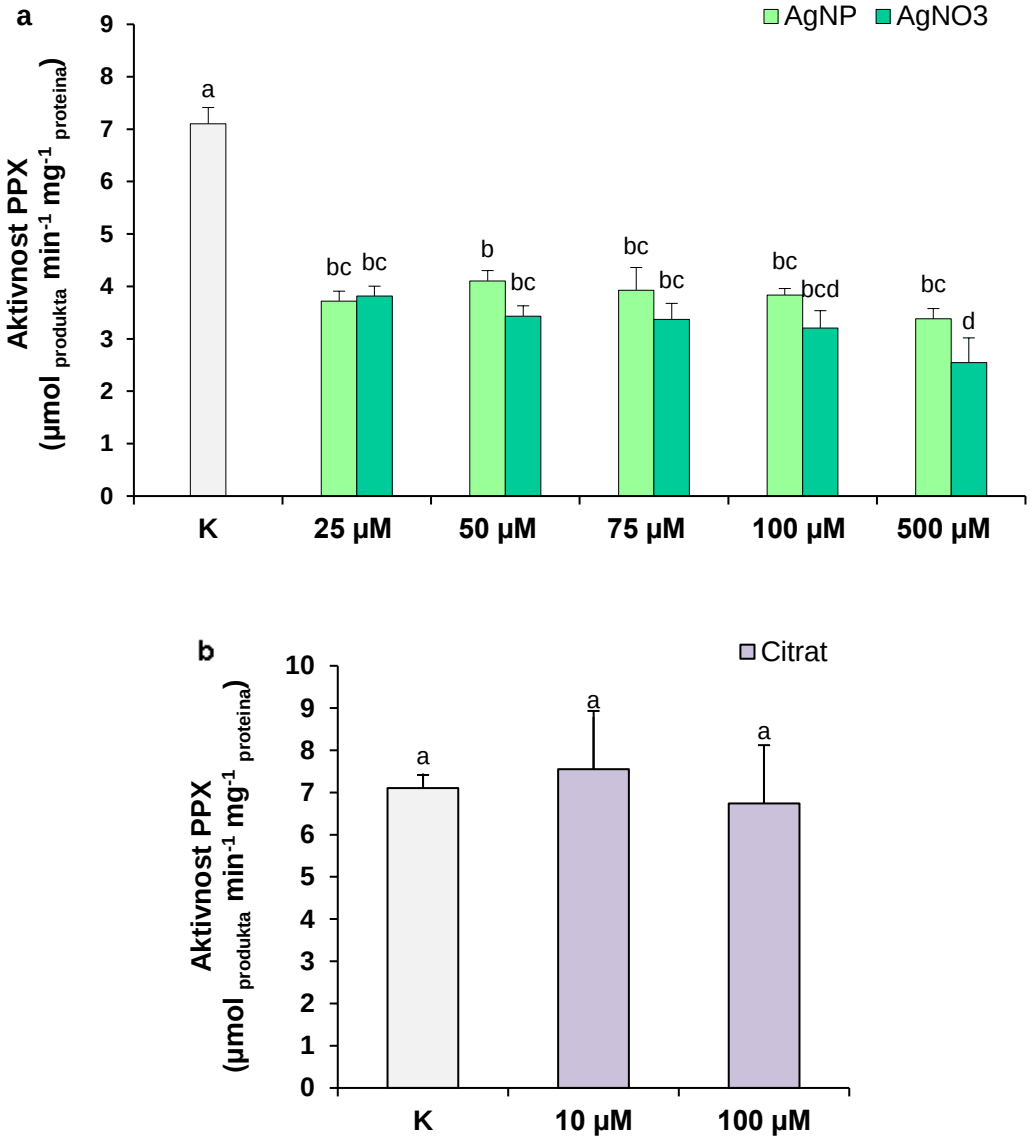
Slika 27. Aktivnost i izoforme SOD u gelu nakon nativne PAG elektroforeze u listovima odraslih biljaka duhana koje su tretirane sedam dana u vodenim otopinama AgNP i $AgNO_3$. K – kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$.

4.3.2. Aktivnost pirogalol peroksidaze

4.3.2.1. Klijanci

Nakon izlaganja klijanaca svim koncentracijama AgNP i $AgNO_3$, aktivnost PPX statistički se značajno smanjila u odnosu na kontrolu. Smanjenje je bilo više izraženo u tretmanima sa $AgNO_3$ u odnosu na AgNP, a najmanja vrijednost zabilježena je nakon tretmana s najvišom koncentracijom (500 μM) $AgNO_3$ (Slika 28a.). Ukoliko se usporede vrijednosti izmjerene nakon tretmana sa istim koncentracijama AgNP i $AgNO_3$, uočava se kako je pri najvišoj koncentraciji od 500 μM aktivnost PPX statistički značajno povećana u tretmanu sa AgNP u odnosu na $AgNO_3$ (Slika 28a.).

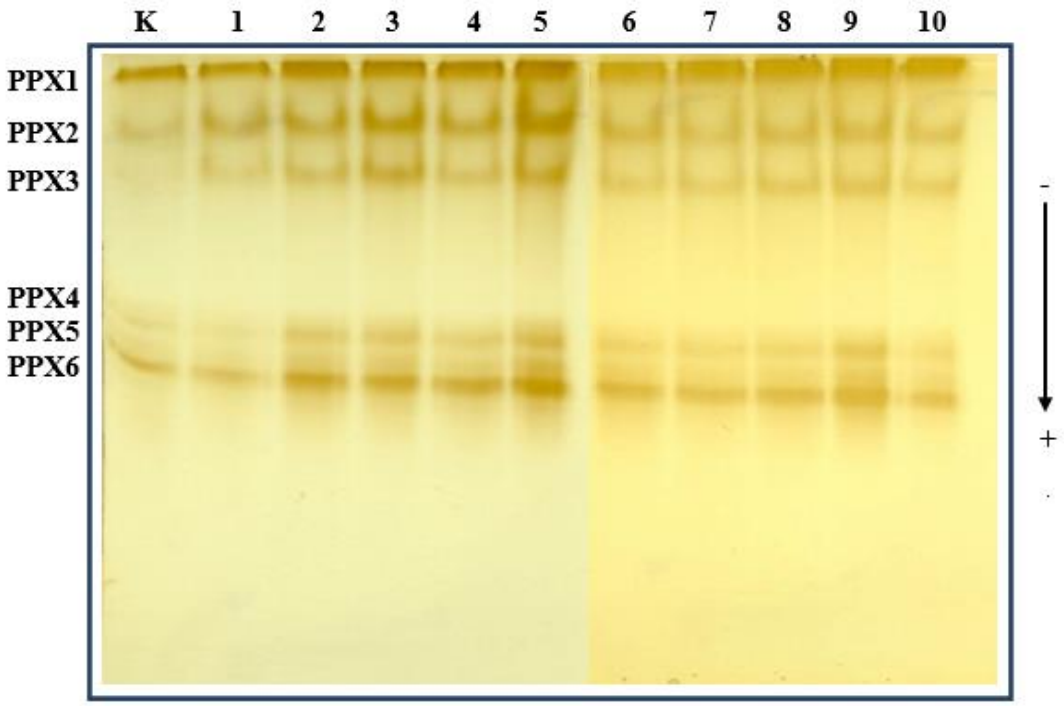
Nakon tretmana klijanaca duhana sa 10 i 100 μM citratom nije uočena statistički značajna razlika aktivnosti PPX u odnosu na kontrolu (Slika 28b.).



Slika 28. Aktivnost PPX u klijancima duhana koji su rasli 30 dana na podlogama s dodatkom a) AgNP i $AgNO_3$, te b) citrata. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

Na Slici 29. prikazana je aktivnost PPX u gelu. U analiziranim uzorcima detektirano je šest izoformi navedenoga enzima, koje su prema rastućoj pokretljivosti u gelu označene kao PPX1 – PPX6.

Između uzoraka tretiranih sa AgNP i $AgNO_3$ nije bilo razlike u broju izoformi PPX, no u svim se tretmanima pojavila jedna izoforma (PPX3), koja nije bila vidljiva u kontroli. Ovisno o primijenjenim koncentracijama AgNP i $AgNO_3$, uzorci se međusobno razlikuju po intenzitetu pojedinih vrpci. U klijancima koji su rasli na podlozi s AgNP vidljivo je postupno pojačanje intenziteta vrpci PPX2, PPX3 i PPX6 koje raste s porastom koncentracije AgNP. Najjači intenzitet vrpci pokazuju klijanci koji su rasli na podlozi sa 500 μM AgNP, gdje se pojavljuje i dodatna vrpca PPX5, koja nije vidljiva pri ostalim koncentracijama tretmana sa AgNP. U usporedbi s kontrolom, klijanci tretirani sa $AgNO_3$ pokazali su vidljivo jači intenzitet svih vrpci, koji je ujednačen u svim ispitanim koncentracijama osim pri koncentraciji od 100 μM, gdje su vrpce PPX4 i PPX6 bile jačeg intenziteta. Također se pojavila se izoforma PPX5, koja nije vidljiva u tretmanima pri ostalim koncentracijama.



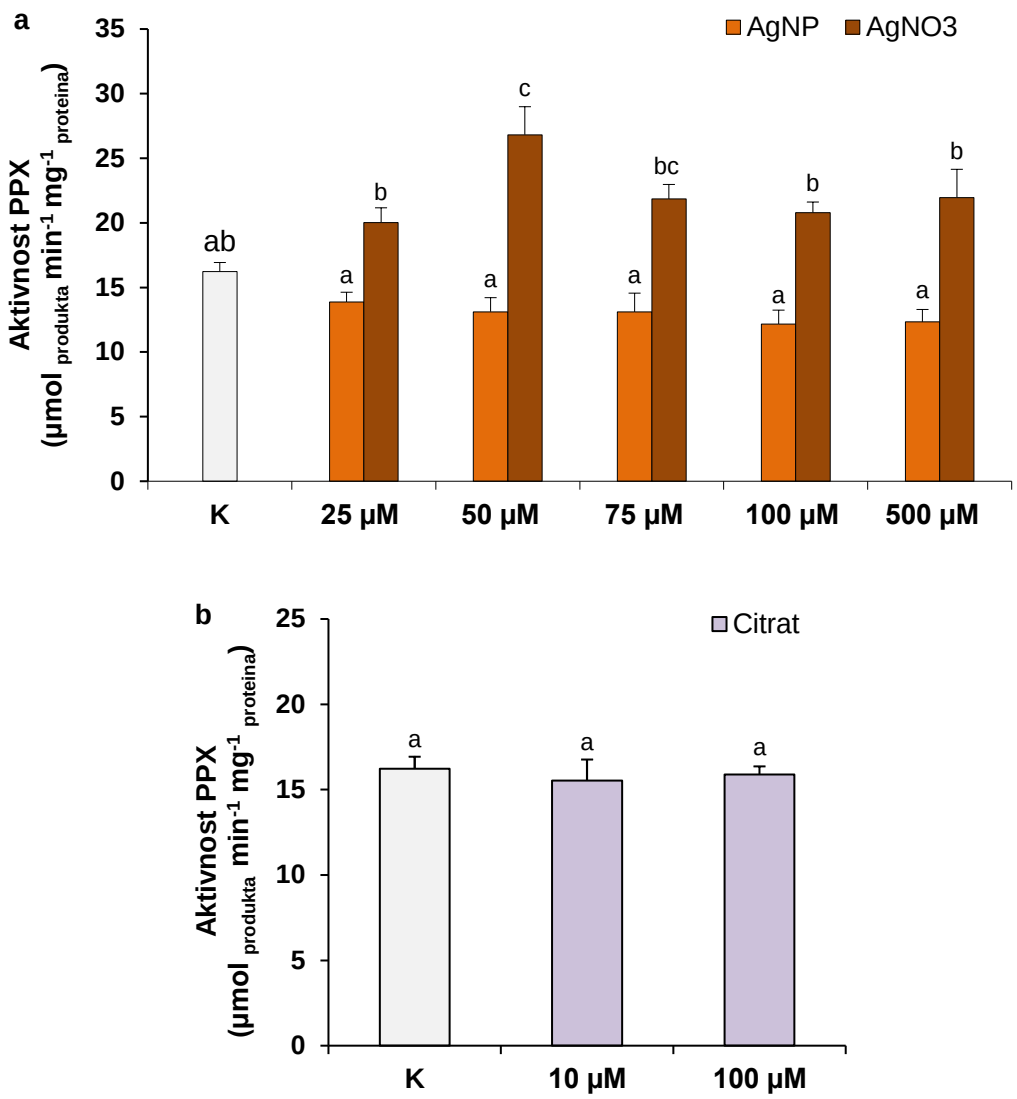
Slika 29. Aktivnost i izoforme PPX u gelu nakon nativne elektroforeze u uzorcima klijanaca duhana koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale AgNP i $AgNO_3$. K – kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$.

4.3.2.2. Odrasle biljke

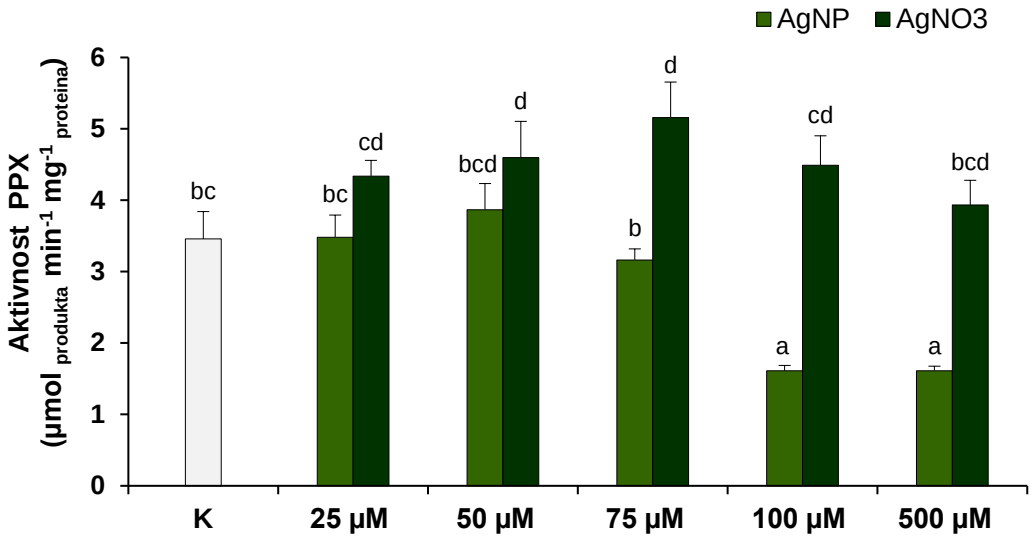
U korijenu duhana niti jedna od primijenjenih koncentracija AgNP nije pokazala statistički značajnu razliku u aktivnosti PPX u odnosu na kontrolu (Slika 30a.). S druge strane, svi tretmani sa $AgNO_3$ izazvali su statistički značajan porast vrijednosti, kako u odnosu na kontrolu, tako i u odnosu na iste koncentracije tretmana sa AgNP. Najveća vrijednost aktivnosti PPX izmjerena je nakon tretmana sa 50 μM $AgNO_3$ (Slika 30a.).

U tkivu korijena duhana nije uočena statistički značajna razlika aktivnosti PPX nakon izlaganja 10 i 100 μM citratu u odnosu na kontrolu (Slika 30b.).

U tkivu lista tretmani sa 100 i 500 μM AgNP izazvali su statistički značajno smanjenje aktivnosti PPX u odnosu na kontrolu, dok su 50 i 75 μM $AgNO_3$ rezultirali značajnim povećanjem vrijednosti (Slika 31.). Usporedba aktivnosti PPX izmjerenih nakon tretmana s AgNP i $AgNO_3$ istih koncentracija pokazala je statistički značajnu razliku nakon primjene koncentracija od 75, 100 i 500 μM. Dok su u odnosu na kontrolu aktivnosti PPX nakon tretmana sa $AgNO_3$ bile povećane, vrijednosti PPX u tretmanima s AgNP su se s porastom koncentracije smanjile (Slika 31.).

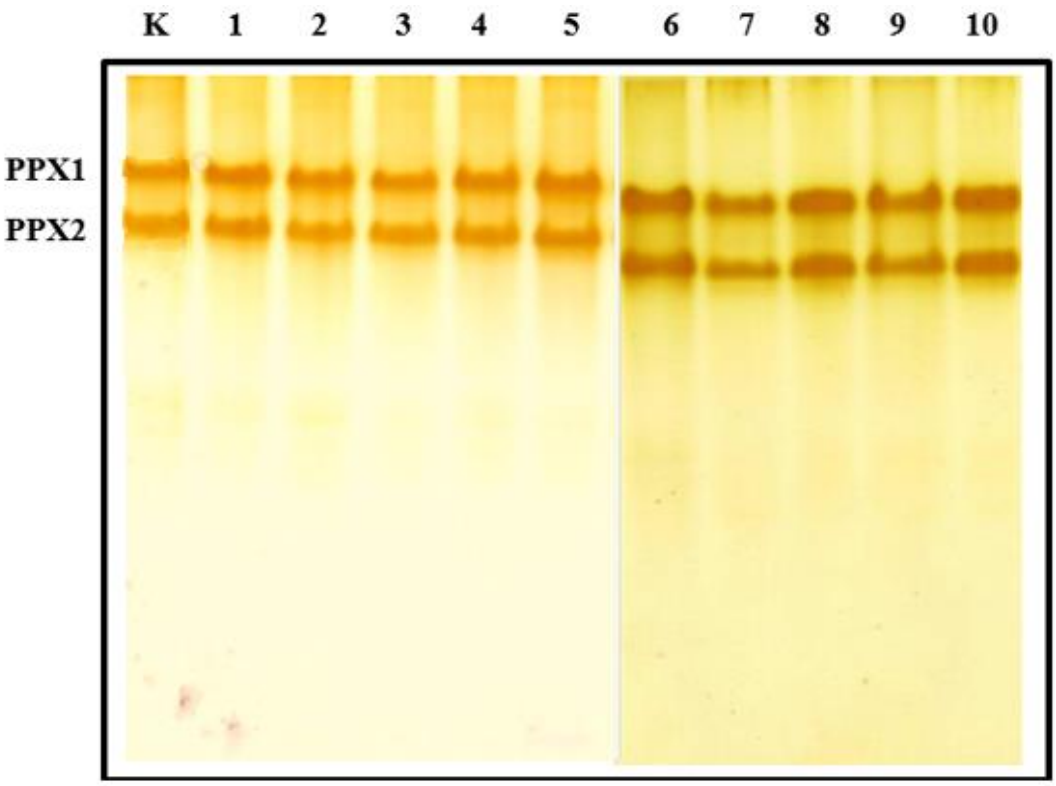


Slika 30. Aktivnost PPX u korijenu odraslih biljaka duhana. Biljke su tretirane sedam dana u vodenim otopinama s dodatkom a) AgNP i $AgNO_3$, te b) citrata. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.



Slika 31. Aktivnost PPX u listu odraslih biljaka duhana. Biljke su tretirane sedam dana u vodenim otopinama AgNP i $AgNO_3$. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

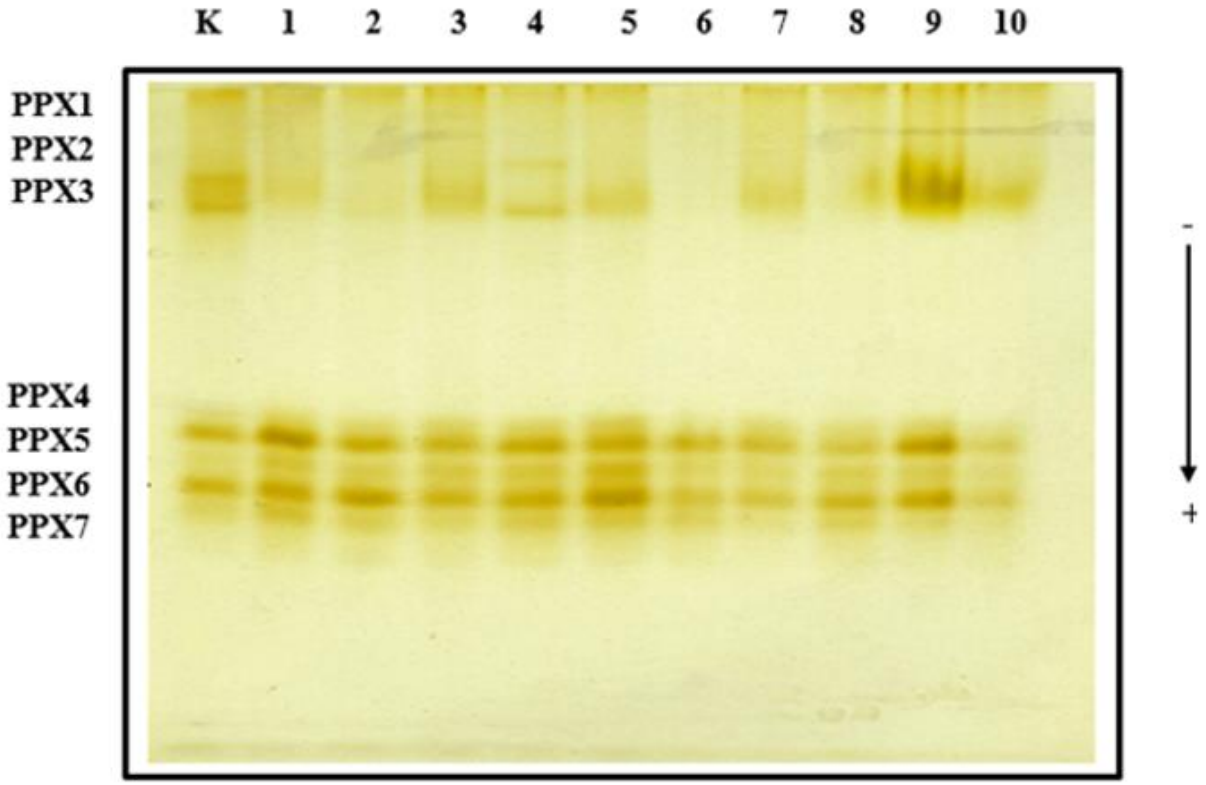
Na Slici 32. prikazane su izoforme PPX iz korijena odraslih biljaka nakon razdvajanja u gelu. U svim uzorcima detektirane su dvije izoforme ovog enzima, označene prema rastućoj pokretljivosti kao PPX1 i PPX2, koje su imale jači intenzitet obojenja u tretmanima u odnosu na kontrolu.



Slika 32. Aktivnost i izoforme PPX u gelu nakon nativne PAG elektroforeze u korijenu odraslih biljaka duhana koje su tretirane sedam dana u vodenim otopinama AgNP i $AgNO_3$. K – kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$.

Aktivnost i izoforme PPX u listovima odraslih biljaka duhana izloženih djelovanju AgNP i $AgNO_3$ prikazana su na Slici 33. U analiziranim uzorcima detektirano je sedam izoformi PPX, koje su označene prema rastućoj pokretljivosti kao PPX1 – PPX7. Među tretmanima sa AgNP i $AgNO_3$ nije bilo razlike u broju izoformi PPX, no razlike su bile vidljive obzirom na intenzitet pojedinih vrpci nakon različitih tretmana. Naime, u tretmanu sa AgNP uočen je slabiji intenzitet PPX1 pri koncentracijama od 50 i 100 μM u odnosu na kontrolu i ostale primijenjene koncentracije, dok u tretmanu sa 50 μM AgNP vrpce PPX2 i PPX3 nisu bile vidljive. Izoforme PPX4, PPX5 i PPX7 bile su jačeg intenziteta obojenja u svim tretmanima sa AgNP u odnosu na kontrolu, s tim da je izoforma PPX4 pokazala najjači intenzitet pri koncentraciji od 25 μM AgNP. Izoforma PPX6 je u svim primijenjenim koncentracijama AgNP imala jači intenzitet u odnosu na kontrolu, a njen najjači intenzitet je zabilježen pri najvišoj koncentraciji, 500 μM AgNP. Što se tiče tretmana sa $AgNO_3$, u listu biljke duhana koja je tretirana sa 25 μM koncentracijom, vrpce PPX1, PPX2 i PPX3 bile su vrlo slabo vidljive. Najjači intenzitet tih vrpci uočen je pri koncentraciji od 100 μM, osobito izoforme PPX3.

Izoforme PPX4 – PPX7 bile su vidljive u svim tretmanima sa $AgNO_3$, no najjači intenzitet pokazale su na koncentraciji od 100 μM. Ukoliko se usporede intenziteti vrpci PPX4 do PPX7 nakon tretmana sa AgNP i $AgNO_3$, uočljivo je da su intenziteti navedenih izoformi slabiji nakon tretmana sa $AgNO_3$.



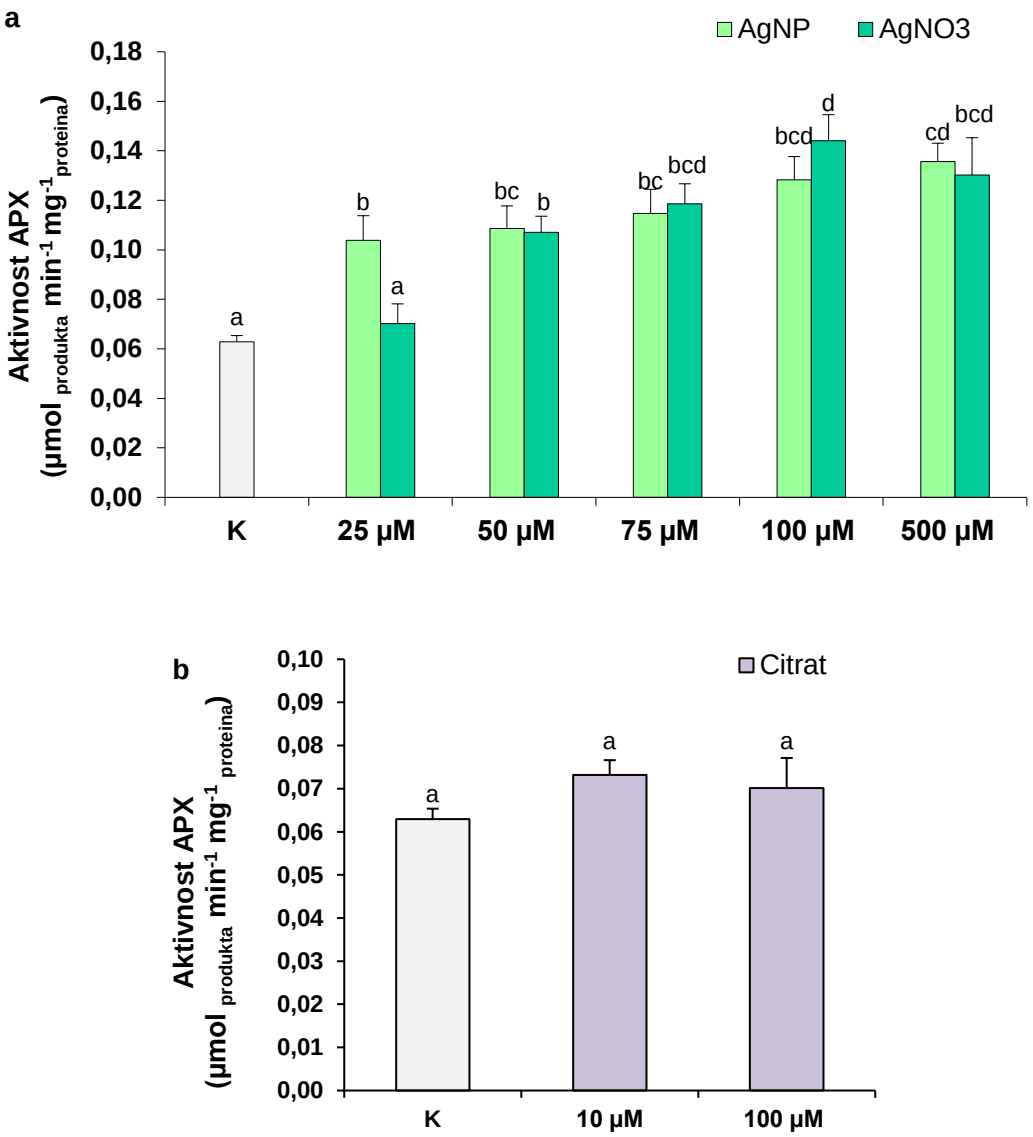
Slika 33. Aktivnost i izoforme PPX u gelu nakon nativne PAG elektroforeze u listovima odraslih biljaka duhana koje su tretirane sedam dana u vodenim otopinama AgNP i $AgNO_3$. K - kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$.

4.3.3. Aktivnost askorbat peroksidaze

4.3.3.1. Klijanci

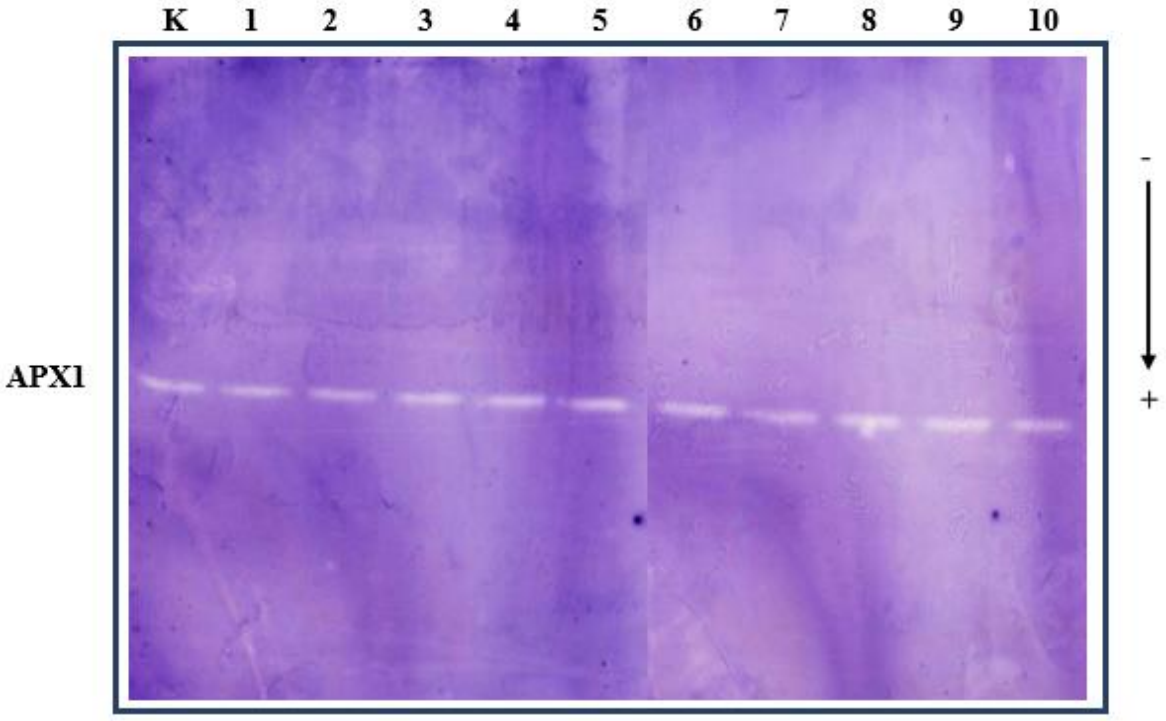
Klijanci duhana koji su rasli na podlogama s AgNP i $AgNO_3$ pokazali su statistički značajan porast aktivnosti APX u odnosu na kontrolu, s izuzetkom klijanaca raslih na 25 μM $AgNO_3$. Između tretmana sa AgNP, najveća vrijednost zabilježena je nakon tretmana s najvećom koncentracijom (500 μM), dok je izlaganje klijanca 100 μM $AgNO_3$ rezultiralo najvećom aktivnošću APX, koja je bila značajno veća u odnosu na 25 i 50 μM $AgNO_3$, ali i na 25, 50 i 75 μM AgNP (Slika 34a.). Usporedbom aktivnosti APX pri istim koncentracijama AgNP i $AgNO_3$, uočila sam statistički značajnu razliku samo nakon primjene najniže koncentracije od 25 μM, pri čemu je tretman sa AgNP rezultirao povećanom vrijednošću u odnosu na $AgNO_3$ (Slika 34a.).

Tretmani sa 10 i 100 μM citrata nisu rezultirali sa statistički značajnim promjenama u aktivnosti APX u klijancima u odnosu na kontrolu (Slika 34b.).



Slika 34. Aktivnost APX u klijancima duhana koji su rasli 30 dana na podlozi s dodatkom a) AgNP i $AgNO_3$, te b) citrata. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

Slika 35. prikazuje aktivnost enzima APX u gelu, gdje je vidljiva samo jedna izoforma ovog enzima, označena kao APX1. U usporedbi s kontrolom, vrpca APX1 bila je jednakog intenziteta u svim primijenjenim koncentracijama oba tipa tretmana (AgNP i $AgNO_3$).



Slika 35. Aktivnost i izoforme APX u gelu nakon nativne PAG elektroforeze u klijancima duhana koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale AgNP i $AgNO_3$. K – kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$.

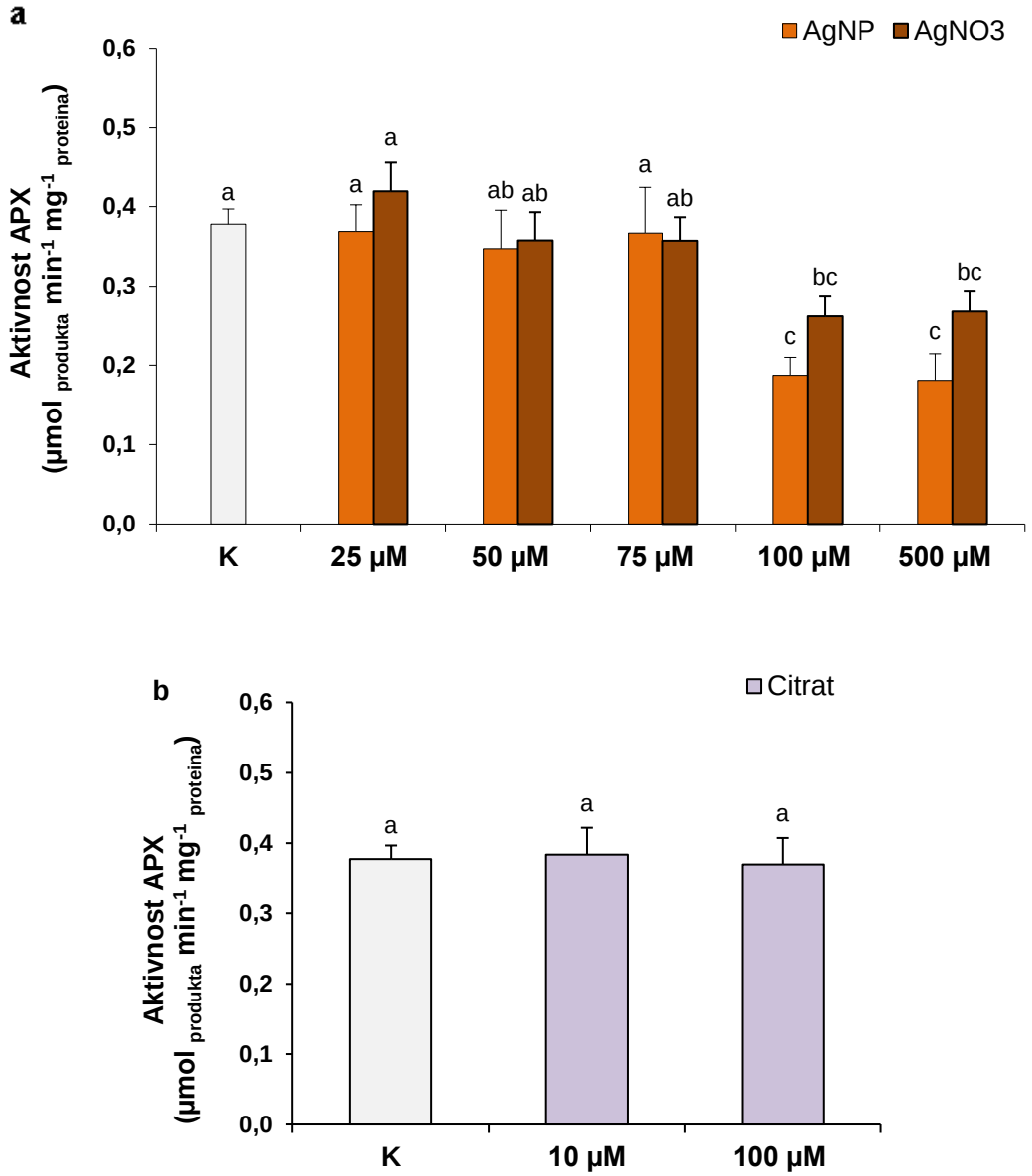
4.3.3.2. Odrasle biljke

U tkivu korijena, nakon tretmana sa 25, 50, 75 μM AgNP i $AgNO_3$ izmjerene aktivnosti APX nisu se statistički značajno razikovale od kontrole. S druge strane, koncentracije od 100 i 500 μM AgNP i $AgNO_3$ izazvale su značajno smanjenje vrijednosti, koje je bilo jače izraženo nakon tretmana sa AgNP u odnosu na $AgNO_3$ (Slika 36a.).

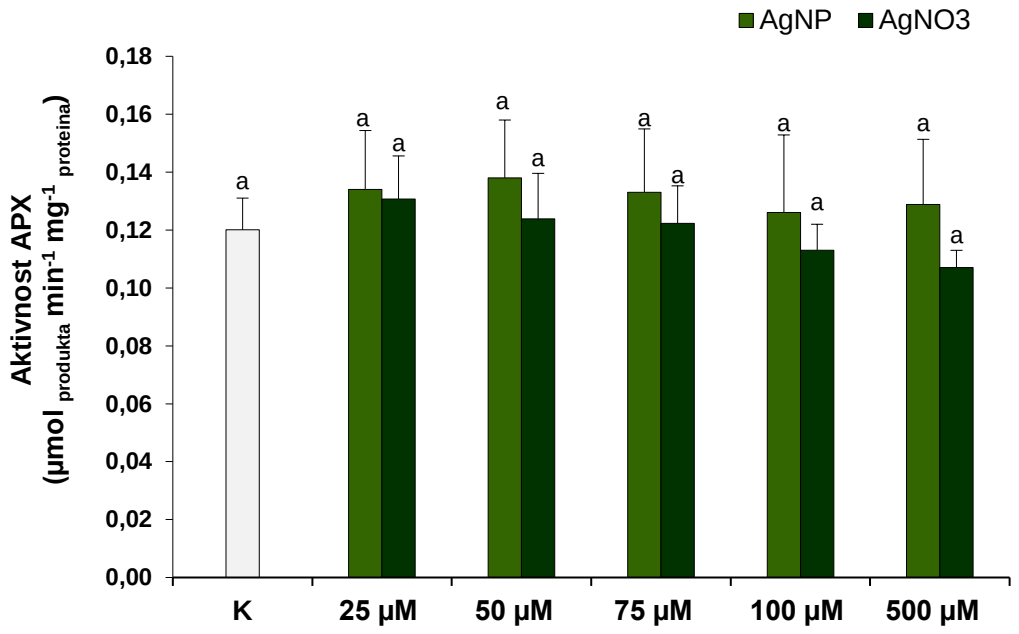
Nakon tretmana sa 10 i 100 μM citratom izmjerena aktivnost APX u korijenu nije se statistički značajno razlikovala u usporedbi s kontrolom (Slika 36b.).

U listu duhana niti jedna od ispitanih koncentracija AgNP i $AgNO_3$ nije uzrokovala statistički značajnu promjenu aktivnosti enzima APX u usporedbi s kontrolom (Slika 37.). Iako se nakon tretmana sa $AgNO_3$ aktivnost APX više smanjivala s porastom koncentracija u odnosu

na tretmane sa AgNP, statistički značajna razlika nije uočena prilikom usporedbe vrijednosti aktivnosti APX nakon primjene istih koncentracija navedenih tretmana (Slika 37.).

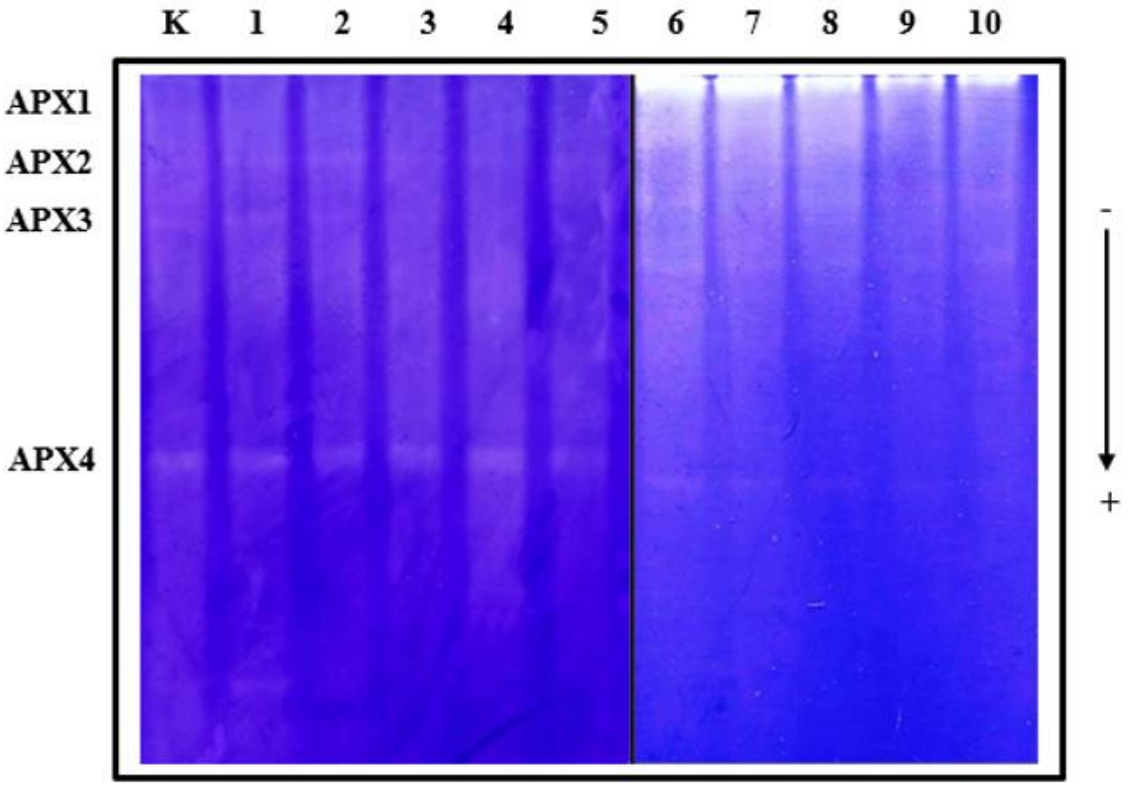


Slika 36. Aktivnost APX u korijenu odraslih biljaka duhana. Biljke su tretirane sedam dana u vodenim otopinama a) AgNP i $AgNO_3$, te b) citrata. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.



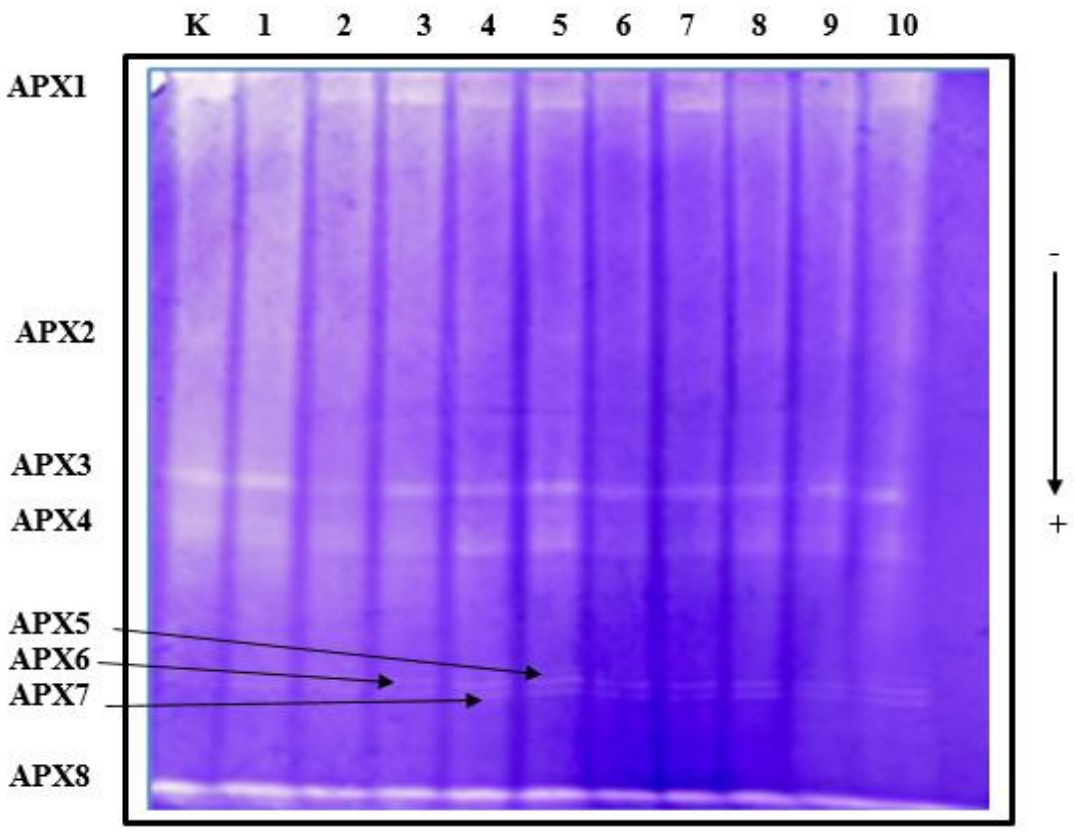
Slika 37. Aktivnost APX u listu odraslih biljaka duhana. Biljke su tretirane sedam dana u vodenim otopinama AgNP i $AgNO_3$. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

Na Slici 38. vidljive su četiri izoforme enzima APX u korijenju odraslih biljaka duhana nakon izlaganja djelovanju AgNP i $AgNO_3$, označene kao APX1 – APX4. Izoforma APX1 nije detektirana u kontroli niti u tretmanima sa AgNP, dok je u tretmanima sa $AgNO_3$ bila vidljiva kao vrpca vrlo slabog intenziteta. Vrpce APX2 i APX3 bile su podjednakog intenziteta u većini tretmana, s iznimkom 100 i 500 µM AgNP, gdje vrpca APX3 nije uočena. Izoforma APX4 pokazala je nakon tretmana s 25 µM $AgNO_3$ jednaki intenzitet kao u kontroli, dok je nakon izlagnja koncentracijama od 50 do 500 µM $AgNO_3$ bila slabijeg intenziteta u odnosu na kontrolu. Ukoliko se usporede tretmani sa AgNP i $AgNO_3$, uočava se kako je intenzitet izoforme APX4 bio slabiji nakon tretmana sa $AgNO_3$.



Slika 38. Aktivnost i izoforme APX u gelu nakon nativne PAG elektroforeze u korijenu odraslih biljaka duhana koje su tretirane sedam dana u vodenim otopinama AgNP i $AgNO_3$. K – kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$.

Na Slici 39. prikazana je aktivnost i izoforme enzima APX u listovima duhana. U analiziranim uzorcima detektirano je osam izoformi APX koje su prema rastućoj pokretljivosti u gelu označene kao APX1 – APX8. Izoforma APX1 imala je slabiji intenzitet u tretmanu s 25 μM AgNP u odnosu na kontrolu i druge tretmane s AgNP, kao i u odnosu na tretmane s $AgNO_3$. Vrpca APX2 bila je jednakog intenziteta u svim tretmanima s AgNP i $AgNO_3$, osim kod 25 μM $AgNO_3$, gdje je pokazala slabiji intenzitet. U odnosu na kontrolu, APX3 i APX4 pokazale su slabiju ekspresiju nakon tretmana s 50 μM AgNP, a najjaču pri 25 μM AgNP, s tim da je izoforma APX2 bila slabije vidljiva. U tretmanu s $AgNO_3$, ekspresija vrpci APX3 i APX4 rasla je s porastom koncentracije, pa je nakon tretmana s 500 μM bila jače eksprimirana u odnosu na ostale tretmane s $AgNO_3$ i na kontrolu. APX5 – APX8 pokazale su nakon tretmana s AgNP i $AgNO_3$ približno jednaku ekspresiju kao u kontroli.



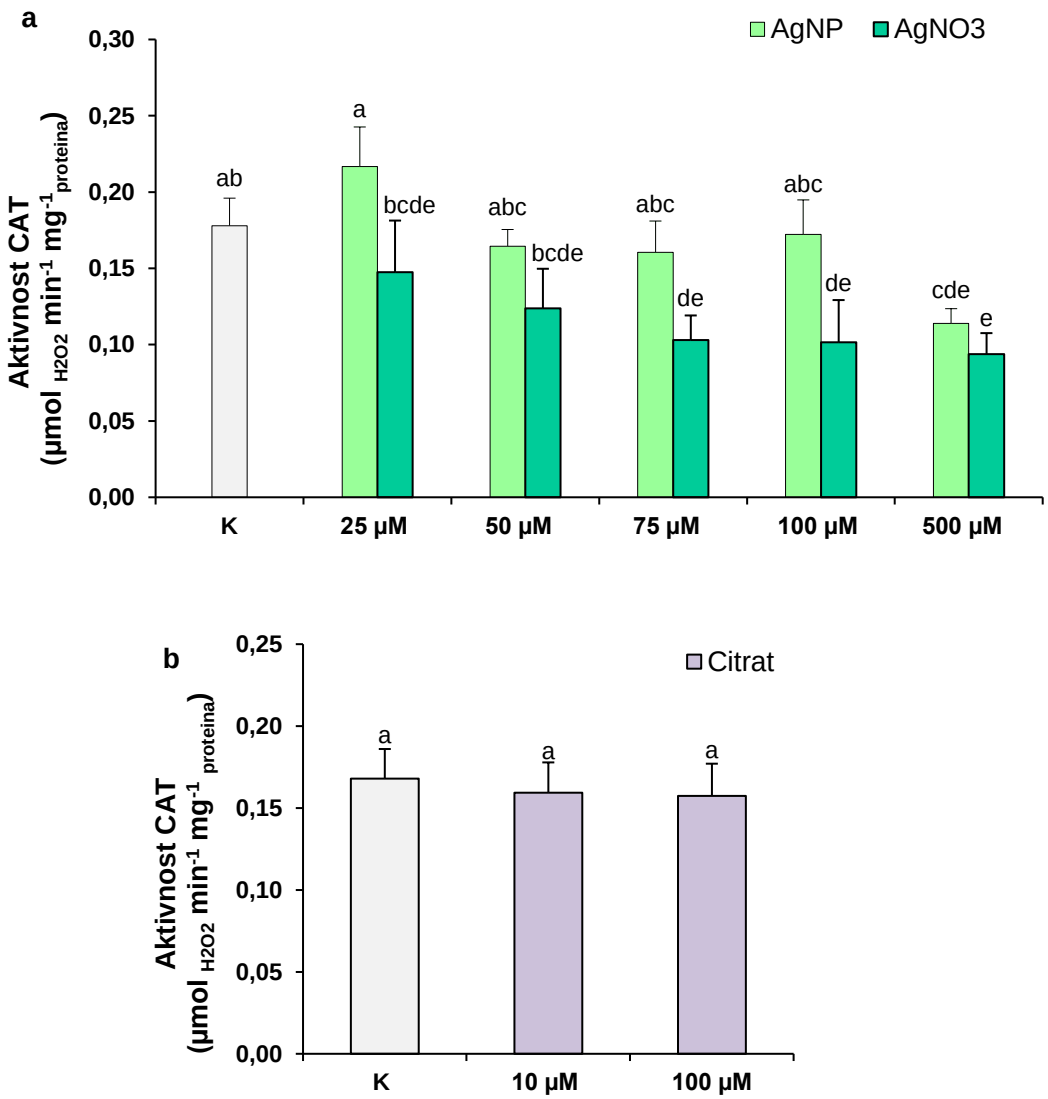
Slika 39. Aktivnost i izoforme APX u gelu nakon nativne PAG elektroforeze u listovima odraslih biljaka duhana koje su tretirane sedam dana u vodenim otopinama AgNP i $AgNO_3$. K - kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$. Strelicama su označene pojedine izoforme enzima.

4.3.4. Aktivnost katalaze

4.3.4.1. Klijanci

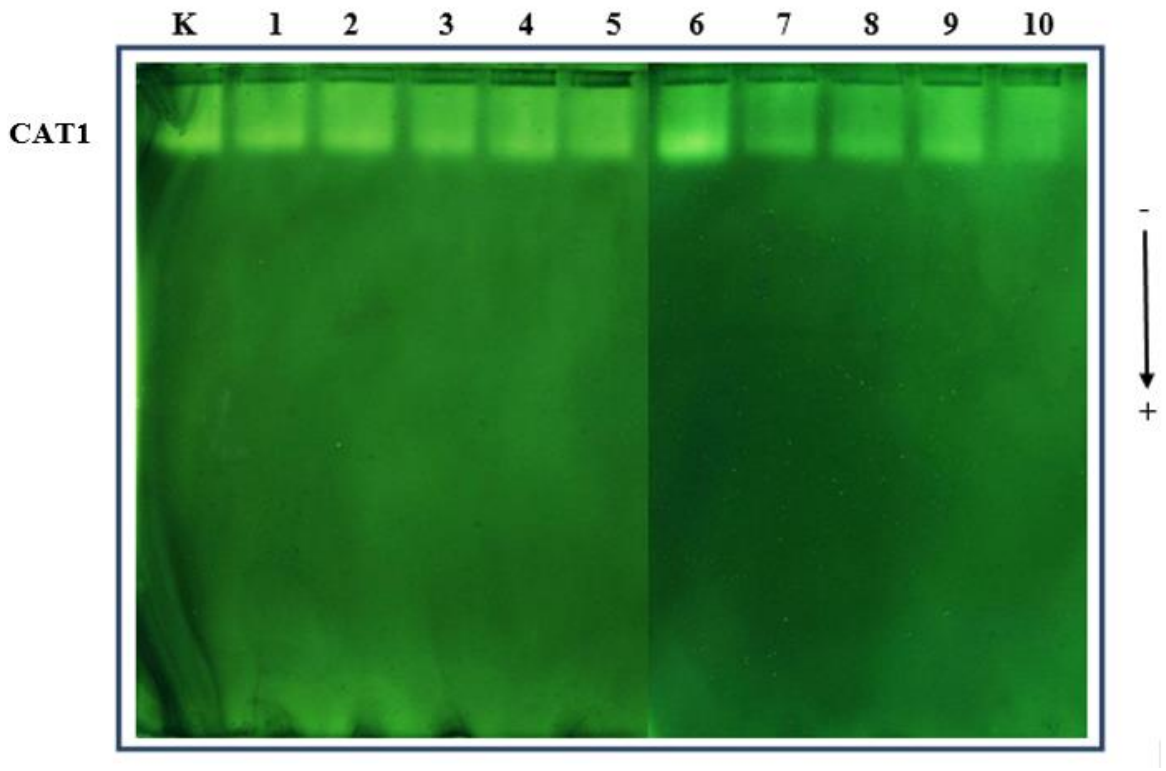
U klijanacima koji su bili tretirani sa AgNP aktivnosti CAT statistički se značajno smanjila samo nakon tretmana s 500 μM AgNP u odnosu na kontrolu (Slika 40a.). Značajno smanjenje vrijednosti zabilježeno je i nakon izlaganja $AgNO_3$ primijenjenog u koncentracijama od 75, 100 i 500 μM (Slika 40a.). Usporedbom aktivnosti CAT izmjerenih nakon primjene istih koncentracija AgNP i $AgNO_3$, uočila sam statistički značajno veće vrijednosti u tretmanima s 25, 75 i 100 μM AgNP u odnosu na $AgNO_3$ (Slika 40a.).

Nakon izlaganja klijanaca citratu u koncentracijama od 10 i 100 μM nije uočena statistički značajna razlika u aktivnosti CAT u odnosu na kontrolu (Slika 40b.).



Slika 40. Aktivnost CAT u klijancima duhana koji su rasli 30 dana na podlogama s dodatkom a) AgNP i $AgNO_3$, te b) citrata. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

Na Slici 41. prikazana je aktivnost CAT u gelu nakon tretmana klijanaca sa AgNP i $AgNO_3$. U svim analiziranim uzorcima vidljiva je samo jedna izoforma označena kao CAT1. Dok je u klijancima tretiranim sa svim koncentracijama AgNP intenzitet obojenja bio slabiji u odnosu na kontrolu, u tretmanima sa $AgNO_3$ uočen je pojačani intenzitet vrpce pri koncentraciji od 25 µM u odnosu na kontrolu i sve ostale primjenjene koncentracije oba tipa tretmana. Također je vidljivo da s porastom koncentracija $AgNO_3$, intenzitet vrpce CAT1 postupno slabi te je pri koncentraciji od 500 µM bio najslabiji.



Slika 41. Aktivnost i izoforme CAT u gelu nakon nativne PAG elektroforeze u klijancima duhana koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale AgNP i $AgNO_3$. K – kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$.

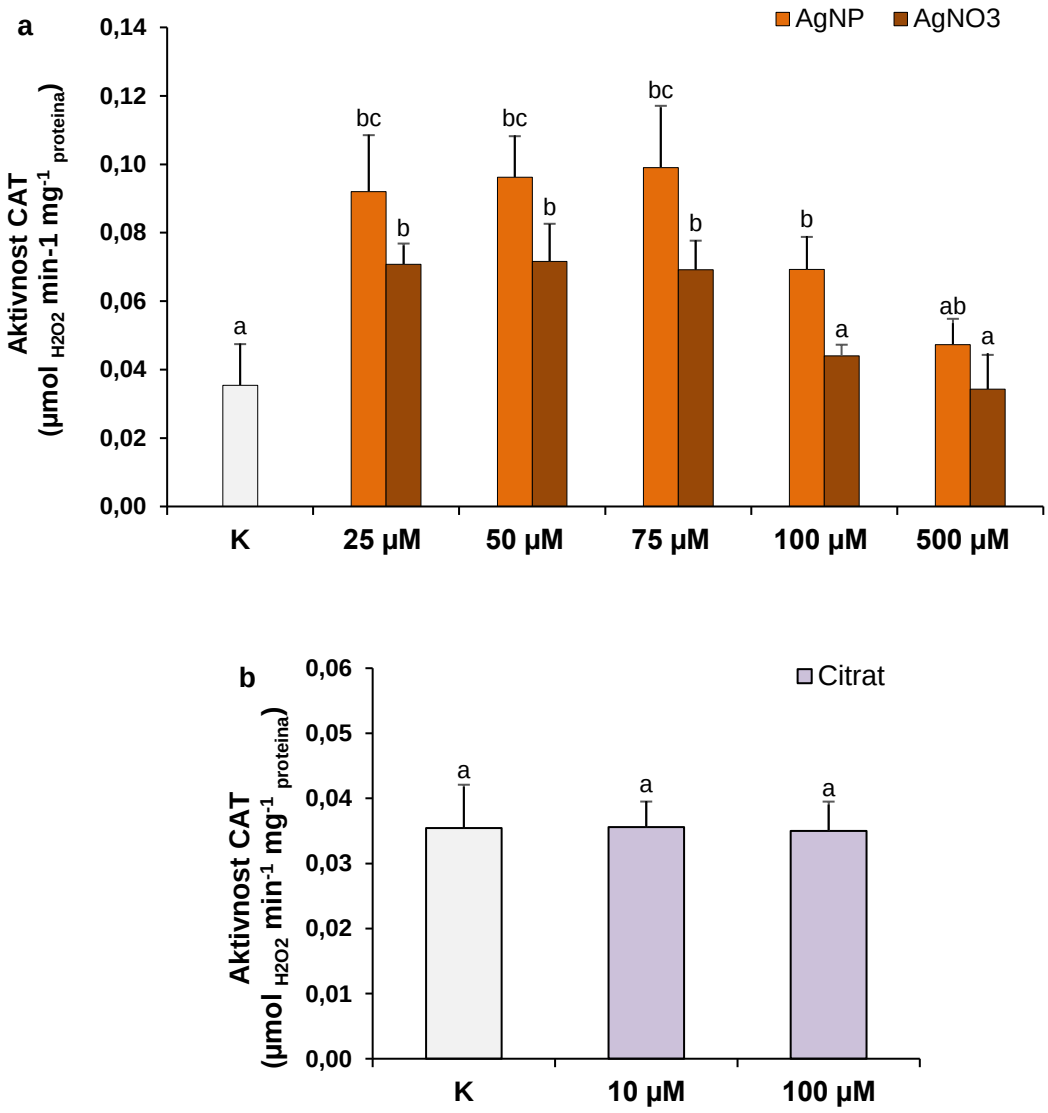
4.3.4.2. Odrasle biljke

U tkivu korijena statistički značajno povećanje aktivnosti CAT u odnosu na kontrolu zabilježeno je pri tretmanima s 25, 50, 75 i 100 μM AgNP te s 25, 50 i 75 μM $AgNO_3$, a povećanje je bilo jače izraženo nakon tretmana sa AgNP (Slika 42a.). Međusobnom usporedbom vrijednosti CAT nakon izlaganja tretmanima sa AgNP i $AgNO_3$ uočava se kako je samo koncentracija od 100 μM uzrokovala statistički značajnu razliku u dobivenim vrijednostima, gdje je tretman sa AgNP rezultirao većom aktivnošću u odnosu na $AgNO_3$ (Slika 42a.).

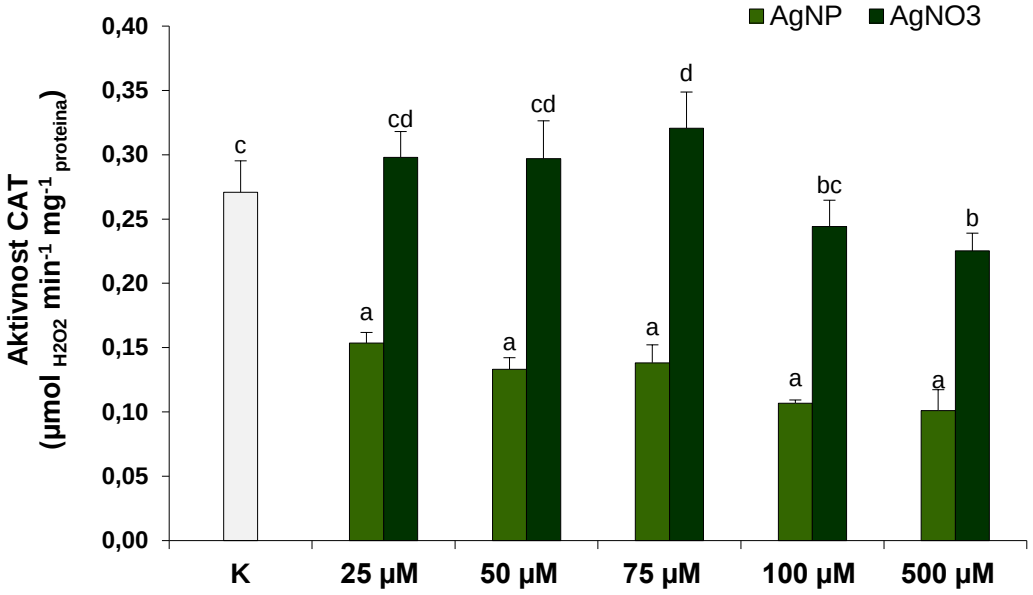
Nije uočena statistički značajna razlika aktivnosti u CAT u korijenu odraslih biljaka u odnosu na kontrolu nakon izlaganja 10 i 100 μM citratu (Slika 42b.).

U listovima duhana, sve primijenjene koncentracije AgNP statistički značajno su smanjile aktivnost CAT u odnosu na kontrolu, a najniža izmjerena vrijednost bila je nakon tretmana sa 100 μM AgNP (Slika 43.). S druge strane, 25 i 50 μM $AgNO_3$ nije izazvao statistički značajnu promjenu u vrijednostima u odnosu na kontrolu, dok je koncentracija od 75 μM

$AgNO_3$ značajno povećala aktivnost CAT. Najveće ispitane koncentracije $AgNO_3$ (100 i 500 µM), smanjile su aktivnost CAT u odnosu na kontrolu, no samo je 500 µM $AgNO_3$ rezultirao statistički značajnim smanjenjem (Slika 43.). Usporedbom rezultata dobivenih nakon tretmana AgNP i $AgNO_3$, vidljivo je kako je aktivnost CAT bila statistički značajno povećana u svim tretmanima sa $AgNO_3$ u usporedbi s istim koncentracijama AgNP (Slika 43.).

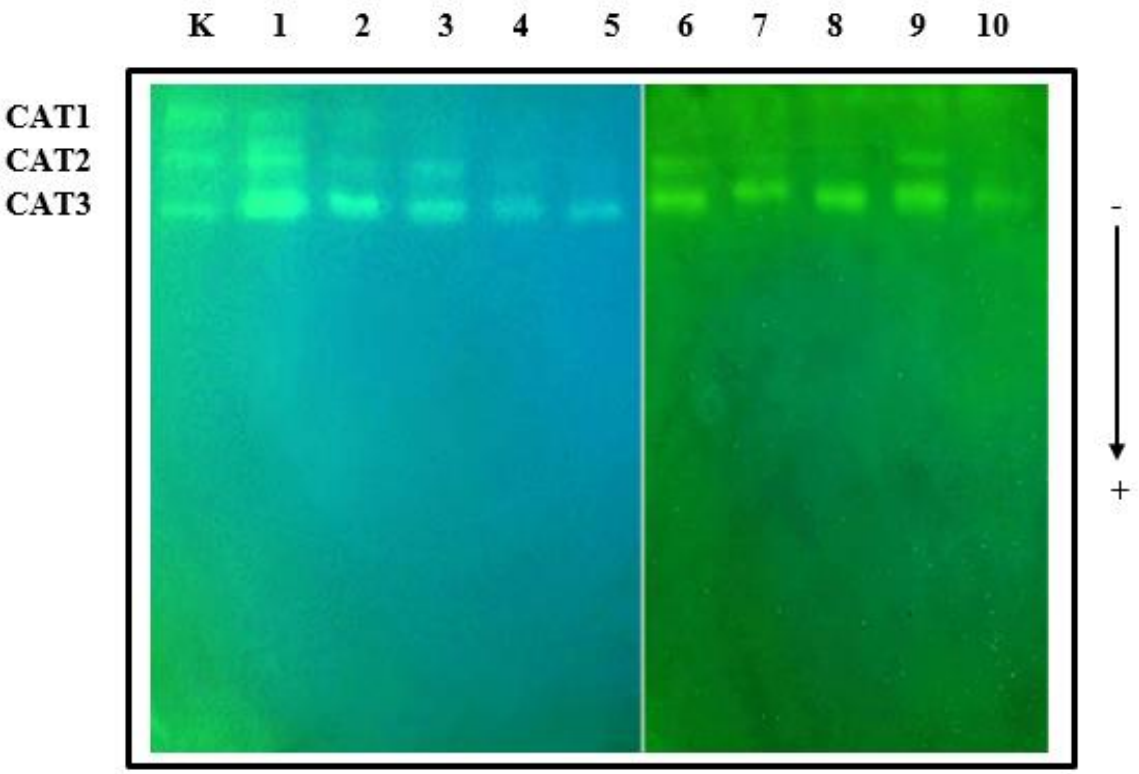


Slika 42. Aktivnost CAT u korijenu odraslih biljaka duhana. Biljke su tretirane sedam dana u vodenim otopinama a) AgNP i $AgNO_3$, te b) citrata. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.



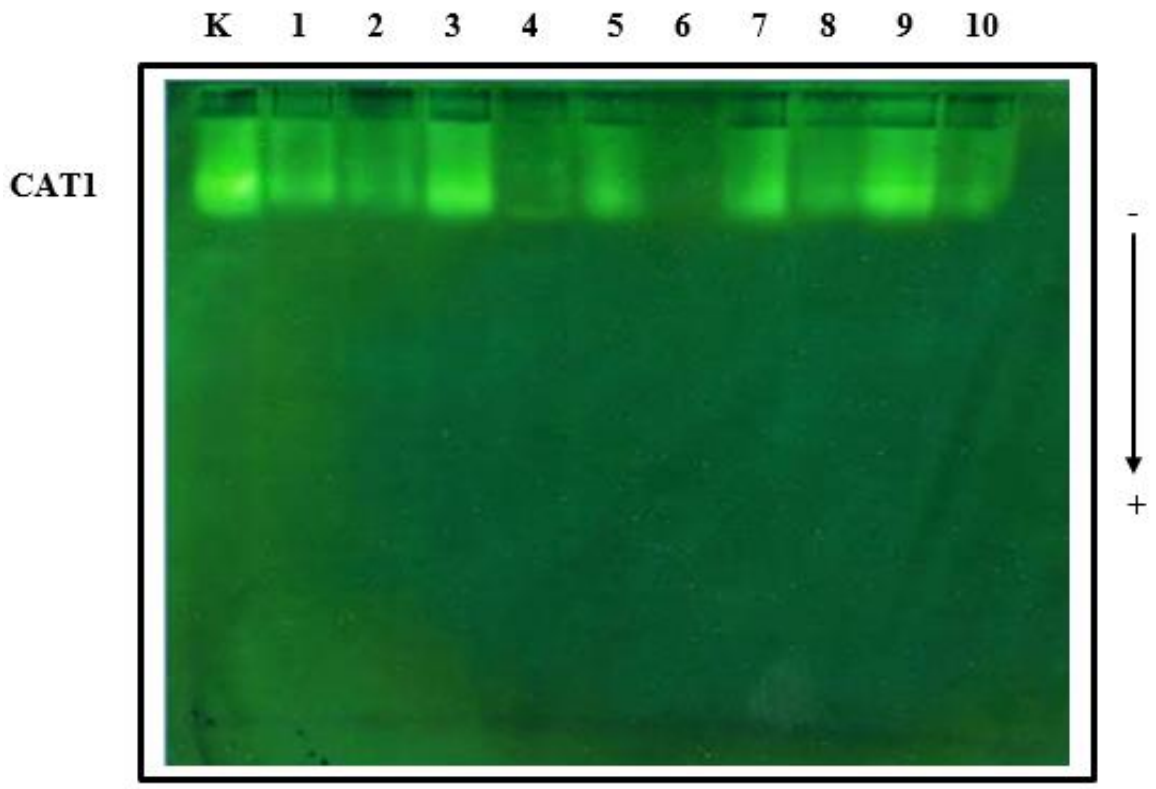
Slika 43. Aktivnost CAT u listu odraslih biljaka duhana. Biljke su tretirane sedam dana u vodenim otopinama AgNP i $AgNO_3$. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

Aktivnost i izoforme enzima CAT u korijenju biljaka duhana izloženih tretmanima AgNP i $AgNO_3$ prikazane su na Slici 44. Ukupno su detektirane tri izoforme CAT, označene prema rastućoj pokretljivosti u gelu kao CAT1, CAT2 i CAT3. U odnosu na kontrolu, u tretmanima sa AgNP s porastom koncentracije slabi i intenzitet obojenja sve tri izoforme, pa su na tretmanima od 100 i 500 µM AgNP vrpce CAT1 i CAT2 slabo vidljive. Nakon tretmana s 25 µM AgNP uočena je najjača ekspresija izoforme CAT3, čiji intenzitet s porastom koncentracije AgNP postepeno slabi. U tretmanima sa $AgNO_3$ vrpca CAT1 nije uočena, dok je izoforma CAT2 imala podjednaku ekspresiju kao u kontrolnom uzorku. Izuzetak je tretman sa 500 µM $AgNO_3$, gdje izoforma CAT2 nije detektirana. Intenzitet vrpce CAT3 bio je jednakog intenzitetu u svim tretmanima s $AgNO_3$, osim na najvišoj koncentraciji od 500 µM, gdje je ekspresija bila nešto slabija.



Slika 44. Aktivnost i izoforme CAT u gelu nakon nativne PAG elektroforeze u korijenu odraslih biljaka duhana koje su tretirane sedam dana u vodenim otopinama AgNP i $AgNO_3$. K - kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 8 – 25 μM $AgNO_3$, 9 – 50 μM $AgNO_3$, 10 – 75 μM $AgNO_3$, 11 – 100 μM $AgNO_3$, 12 – 500 μM $AgNO_3$.

Na Slici 45. prikazana je aktivnost CAT u listovima biljaka duhana nakon izlaganja tretmanima sa AgNP i $AgNO_3$. U kontroli i svim tretmanima eksprimirana je samo jedna izoforma označena kao CAT1, s izuzetkom tretmana s 25 μM $AgNO_3$. Intenzitet obojenja vrpce CAT1 varirao je ovisno o koncentraciji pojedinog tipa tretmana. Najjača ekspresija izoforme CAT1 uočena je u kontrolnom uzorku i nakon tretmana sa 75 μM AgNP i 100 μM $AgNO_3$. Ostale primijenjene koncentracije AgNP i $AgNO_3$ pokazale su slabiji intenzitet obojenja.



Slika 45. Aktivnost i izoforme CAT u gelu nakon nativne PAG elektroforeze u listovima odraslih biljaka duhana koje su tretirane sedam dana u vodenim otopinama AgNP i $AgNO_3$. K - kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$.

4.4. Imunodetekcija antioksidacijskih enzima

Stanične proteine iz klijanaca te listova i korijenja odraslih biljaka duhana razdvojene SDS-PAG elektroforezom prenijela sam na nitroceluloznu membranu metodom mokrog prijenosa (eng. *western blotting*), nakon čega je slijedila imunodetekcija sa specifičnim protutijelima.

4.4.1. Imunodetekcija superoksid dismutaze

4.4.1.1. Klijanci

Na membranama koje prikazuju ekspresiju enzima SOD (Slika 46.) vidljive su dvije vrpce molekulskih masa od 22 kDa (SOD1) i 19 kDa (SOD2). Obje vrpce su bile prisutne u kontroli, kao i klijancima tretiranim sa AgNP i $AgNO_3$. Iako su u tretmanima sa AgNP vrpce SOD1 i SOD2 bile su prisutne na svim koncentracijama, eksprimirane su različitom jačinom intenziteta; vrpca SOD1 bila je najjače je izražena pri koncentraciji od 50 μM AgNP, a SOD2

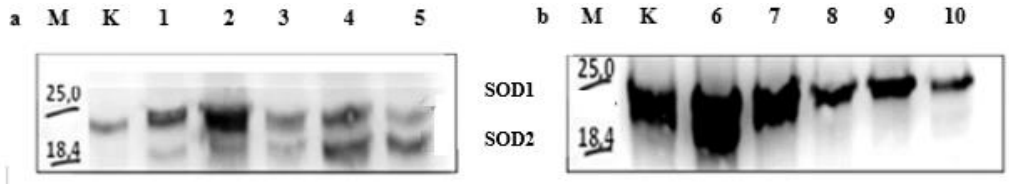
pri 500 μM AgNP (Slika 46a.). U klijanacima koji su rasli na podlogama sa $AgNO_3$ intenzitet vrpci SOD1 i SOD2 bio je ujednačen u svim ispitanim koncentracijama, kao i u usporedbi s kontrolom (Slika 46b.).

Slika 46. Imunodetekcija proteina SOD u klijancima duhana koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale a) AgNP i b) $AgNO_3$. M – biljezi molekulskih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$.

4.4.1.2. Odrasle biljke

Ekspresija enzima SOD u korijenu biljaka duhana izloženih tretmanima s AgNP prikazana je na Slici 47a. Detektirane su dvije vrpce: SOD1 od 22 kDa i SOD2 od19 kDa . Vrpca SOD2 nije bila prisutna u kontrolnom uzorku, dok je njena pojačana ekspresija uočena nakon tretmana sa 100 i 500 μM AgNP. Za razliku od izoforme SOD2, vrpca SOD1 bila je pristutna u kontrolnom uzorku, a najjače je bila eksprimirana u uzorku korijena koji je bio tretiran s 50 μM AgNP.

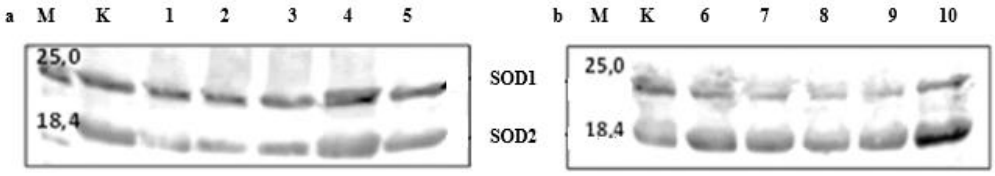
U uzorcima koji su bili tretirani sa $AgNO_3$ detektirana je samo izoforma SOD1, koja je pokazala pojačanu ekspresiju nakon tretmana s 25 μM $AgNO_3$ u odnosu na kontrolu i ostale primijenjene koncentracije $AgNO_3$ (Slika 47b.). Intenzitet se štoviše smanjuje na višim koncentracijama (75, 100 i 500 μM $AgNO_3$).



Slika 47. Imunodetekcija SOD u korijenu odraslih biljaka duhana koje su tretirane sedam dana u vodenim otopinama a) AgNP i b) $AgNO_3$. M – biljezi molekulskih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$.

Slike 48a. i 48b. prikazuju ekspresiju SOD u listovima biljaka duhana tretiranih sa AgNP i $AgNO_3$, u kojima su uočene dvije izoforme ovog enzima molekulskih masa od 19 kDa (SOD1) i 22 kDa (SOD2), koje su bile pristune u svim tretmanima i kontroli.

Na membrani s vrpcama uzoraka tretiranih sa AgNP (Slika 48a.), SOD1 bila je prisutna u kontrolnom uzorku i nakon svih koncentracija tretmana, a najjača ekspresija uočena je na koncentraciji od 100 μM, u odnosu na kontrolu i ostale koncentracije AgNP. Vrpce SOD2 bile su podjednakog intenziteta u svim uzorcima i kontroli. Listovi biljaka koje su bile izložene $AgNO_3$ (Slika 48b.) nisu pokazali velike razlike u ekspresiji vrpci SOD1 i SOD2 u usporedbi s kontrolom, niti međusobno. Izuzetak je bio uzorak tretiran s 500 μM $AgNO_3$, u kojem sam uočila da je vrpca SOD2 bila jačeg intenziteta u odnosu na kontrolu i ostale koncentracije.



Slika 48. Imunodetekcija proteina SOD u listovima odraslih biljaka koje su tretirane sedam dana u vodenim otopinama a) AgNP i b) $AgNO_3$.M – biljezi molekulskih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 - 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$.

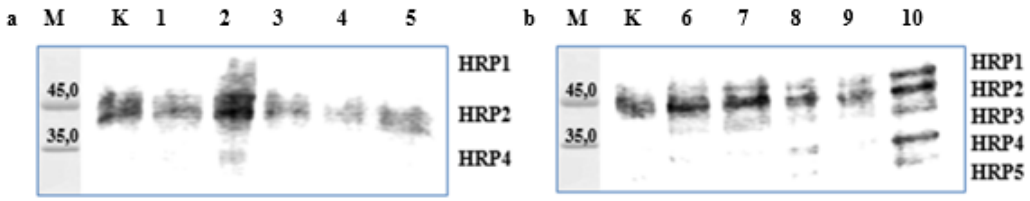
4.4.2. Imuniodetekcija peroksidaze iz hrena

4.4.2.1. Klijanci

Na Slici 49. prikazana je ekspresija proteina peroksidaze iz hrena (eng. *horse radish peroxidase*, HRP). Na membranama je detektirano ukupno pet proteinskih vrpci molekulskih masa od 50 kDa (HRP1), 45 kDa (HRP2), 38 kDa (HRP3), 35 kDa (HRP4) i 30 kDa (HRP5). U kontrolnim uzorcima vidljiva je ekspresija samo vrpce HRP2. U klijancima koji su tretirani s AgNP također je uočena vrpca HRP2, a njen najjači intenzitet detektiran je na koncentraciji od 50 μM; na ostalim tretmanima sa AgNP intenzitet vrpce HRP2 bio je slabiji, čak i u odnosu na kontrolu (Slika 49a.). Nakon tretmana s 50 μM AgNP uočene su i vrpce HRP1 i HRP4, koje nisu bile prisutne u ostalim tretmanima s AgNP.

Klijanci koji su rasli na podlogama s $AgNO_3$ pokazali su veći broj izoformi HRP (Slika 49b.) u odnosu na klijance koji su rasli na podlogama s AgNP. Naime, vrpce HRP1, HRP2 i HRP3 detektirane su na svim koncentracijama, dok su HRP4 i HRP5 bile eksprimirane samo u

tretmanima sa 75 i 500 μM $AgNO_3$. Intenzitet vrpci svih izoformi HRP bio je najjače izražen u klijancima koji su bili tretirani sa 500 μM $AgNO_3$.

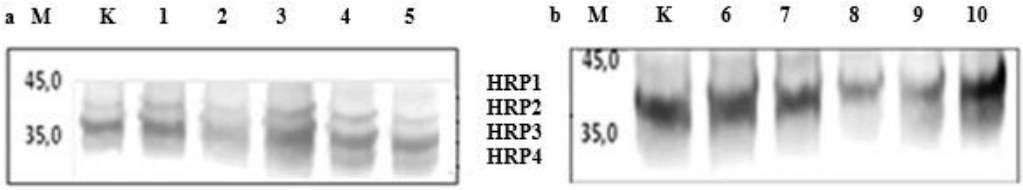


Slika 49. Imunodetekcija proteina HRP u klijancima duhana koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale a) AgNP i b) $AgNO_3$. M – biljezi molekulskih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$.

4.4.2.2. Odrasle biljke

Na Slici 50. prikazana je ekspresija proteina HRP u korijenu kontrolnih biljaka duhana te onih tretiranih s AgNP i $AgNO_3$. Na membranama su detektirane ukupno četiri proteinske vrpce HRP molekulskih masa 45 kDa 30 kDa (HRP1), 38 kDa (HRP2), 35 kDa (HRP3) i 30 kDa (HRP4). U kontroli su nakon AgNP tretmana bile uočene vrpce HRP1, HRP2 i HRP3, a u kontroli nakon $AgNO_3$ tretmana uočena je samo HRP2. Protein HRP2 detektiran je u svim ispitanim koncentracijama AgNP sa sličnim intenzitetom, izuzev koncentracije od 50 μM, gdje je pokazao vrlo slabu ekspresiju (Slika 50a.). Vrpce HRP3 i HRP4 uočila sam samo na tretmanima sa 75, 100 i 500 μM AgNP, a najjaču su ekspresiju pokazale pri 75 μM.

Na Slici 50b., koja prikazuje ekspresiju HRP u uzorcima tretiranima sa $AgNO_3$, vidljiva je samo vrpca HRP2 koja je imala najjaču ekspresiju na koncentraciji od 500 μM.

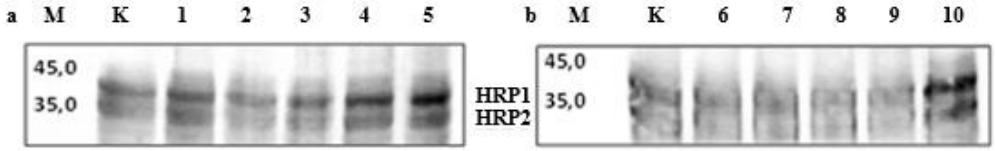


Slika 50. Imunodetekcija proteina HRP u korijenu odraslih biljaka duhana koje su tretirane sedam dana u vodenim otopinama a) AgNP i b) $AgNO_3$. M – biljezi molekulskih masa (kDa), K - kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$.

Na Slici 51. prikazana je ekspresija proteina HRP u listovima biljaka duhana tretiranih sa AgNP i $AgNO_3$. Na membranama su detektirane dvije vrpce molekulskih masa od 35 kDa (HRP1) i 40 kDa (HRP2). U odnosu na kontrolu i druge primijenjene koncentracije AgNP (Slika 51a.), vrpce HRP1 i HRP2 pokazale su slabiju ekspresiju nakon tretmana s 50 i 75 μM, dok je vrpca HRP2 bila jače eksprimirana u listovima nakon tretmana sa 100 i 500 μM AgNP.

U uzorcima koji su bili tretirani sa $AgNO_3$, također su detektirane vrpce HRP1 i HRP2 (Slika 51b.). Izoforma HRP1 bila je jasno vidljiva u kontroli, a znatno slabije eksprimirana u tretmanima sa $AgNO_3$, s iznimkom najviše koncentracije od 500 μM. Izoforma HRP2 također je pokazala najjaču ekspresiju pri najvišoj koncentraciji od 500 μM $AgNO_3$.

.



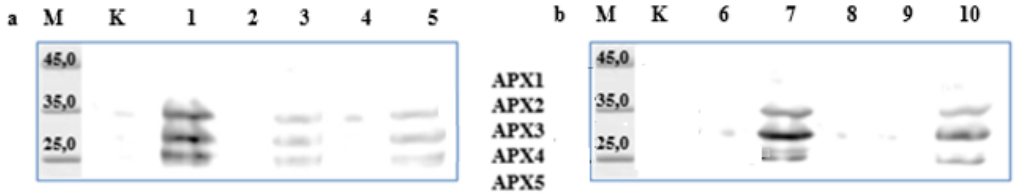
Slika 51. Imunodetekcija proteina HRP u listovima odraslih biljaka duhana koje su tretirane sedam dana u vodenim otopinama a) AgNP i b) $AgNO_3$. M – biljezi molekulskih masa (kDa), K- kontrola, 1- 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$.

4.4.3. Imunodetekcija askorbat peroksidaze

4.4.3.1. Klijanci

Imunodetekcijom APX na membrani nakon tretmana s AgNP i $AgNO_3$ detektirano je pet vrpci ovoga enzima molekulskih masa od 38 kDa (APX1), 35 kDa (APX2), 30 kDa (APX3), 27 kDa (APX4) i 25 kDa (APX5) (Slika 52.). U kontroli je uočena samo APX2, koja je bila vrlo slabog intenziteta (Slika 52a.). U klijancima koji su rasli na podlogama s AgNP uočene su vrpce APX2, APX3 i APX4, a najjači intenzitet vrpci pokazao je tretman s 25 μM AgNP. U klijancima koji su bili tretirani s 50 μM AgNP nije uočena niti jedna vrpca enzima APX, dok je tretman sa 100 pokazao slabi intenzitet vrpce APX2, podjednak kontroli (Slika 52a.).

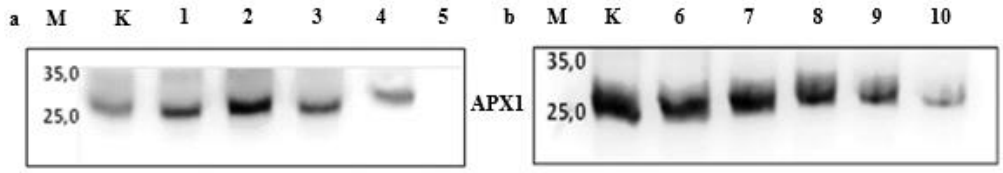
U tretmanima s $AgNO_3$ detektirano je svih pet vrpci APX, no intenzitet im je (osobito APX1 i APX5) pri određenim koncentracijama bio vrlo slab. Intenzitet vrpci osobito APX2, APX3 i APX4, bio je najizraženiji nakon primjene koncentracija od 50 i 500 μM (Slika 52b.).



Slika 52. Imunodetekcija proteina APX u klijancima duhana koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale a) AgNP i b) $AgNO_3$. M – biljezi molekulskih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$.

4.4.3.2. Odrasle biljke

Na Slici 53. prikazana je ekspresija proteina APX u korijenu kontrolnih biljaka duhana te biljaka tretiranih s AgNP i $AgNO_3$, u kojima je detektirana samo jedna proteinska vrpca molekulske mase od 30 kDa, označena sa APX1. U tretmanima s AgNP (Slika 53a.), izoforma APX1 je bila jače izražena u odnosu na kontrolu osobito nakon tretmana s 50 μM AgNP, ali nije bila eksprimirana na koncentraciji od 500 μM. U korijenu biljaka koje su bile izložene tretmanima s $AgNO_3$, intenzitet izoforme APX1 slabio je s povećanjem koncentracije $AgNO_3$, pa je izoforma APX1 u odnosu na kontrolu i ostale tretmane pokazala najjslabiji intenzitet pri najvišoj koncentraciji od 500 μM (Slika 53b.).

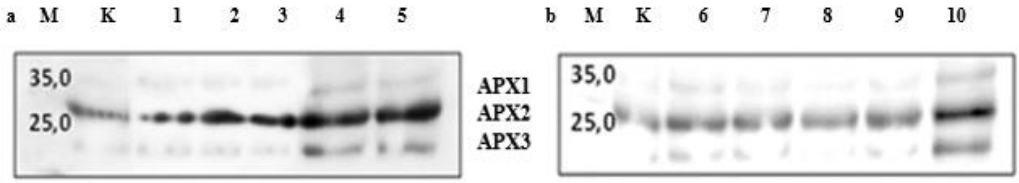


Slika 53. Imunodetekcija proteina APX u korijenu odraslih biljaka duhana koje su tretirane sedam dana u vodenim otopinama a) AgNP i b) $AgNO_3$. M – biljezi molekulskih masa (kDa), K- kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$.

Na Slici 54. je prikazana ekspresija proteina APX u listovima kontrolnih biljaka i biljaka duhana koji su bili tretirani sa AgNP i $AgNO_3$. Detektirane su tri izoforme APX molekulskih masa od 25 kDa (APX3), 30 kDa (APX2) i 35 kDa (APX1). U kontrolnim uzorcima bila je vidljiva samo izoforma APX2, koja je u odnosu na sve primjenjenje koncentracije oba tretmana bila smanjenog intenziteta. Nakon tretmana sa AgNP, najjače je bila eksprimirana vrpca APX2, koja je bila prisutna u kontroli i uzorcima svih primijenjenih koncentracija AgNP, a intenzitet

joj je rastao s porastom koncentracije AgNP. Vrpce APX1 i APX3 bile su jasno vidljive samo nakon izlaganja koncentracijama od 100 i 500 μM, dok su niže koncentracije AgNP pokazale vrlo slabu ekspresiju ove dvije izoforme (Slika 54a.).

Nakon tretmana sa $AgNO_3$, najjači intenzitet ponovo je imala vrpca APX2, čiji je intenzitet rastao s porastom koncentracija $AgNO_3$ i bio najjači pri 500 μM. Izoforme APX1 i APX3 nisu uočene u kontroli, no bile su slabo eksprimirane u tretmanima sa $AgNO_3$, s najjačim intenzitetom na koncentraciji od 500 μM (Slika 54b.).



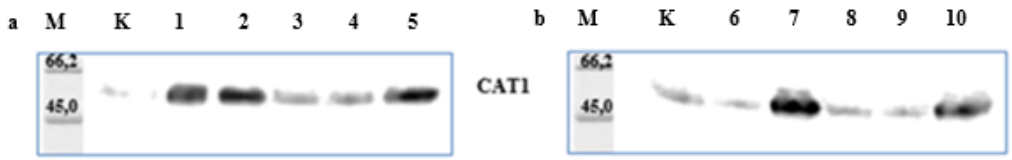
Slika 54. Imunodetekcija proteina APX u odraslim listovima biljaka duhana koje su tretirane sedam dana u vodenim otopinama a) AgNP i b) $AgNO_3$. M – biljezi molekulskih masa (kDa), K- kontrola, 1– 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$.

4.4.4. Imunodetekcija katalaze

4.4.4.1. Klijanci

Na Slici 55. prikazana je ekspresija enzima CAT na membranama nakon tretmana klijanaca s AgNP i $AgNO_3$. U kontroli i svim koncentracijama oba tretmana detektirana je samo jedna izoforma enzima, CAT1, molekulske mase od 57 kDa. Vrpce najjačeg intenziteta pojavile su se u klijancima izloženima djelovanju AgNP u koncentracijama od 25, 50 i 500 μM.

U klijancima koji su bili izloženi tretmanima s $AgNO_3$, vrpca CAT1 bila je podjednakog intenziteta kao u kontroli kod većine koncentracija, a najizraženija je bila pri koncentraciji od 50 μM $AgNO_3$. Također je bila snažnijeg intenziteta i kod 500 μM $AgNO_3$, no u odnosu na 50 μM $AgNO_3$ pokazala je nešto slabiju ekspresiju.. Vrpca CAT1 bila je jače izražena u klijancima tretiranima sa AgNP (Slika 55a.) u odnosu na uzorke tretirane s $AgNO_3$ (Slika 55b.).



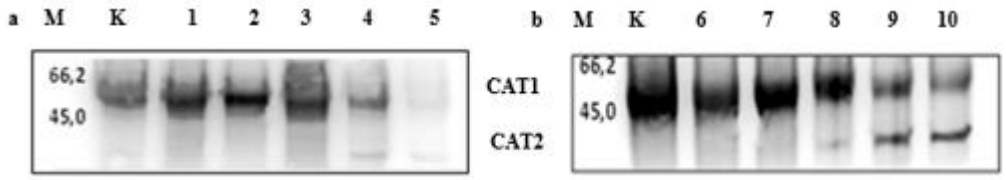
Slika 55. Imunodetekcija proteina CAT u klijancima duhana koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale a) AgNP i b) $AgNO_3$. M – biljezi molekulskih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$.

4.4.4.2. Odrasle biljke

Na Slici 56. prikazana je ekspresija proteina CAT u korijenju biljaka duhana tretiranih sa AgNP i $AgNO_3$. Na membranama su detektirane dvije vrpce molekulskih masa od 60 kDa (CAT1) i 45 kDa (CAT2).

U tretmanima s AgNP, vrpca CAT2 bila je jače eksprimirana u odnosu na vrpcu CAT1, kako u kontroli, tako i na svim primijenjenim koncentracijama (Slika 56a.). Iako je izoforma CAT2 bila eksprimirana na svim tretmanima s AgNP, najjaču ekspresiju imala je na koncentraciji od 75 μM, a najslabiju nakon tretmana s 100 te osobito 500 μM AgNP.

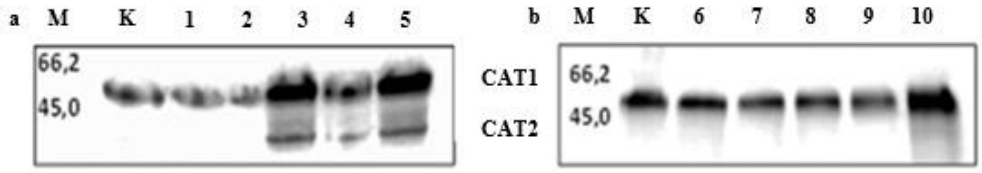
Na membrani, koja prikazuje rezultate analize proteina korijena nakon tretmana s $AgNO_3$, također su vidljive izoforme CAT 1 i CAT2 (Slika 56b.). Vrpca CAT2 bila je eksprimirana na svim ispitanim koncentracijama i kontroli, dok je izoforma CAT1 bila vidljiva samo pri najvećim koncentracijama $AgNO_3$ od 100 i 500 μM. Ukoliko se pri tim najvišim koncentracijama usporede jačine ekspresije CAT1 i CAT2, može se zaključiti da je CAT2 pri istim koncentracijama bila slabije eksprimirana. Naime, najjača ekspresija proteina CAT2 vidljiva je u kontroli, a s porastom koncentracije $AgNO_3$ njena ekspresija slabi.



Slika 56. Imunodetekcija proteina CAT u korijenu odraslih biljaka duhana koje su tretirane sedam dana u vodenim otopinama a) AgNP i b) $AgNO_3$. M – biljezi molekulskih masa (kDa), K- kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$.

Na Slici 57. prikazana je ekspresija CAT u listovima biljaka duhana tretiranih sa AgNP i $AgNO_3$, gdje su uočene dvije vrpce molekulskih masa od 60 kDa (CAT1) i 45 kDa (CAT2). U kontroli je uočena samo CAT1, čija je ekspresija nakon primjene nižih koncentracija AgNP (25 i 50 μM) bila podjednaka, a povećavala se s povećavanjem koncentracija AgNP, pa je najjače bila eksprimirana pri 500 μM (Slika 57a.). CAT2 je bila uočena pri 75, 100 i 500 μM AgNP, no ne i pri nižim koncentracijama, niti u kontroli.

Nakon tretmana sa $AgNO_3$ detektirana je samo vrpca CAT1, koja je bila uočena i u kontrolnom uzorku. Intenzitet CAT1 u kontroli bio je podjednak intenzitetu koji je uočen pri tretmanima koncentracija 25, 50, 75 i 100 μM, a najjači je intenzitet CAT1 imala na koncentraciji od 500 μM $AgNO_3$ (Slika 57b.).



Slika 57. Imunodetekcija CAT u listovima odraslih biljaka duhana koje su tretirane sedam dana u vodenim otopinama a) AgNP i b) $AgNO_3$. M – biljezi molekulskih masa (kDa), K- kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$.

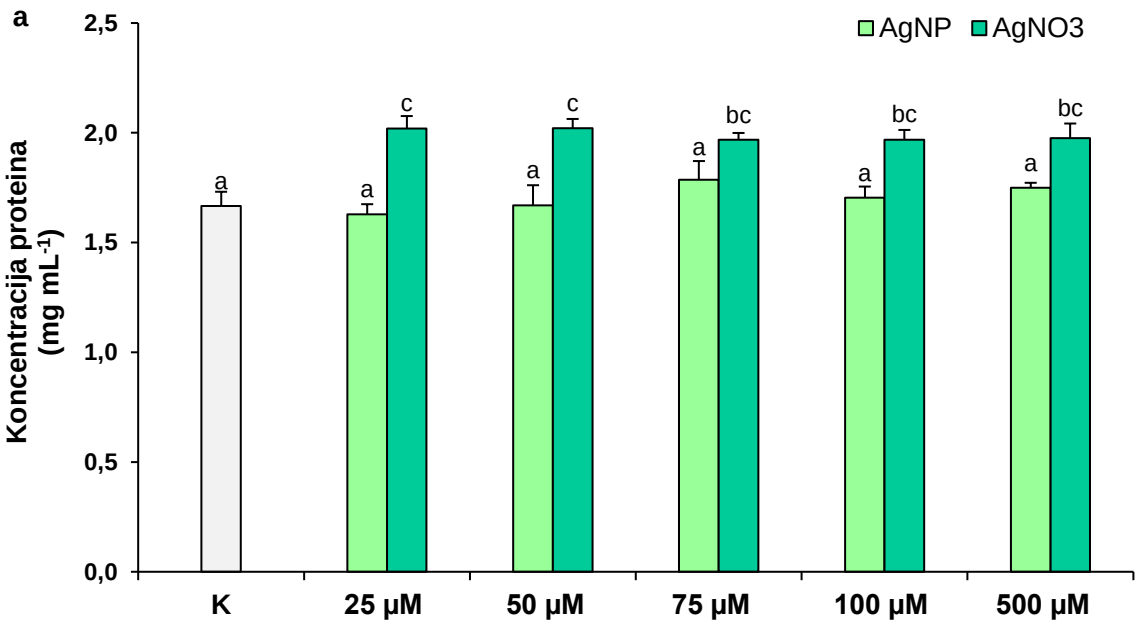
4.5. Koncentracija ukupnih topivih proteina

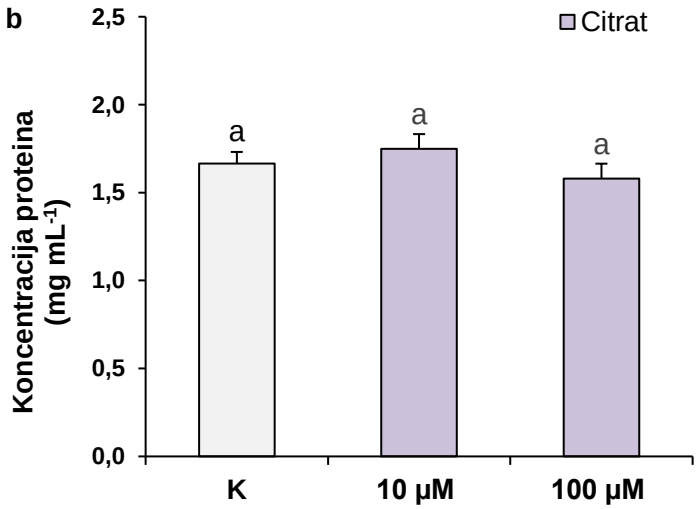
Koncentracija ukupnih topivih proteina određena je kao pokazatelj utjecaja čestica AgNP i ionskog srebra ($AgNO_3$) na stabilnost i ekspresiju proteina u klijancima te korijenu i listu odraslih biljaka duhana. Koncentracija topivih proteina izmjerena je i nakon tretmana sa samim citratnim omotačem primijenjenim u dvije koncentracije (10 i 100 μM) u klijancima te u korijenu odraslih biljaka.

4.5.1. Klijanci

U tkivu klijanaca nije zabilježena statistički značajna razlika u koncentraciji ukupnih topivih proteina u tretmanima sa ispitanim koncentracijama AgNP u odnosu na kontrolu, dok su tretmani sa $AgNO_3$ rezultirali značajno povećanim vrijednostima već od najniže ispitane koncentracije (Slika 58a.).

Izlaganje samom citratnom omotaču primijenjenom u dvije koncentracije (10 i 100 µM) nije pokazalo statistički značajnu razliku u koncentraciji proteina u odnosu na kontrolu (Slika 58b.).





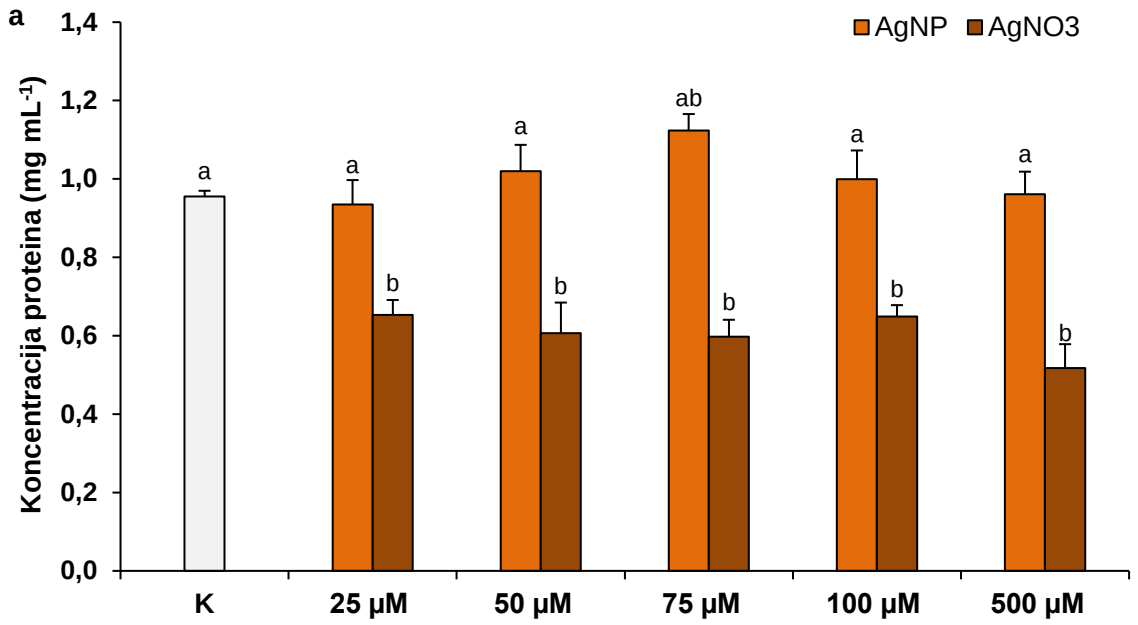
Slika 58. Koncentracija ukupnih topivih proteina u klijancima duhana koji su rasli 30 dana na podlogama s dodatkom a) AgNP i $AgNO_3$, te b) citrata. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

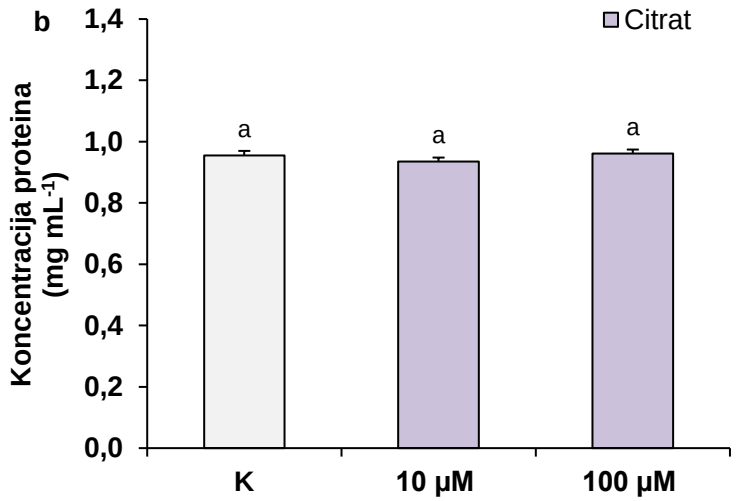
4.5.2. Odrasle biljke

U tkivu korijenja odraslih biljaka nije zabilježena statistički značajna razlika u koncentraciji ukupnih topivih proteina nakon tretmana sa AgNP, za razliku od tretmana sa $AgNO_3$ u kojima je koncentracija proteina bila značajno smanjena u odnosu na kontrolu i tretmane s AgNP (Slika 59a.).

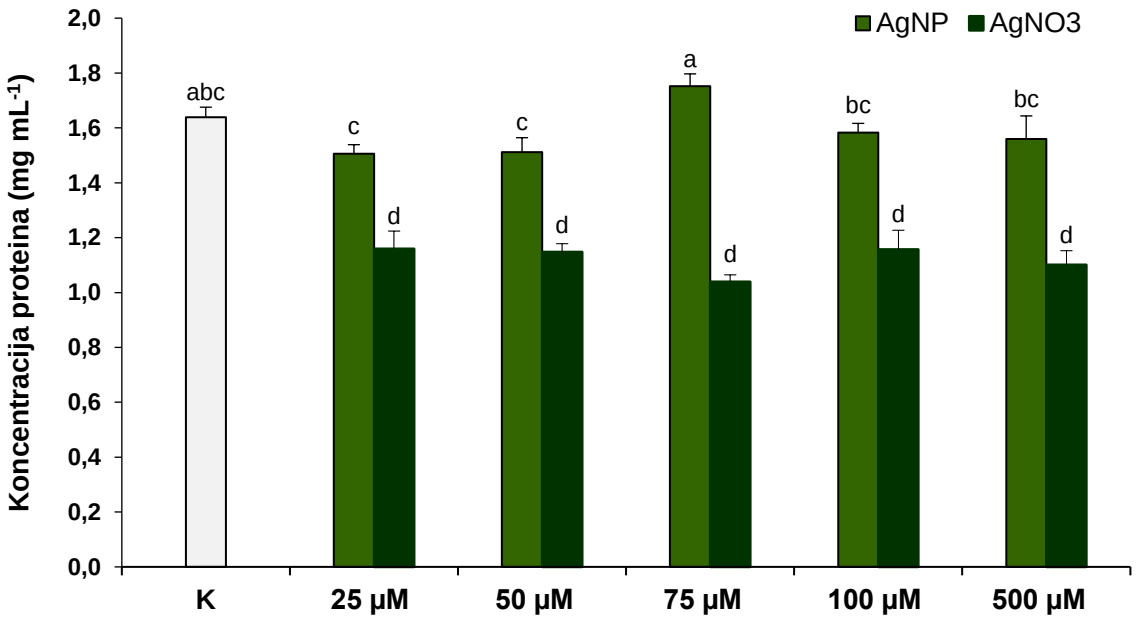
Nakon tretmana sa 10 i 100 μM citratom nije uočena statistički značajna razlika u koncentraciji ukupnih topivih proteina u odnosu na kontrolu (Slika 59b.).

U listovima odraslih biljaka nije dobivena statistički značajna razlika u koncentraciji ukupnih topivih proteina nakon tretmana sa AgNP, za razliku od tretmana sa $AgNO_3$ u kojima su zabilježene smanjene vrijednosti u svim tretmanima u odnosu na kontrolu i tretmane s $AgNO_3$ (Slika 60.).





Slika 59. Koncentracija ukupnih topivih proteina u korijenu odraslih biljaka duhana. Biljke su tretirane sedam dana u vodenim otopinama a) AgNP i $AgNO_3$, te b) citrata. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.



Slika 60. Koncentracija ukupnih topivih proteina u listu odraslih biljaka duhana. Biljke su tretirane sedam dana u vodenim otopinama AgNP i $AgNO_3$. Rezultati prikazani stupcima predstavljaju srednje vrijednosti od šest replika ± standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ($P \leq 0,05$; Duncan test). K – kontrola.

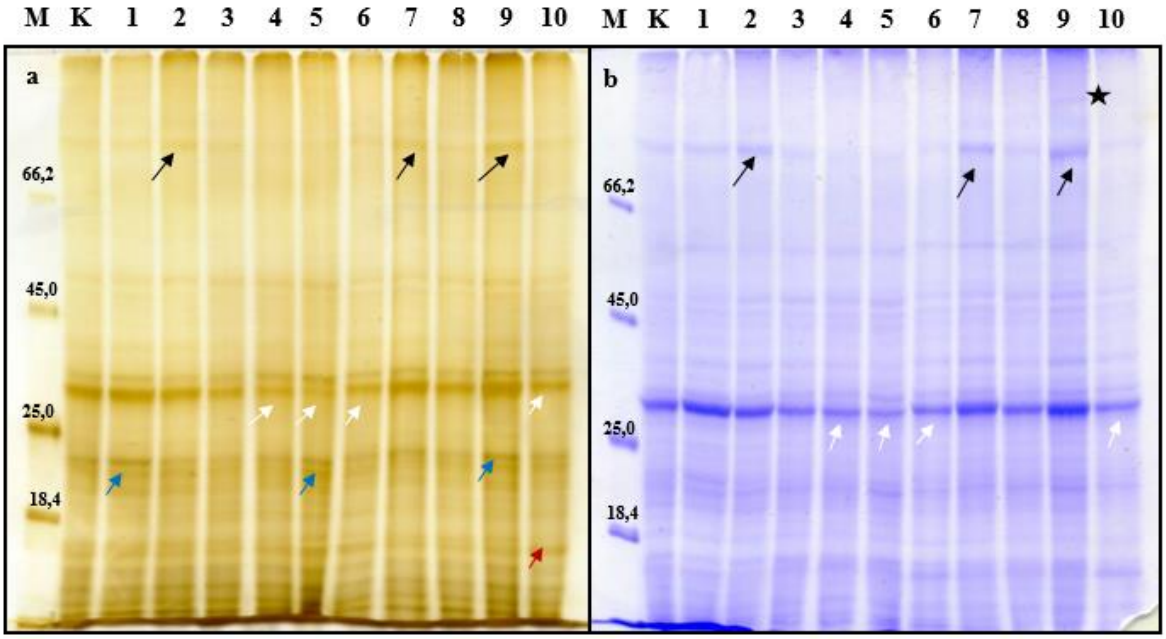
4.6. Ekspresija ukupnih topivih proteina

Ukupni topivi proteini iz klijanaca te korijena i lista odraslih biljaka duhana razdvojeni su SDS-PAG elektroforezom i obojani srebrovim nitratom ($AgNO_3$) i bojom *Comassie Brilliant Blue* (CBB).

4.6.1. Klijanci

Na Slici 61. prikazana je ekspresija ukupnih topivih proteina u klijancima duhana koji su rasli na podlogama sa 25, 50, 75, 100 i 500 μM AgNP i $AgNO_3$. Na gelu bojanom srebrovim nitratom (Slika 61a.) uočava se nekoliko razlika u ekspresiji proteina u odnosu na kontrolu. Vrpca molekulske mase od oko 16 kDa detektirana je u svim uzorcima, osim u uzorku tretiranom s 500 μM $AgNO_3$ (stupac 10; crvena strelica). U tretmanima s 25 i 500 μM AgNP i 100 μM $AgNO_3$ jače je eksprimirana vrpca od oko 23 kDa (stupci 1, 5 i 9; plava strelica). Ekspresija proteina od 30 kDa bila je smanjena u tretmanima sa 100 i 500 μM AgNP te 25 i 500 μM $AgNO_3$ (stupci 4, 5, 6, i 10; bijela strelica). Klijanci tretirani s 50 μM AgNP te s 50 i 100 μM $AgNO_3$ pokazali su jaču ekspresiju proteina molekulske mase od oko 90 kDa (stupci 2, 7 i 9; crna strelica).

Na gelu obojanom bojom CBB (Slika 61b.) uočene su iste razlike u ekspresiji vrpce od 30 kDa (bijele strelice) i 90 kDa (crne strelice) između tretmana kao i na gelu obojanom sa $AgNO_3$. U tretmanu sa 100 μM $AgNO_3$ bila je prisutna vrpca od 110 kDa (stupac 9; zvjezdica), koja nije detektirana u ostalim uzorcima.



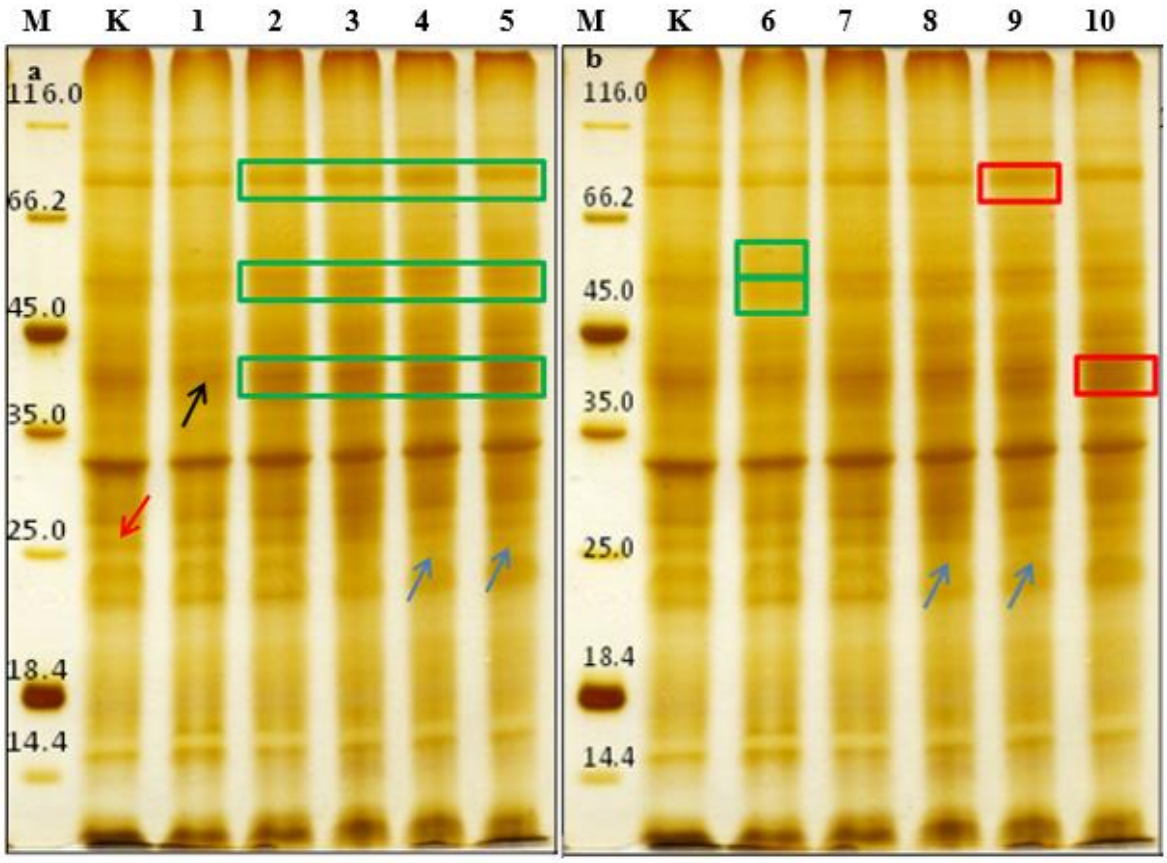
Slika 61. Ekspresija ukupnih topivih proteina u klijancima duhana koji su 30 dana rasli na podlogama s AgNP i $AgNO_3$ nakon SDS-PAG elektroforeze. Gelovi su bojani a) srebrovim nitratom i b) bojom *Comassie Brilliant Blue*. M – biljezi molekulskih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$. Strelice i zvjezdice na slici označavaju primijećene razlike u ekspresiji proteina između različitih uzoraka, a detaljno objašnjenje opisano je u tekstu.

4.6.2. Odrasle biljke

Na gelu bojanom srebrovim nitratom (Slika 62a.), uočila sam nekoliko razlika u ekspresiji proteina u korijenu biljaka duhana izloženih djelovanju AgNP u odnosu na kontrolu. Nakon tretmana sa 100 i 500 μM AgNP nije eksprimirana vrpca molekulske mase od oko 22 kDa (stupac 4 i 5; plava strelica), a uočila sam ekspresiju proteina molekulske mase od 25 kDa (stupac K, crvena strelica). Proteini molekulske mase od oko 40, 50 i 80 kDa imali su jaču ekspresiju na tretmanima sa 50, 75, 100 i 500 μM AgNP u odnosu na kontrolu (zeleni pravokutnik), dok je protein molekulske mase od oko 40 kDa bio slabije izražen nakon izlaganja 25 μM AgNP u odnosu na kontrolu i ostale tretmane (stupac 1; crna strelica).

Nakon izlaganja odraslih biljaka različitim koncentracijama $AgNO_3$, na gelu obojanom srebrovim nitratom primijetila sam da je na tretmanima sa 75 i 100 μM $AgNO_3$ nedostajao protein molekulske mase od 22 kDa (stupac 8 i 9; plave strelice) (Slika 62b.). Tretman sa 25 μM $AgNO_3$ rezultirao je smanjenom ekspresijom proteina molekulske mase od 47 i 50 kDa (stupac 6; zeleni pravokutnici) u odnosu na kontrolu, dok je pojačanu ekspresiju pokazao protein mase od 40 kDa na tretmanu s 500 μM $AgNO_3$ (stupac 10; crveni pravokutnik). U

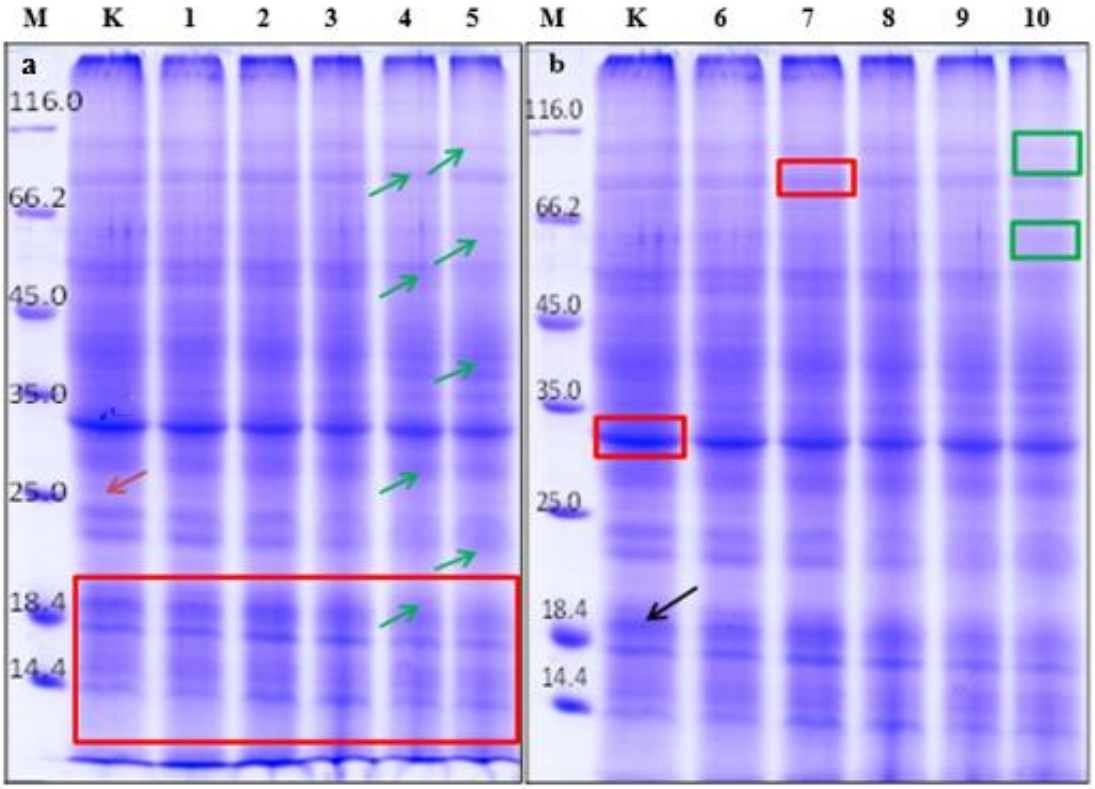
odnosu na ostale tretmane, vrpca molekulske mase od oko 80 kDa bila je jače izražena nakon izlaganja koncentraciji od 100 μM (stupac 9; crveni pravokutnik).



Slika 62. Ekspresija ukupnih topivih proteina u korijenu odraslih biljaka duhana koje su tretirane sedam dana u vodenim otopinama a) AgNP i b) $AgNO_3$ nakon SDS-PAG elektroforeze. Gelovi su obojani srebrovim nitratom. M – biljezi molekulskih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$. Strelice i zvjezdice na slici označavaju primijećene razlike u ekspresiji proteina između različitih uzoraka, a detaljno objašnjenje opisano je u tekstu.

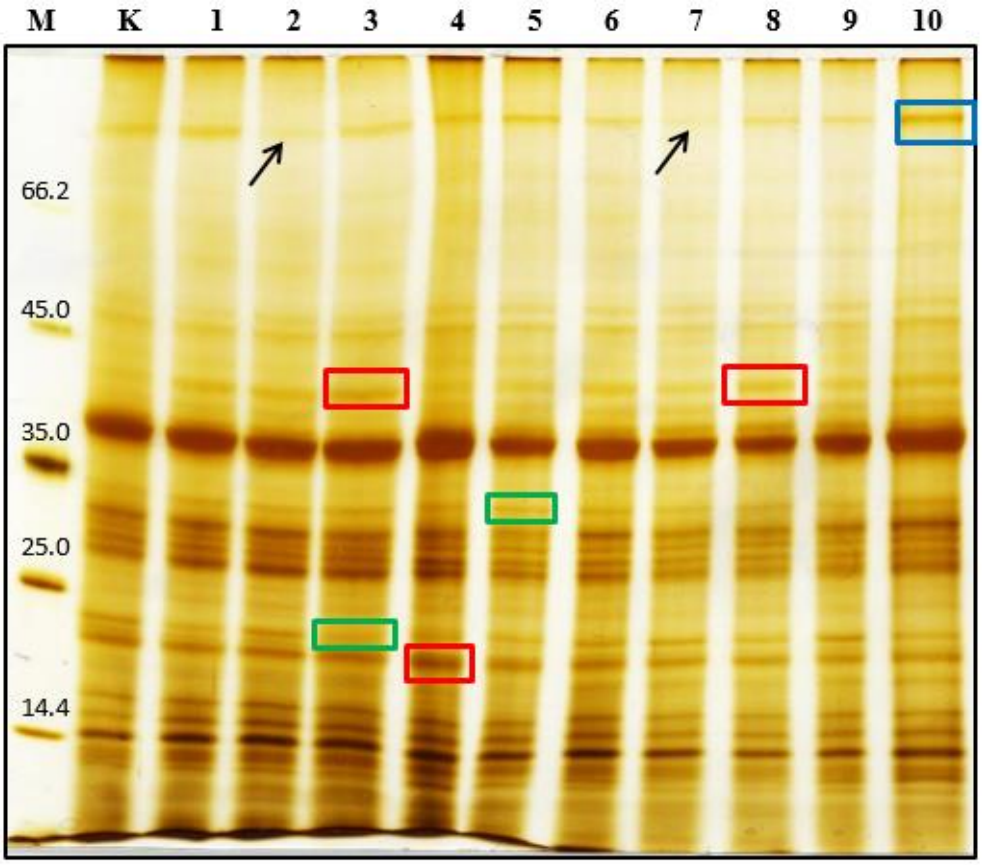
Na gelu koji je obojan bojom CBB uočila sam smanjenu ekspresiju proteina molekulske mase od oko 20, 22, 28, 35, 40, 47, 50, 70 i 90 kDa (stupac 4 i 5; zelene strelice) u korijenu biljaka izloženih djelovanju AgNP u odnosu na kontrolu (Slika 63a.). U odnosu na gel bojan srebrovim nitratom (Slika 62a.), na gelu bojanom s CBB (Slika 63a.) vidljiva je pojačana ekspresija većeg broja proteina molekulskih masa između 12 i 20 kDa (crveni pravokutnik). Iako je detektiran na gelu bojanom srebrovim nitratom (Slika 62a.), protein molekulske mase od 25 kDa nije uočena (stupac K; crvena strelica) na gelu bojanom bojom CBB (Slika 63a.).

Na gelu bojanom bojom CBB (Slika 63b.) uočila sam nekoliko razlika u ekspresiji proteina u korijenu biljaka duhana izloženih $AgNO_3$ u odnosu na kontrolu. Pojačanu ekspresiju pokazali su proteini molekulske mase od 32 kDa (kontrola; crveni pravokutnik) i 80 kDa na koncentraciji od 50 μM (stupac 7; crveni pravokutnik), dok su vrpce molekulske mase od 60 i 100 kDa imale smanjenu ekspresiju nakon tretmana s 500 μM $AgNO_3$ (stupac 10; zeleni pravokutnici). Dok je na Slici 63b protein molekulske mase od 19 kDa detektiran na gelu obojanom sa CBB (crna strelica), isti protein nije bio vidljiv na gelu obojanom srebrovim nitratom (Slika 62b.).



Slika 63. Ekspresija ukupnih topivih proteina u korijenu odraslih biljaka duhana koje su tretirane sedam dana u vodenim otopinama a) AgNP i b) $AgNO_3$ nakon SDS-PAG elektroforeze. Gelovi su bojani bojom *Comassie Brilliant Blue*. M – biljezi molekulskih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$. Strelice i zvjezdice na slici označavaju primijećene razlike u ekspresiji proteina između različitih uzoraka, a detaljno objašnjenje opisano je u tekstu.

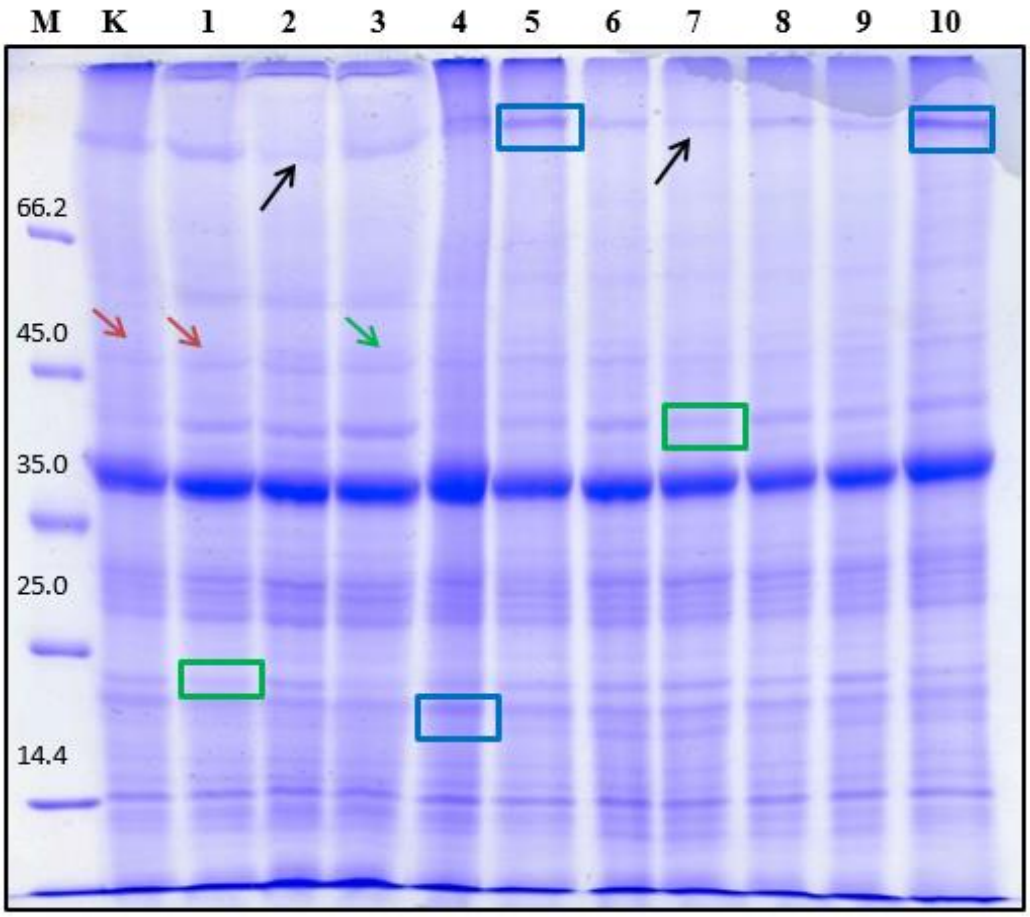
Na gelu bojanom srebrovim nitratom, koji prikazuje ekspresiju proteina listova nakon tretmana s AgNP i $AgNO_3$, uočava se pojačana ekspresija proteina molekulske mase od oko 19 kDa nakon izlaganja 100 µM AgNP (stupac 4; crveni pravokutnik) u odnosu na kontrolu (Slika 64.) Također, jači intenzitet vrpce u odnosu na kontrolu pokazao je protein molekulske mase od oko 40 kDa na tretmanima sa 75 µM AgNP i $AgNO_3$ (stupci 3 i 10; crveni pravokutnik). Smanjenu ekspresiju u odnosu na kontrolu pokazalo je nekoliko proteina: vrpca molekulske mase od oko 20 kDa na tretmanu sa 75 µM AgNP (stupac 3; zeleni pravokutnik); protein od 32 kDa nakon izlaganja 500 µM AgNP (stupac 5; zeleni pravokutnik), te vrpca molekulske mase od oko 90 kDa nakon tretmana sa 50 µM AgNP i $AgNO_3$ (stupac 2, crna strelica i stupac 7, crna strelica). Protein molekulske mase od oko 90 kDa imao je pojačanu ekspresiju nakon 500 µM $AgNO_3$ (stupac 10; plavi pravokutnik).



Slika 64. Ekspresija ukupnih topivih proteina u listovima odraslih biljaka duhana koje su tretirane sedam dana u vodenim otopinama a) AgNP i b) $AgNO_3$ nakon SDS-PAG elektroforeze. Gelovi su bojani srebrovim nitratom. M – biljezi molekulskih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 25 µM AgNP, 2 – 50 µM AgNP, 3 – 75 µM AgNP, 4 – 100 µM AgNP, 5 – 500 µM AgNP, 6 – 25 µM $AgNO_3$, 7 – 50 µM $AgNO_3$, 8 – 75 µM $AgNO_3$, 9 – 100 µM $AgNO_3$, 10 – 500 µM $AgNO_3$. Strelice i zvjezdice na slici označavaju primijećene razlike u ekspresiji proteina između različitih uzoraka, a detaljno objašnjenje opisano je u tekstu.

Na Slici 65. prikazane su promjene u ekspresiji proteina u listovima na gelu bojanom CBB nakon tretmana biljaka sa AgNP i $AgNO_3$. Pojačanu ekspresiju uočila sam za protein molekulske mase od 20 kDa nakon tretmana sa 100 μM AgNP (stupac 4; plavi pravokutnik). Smanjenu ekspresiju pokazale su vrpce od 22 kDa (stupac 1; zeleni pravokutnik) na tretmanu s 25 μM AgNP, te vrpca od 40 kDa nakon izlaganja 50 μM $AgNO_3$ (stupac 7; zeleni pravokutnik). Protein molekulske mase od oko 50 kDa nije detektiran u kontroli ni na tretmanu sa 25 μM AgNP (stupci K i 1; crvena strelica), dok je nakon tretmana s ostalim koncentracijama AgNP i svim koncentracijama $AgNO_3$ bio eksprimiran (npr. stupac 3; zelena strelica).

Na ovom gelu uočila sam iste promjene za protein molekulske mase od oko 90 kDa (stupci 2 i 9; crna strelica i stupac 10; plavi pravokutnik), kao i na gelu obojanom srebrovim nitratom (Slika 64.). Ipak, pri tretmanu od 500 μM AgNP (stupac 5; plavi pravokutnik) uočila sam pojačanu ekspresiju vrpce od 90 kDa, koji nije bila eksprimirana tim intenzitetom na gelu bojanom srebrovim nitratom.



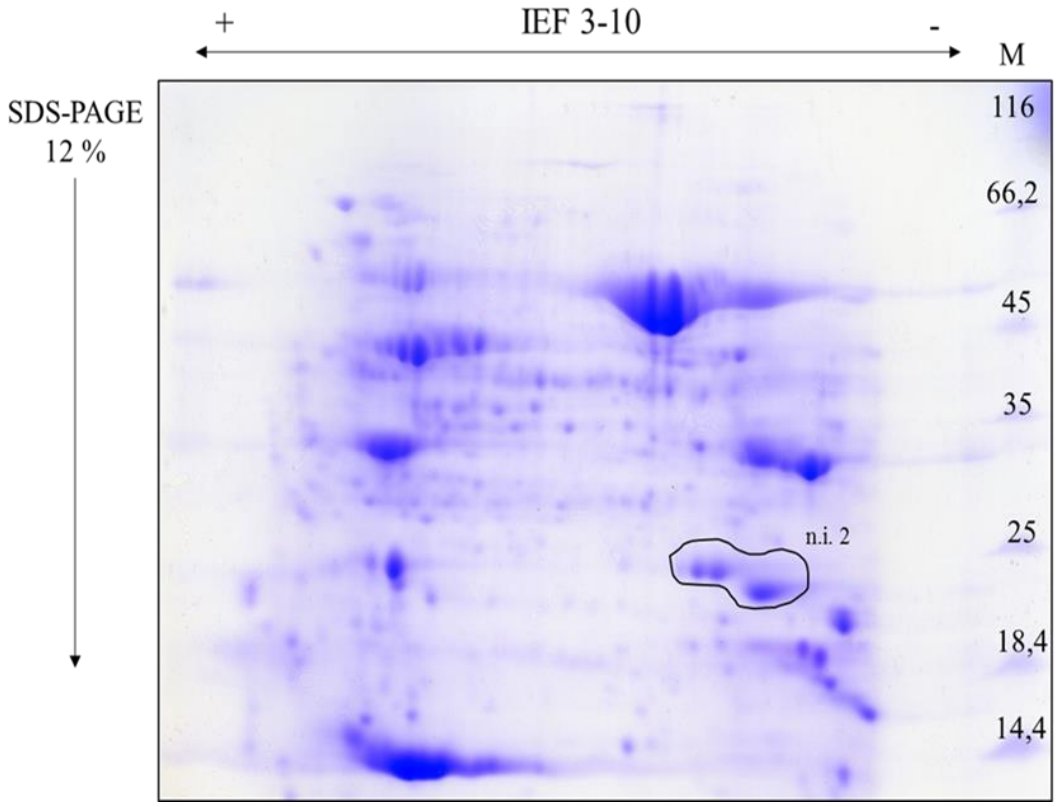
Slika 65. Ekspresija ukupnih topivih proteina u korijenu biljaka duhana koje su tretirane sedam dana u vodenim otopinama a) AgNP i b) $AgNO_3$ nakon SDS-PAG elektroforeze.. Gelovi su bojani bojom *Comassie Brilliant Blue*. M – biljezi molekulskih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 25 μM AgNP, 2 – 50 μM AgNP, 3 – 75 μM AgNP, 4 – 100 μM AgNP, 5 – 500 μM AgNP, 6 – 25 μM $AgNO_3$, 7 – 50 μM $AgNO_3$, 8 – 75 μM $AgNO_3$, 9 – 100 μM $AgNO_3$, 10 – 500 μM $AgNO_3$. Strelice i zvjezdice na slici označavaju primijećene razlike u ekspresiji proteina između različitih uzoraka, a detaljno objašnjenje opisano je u tekstu.

4.7. Identifikacija i kategorizacija proteina

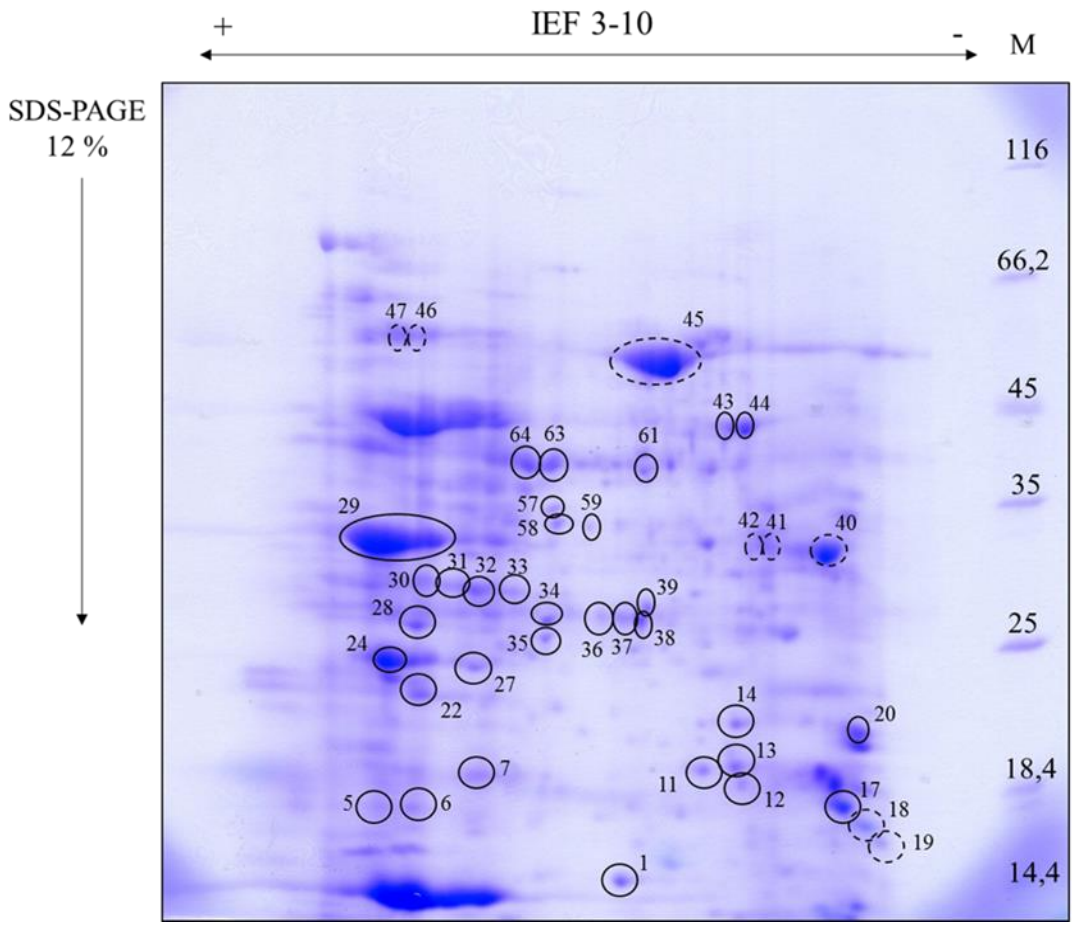
Kako bih detektirala različito eksprimirane stanične proteine nakon tretmana sa 100 μM AgNP i 100 μM $AgNO_3$, u u tkivu klijanaca te u korijenju i listovima odraslih biljaka duhana, ukupne stanične proteine iz navedenih tkiva razdvojila sam dvodimenzionalnom elektroforezom (2-DE) te na dobivenim gelovima usporedila ekspresijske profile proteina. Koncentraciju od 100 μM AgNP, te radi usporedbe rezultata i koncentraciju od 100 μM $AgNO_3$, izabrala sam s obzirom na rezultate koje sam u ovom radu dobila istraživanjem oksidacijskog stresa, kao i mjerenjem aktivnosti te određivanjem ekspresije antioksidacijskih enzima. Naime, pri toj su koncentraciji, kod oba tipa tretmana, promjene u većini parametara bile statistički značajne u odnosu na kontrolu, za razliku od promjena uočenih pri nižim koncentracijama te najvišoj koncentraciji od 500 μM AgNP i $AgNO_3$. Kvantitativnu obradu 2-DE gelova provela sam računalnim programom *Image Master 2D Platinum*, a diferencijalno eksprimirane proteine identificirala sam spektrometrijom masa.

4.7.1. Klijanci

Rezultati kvantitativne obrade 2-D gelova prikazani su na Slikama 66. - 68. U Prilogu 7. prikazani su biološki procesi i stanični odjeljci u kojima sudjeluju identificirani proteini klijanaca duhana te njihove funkcionalne kategorije i razlikovna ekspresija u usporedbi s kontrolom. Od ukupno 66 analiziranih proteinskih mrlja, njih 64 je uspješno identificirano, dok za dvije mrlje identifikacija nije uspjela (mrlje n.i.-2, n.i.-1). U klijancima duhana koji su bili tretirani sa 100 μM AgNP, pojačanu ekspresiju u odnosu na kontrolu pokazale su 33 proteinske mrlje; njih 10 smanjenu ekspresiju, dok su 23 proteina imala jednaku ekspresiju u tretmanu i kontroli. U klijancima duhana tretiranima sa 100 μM $AgNO_3$ pojačanu ekspresiju pokazalo je 58 proteinskih mrlja, smanjenu ekspresiju pokazalo je njih sedam, a samo je jedna proteinska mrlja pokazala jednaku ekspresiju kao kontrola. Proteinski profili ukupnih topivih proteina tkiva klijanaca duhana tretiranih s AgNP i $AgNO_3$ ukazuju na to da najveći broj proteina (32) ima isključivo povećanu ekspresiju, samo pet proteina pokazuje isključivo smanjenu ekspresiju, dok je 29 proteina pokazalo različitu ekspresiju pri različitim tretmanima.



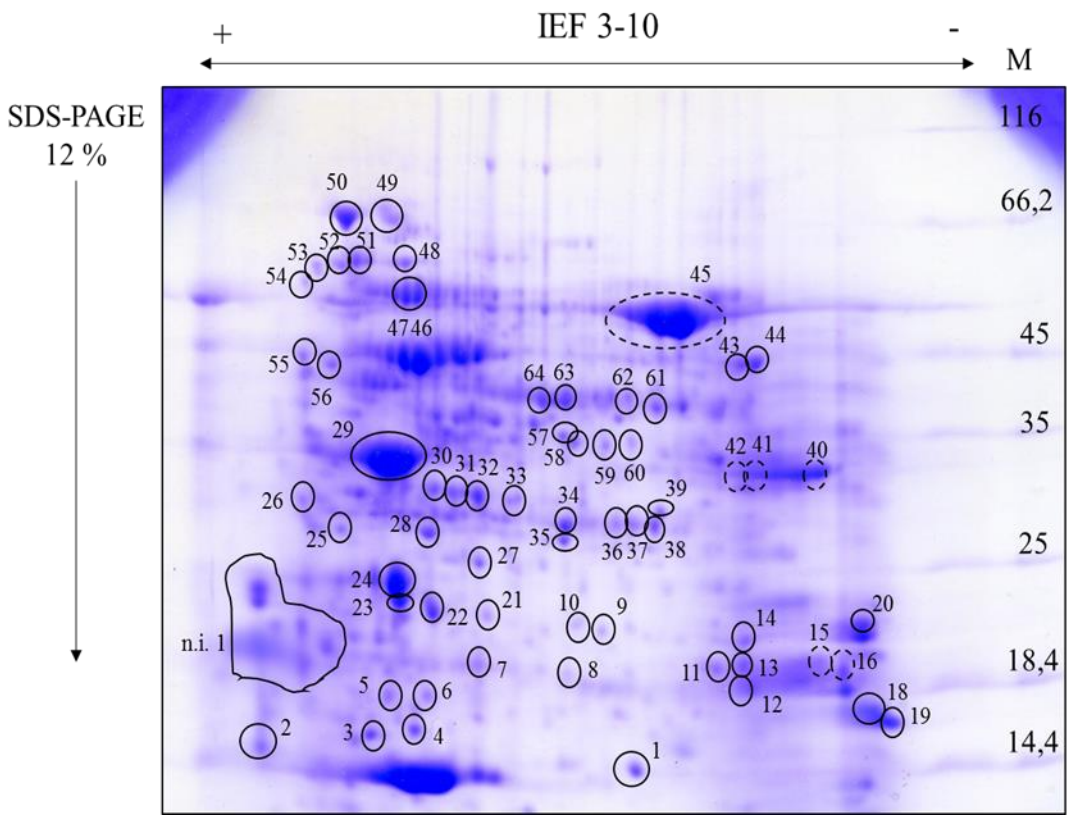
Slika 66. Ukupni topivi proteini klijanaca duhana (kontrola) razdvojeni 2-DE. Gel je obojan bojom CBB i obrađen računalnim programom *Image Master 2D Platinum*. M – biljezi molekulskih masa (kDa), IEF pI 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove mase. Kratica n.i. – nije identificiran.



Slika 67. Ukupni topivi proteini klijanaca duhana tretiranih sa 100 µM AgNP razdvojeni 2-DE. Gel je obojan bojom CBB i obrađen računalnim programom *Image Master 2D Platinum*. M – biljezi molekulskih masa (kDa), IEF pI 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove molekulske mase.

○ - povećana ekspresija identificiranih proteina u odnosu na kontrolu

◌ - smanjena ekspresija identificiranih proteina u odnosu na kontrolu



Slika 68. Ukupni topivi proteini klijanaca duhana tretiranih sa 100 µM $AgNO_3$ razdvojeni 2-DE. Gel je obojan bojom CBB i obrađen računalnim programom *Image Master 2D Platinum*. M – biljezi molekulskih masa (kDa), IEF pI 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove molekulske mase.

○ - povećana ekspresija identificiranih proteina u odnosu na kontrolu

◌ - smanjena ekspresija identificiranih proteina u odnosu na kontrolu

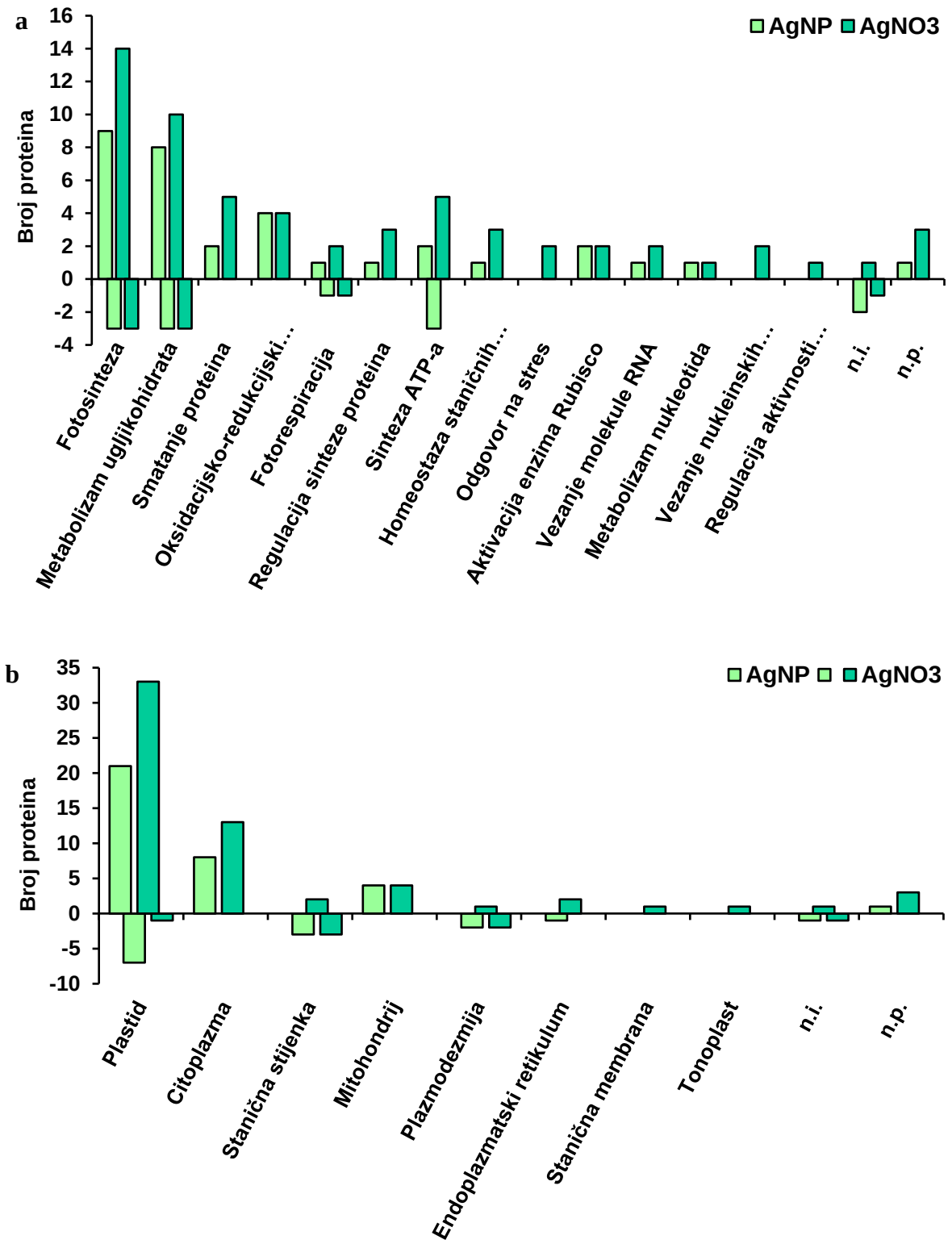
n.i. – nije identificiran

Opisane proteine sistematizirala sam prema biološkim procesima u kojima sudjeluju u 14 kategorija: Fotosinteza, Metabolizam ugljikohidrata, Smatanje proteina, Oksidacijsko-redukcijski procesi, Fotorespiracija, Regulacija sinteze proteina, Sinteza ATP-a, Homeostaza staničnih redoks-reakcija, Odgovor na stres, Aktivacija enzima Rubisco, Vezanje molekule RNA, Metabolizam nukleotida, Vezanje nukleinskih kiselina i alternativni splicing molekule RNA te Regulacija aktivnosti proteina vezanjem iona Ca^{2+} (Prilog 7.). Protein identificiran kao velika podjedinica enzima ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/oksigenaza (Rubisco, mrlje 9, 14, 45) te protein koji je identificiran kao kloroplastni stromalni 70 kDa protein toplinskog šoka (mrlje 49 i 50) svrstala sam u dvije kategorije bioloških procesa (Prilog 7.). Najveći broj identificiranih proteina uključen je u proces Fotosinteze (18 proteina ili 25%), a zatim slijede Metabolizam ugljikohidrata (13 proteina ili 18%), Smatanje proteina (devet proteina ili 12%) te Regulacija sinteze proteina, Sinteza ATP-a i Oksido - redukcijski procesi (po četiri proteina, ili svaki po 5%). Ostale kategorije bioloških procesa zastupljene su s udjelima jednakima ili manjima od 3% (Prilog 7.).

Kategorizacija analiziranih proteina prema navedenim biološkim procesima u odnosu na njihovu razlikovnu ekspresiju i pojedinačni tretman s AgNP i $AgNO_3$ prikazana je na Slici 69a. Nakon tretmana klijanaca duhana s AgNP, najveći broj proteina pokazao je povećanu ekspresiju u kategorijama Fotosinteza, Metabolizam ugljikohidrata i Oksidacijsko - redukcijski procesi, a nakon tretmana s $AgNO_3$ također u kategorijama Fotosinteza i Metabolizam ugljikohidrata, ali i u kategorijama Smatanje proteina i Sinteza ATP-a. Nakon oba tipa tretmana najveći broj proteina smanjene ekspresije pripadao je biološkim procesima Fotosinteza i Metabolizam ugljikohidrata te Sinteza ATP-a. Smanjena ekspresija zabilježena je i za proteine iz kategorije Fotorespiracija te Neidentificirani proteini, nakon oba tipa tretmana. Proteini svih ostalih skupina bioloških procesa pokazali su isključivo povećanu razlikovnu ekspresiju nakon tretmana s AgNP i/ili $AgNO_3$ (Slika 69a.).

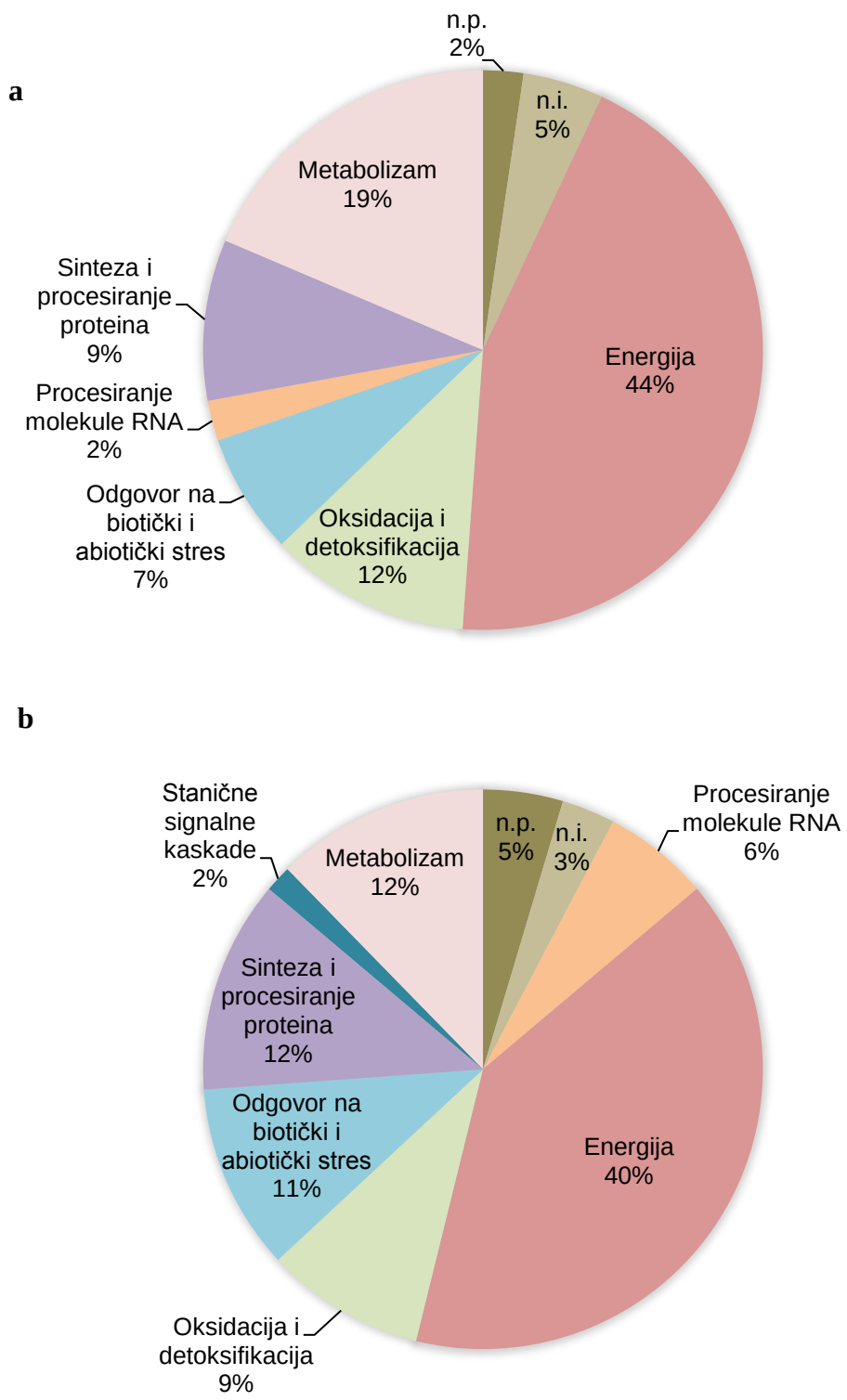
Proteini su klasificirani i prema staničnom odjeljku, čime je utvrđeno da najveći broj proteina pripada proteinima Plastida (36) i Citoplazme (13) nakon oba tipa tretmana. Značajno manji broj proteina zabilježen je u kategoriji Stanična stijenka (pet), Mitohondrij (četiri), Plazmodezmija (tri), Endoplazmatski retikulum (dva) te Stanična membrana i Tonoplast (po jedan protein) (Prilog 7.). Analiza ekspresije proteina prema staničnim odjeljcima prikazana je na Slici 69b.; nakon tretmana s $AgNO_3$ pojačanu ekspresiju pokazalo je 33 proteina Plastida, a nakon tretmana s AgNP 21 protein istog staničnog odjeljka. Smanjena ekspresija proteina

Plastida zabilježena je za sedam proteina nakon tretmana s AgNP i jednog proteina nakon tretmana s $AgNO_3$. Među proteinima Citoplazme pojačanu ekspresiju pokazalo je 13 proteina nakon tretmana s $AgNO_3$ i osam proteina nakon tretmana s AgNP. Osim proteina Plastida, proteini sa smanjenom ekspresijom nakon oba tipa tretmana zabilježeni su i u odjeljku Stanična stijenka (šest) i Plazmodezmija (četiri) te nakon tretmana sa AgNP u odjeljku Endoplazmatski retikulum (jedan), iako su u navedenim staničnim odjeljcima zabilježeni i proteini pojačane ekspresije, ali samo nakon tretmana s $AgNO_3$. Proteini Mitohondrija pokazali su pojačanu ekspresiju nakon oba tipa tretmana, a proteini Stanične membrane i Tonoplasta nakon izlaganja klijanaca ionskom srebru ($AgNO_3$) (Slika 69b.).



Slika 69. Kategorizacija identificiranih proteina prema a) biološkim procesima i b) staničnim odjeljcima u odnosu na razlikovnu ekspresiju koju su pokazali proteini klijanaca tretirani s AgNP ili $AgNO_3$. Na pozitivnoj osi ordinate prikazan je broj proteina povećane ekspresije, a na negativnoj broj proteina smanjene ekspresije. n.i. – nije identificiran, n.p. – nije pronađen.

Analizirani proteini također su razvrstani prema funkcionalnim kategorijama (Prilog 7.). Proteini identificirani u klijancima nakon tretmana s AgNP podijeljeni su u šest funkcionalnih kategorija: Energija, Metabolizam, Oksidacija i detoksifikacija, Sinteza i procesiranje proteina, Odgovor na biotički i abiotički stres te Procesiranje molekule RNA (Slika 70a.), dok je za proteine identificirane nakon tretmana s $AgNO_3$ utvrđena i dodatna kategorija, Stanične signalne kaskade (Slika 70b.). Analiza zastupljenosti proteina po funkcionalnim kategorijama pokazuje da proteini u najvećoj mjeri pripadaju kategorijama Energija (tretman AgNP 44%; tretman $AgNO_3$ 40%) i Metabolizam (tretman AgNP 19%; tretman $AgNO_3$ 12%). U tretmanu s AgNP slijede Oksidacija i detoksifikacija s udjelom od 12%, Sinteza i procesiranje proteina s udjelom od 9% i Odgovor na biotički i abiotički stres s udjelom od 7% proteina (Slika 70a.). U klijancima tretiranim s $AgNO_3$ proteini koji pripadaju kategorijama Sinteza i procesiranje proteina te Metabolizam zastupljeni su s jednakim udjelom od 12%, a slijede proteini koji sudjeluju u Odgovoru na biotički i abiotički stres (11%), Oksidaciji i detoksifikaciji (9%) te u Procesiranju molekule RNA (6%) (Slika 70b.). Udjeli proteina u preostalim funkcionalnim kategorijama jednaki su ili manji od 5%, nakon oba tipa tretmana (Slika 70a. i 70b.).

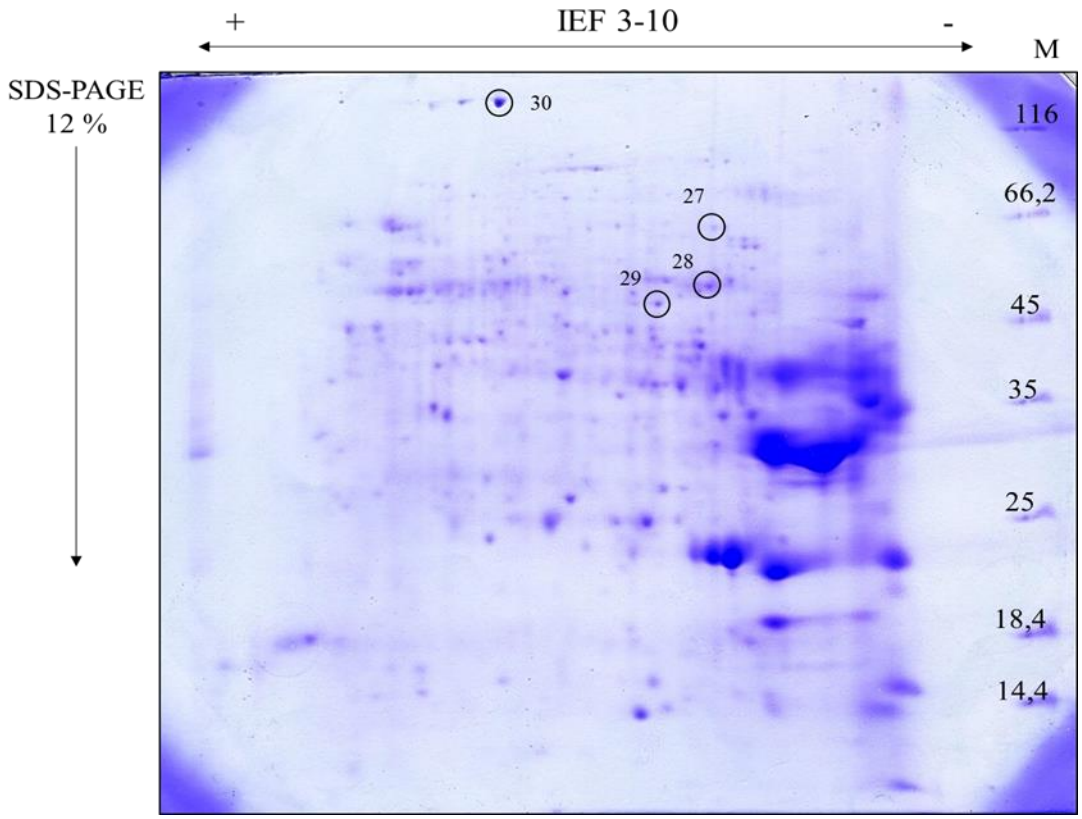


Slika 70. Udio proteina u pojedinim funkcionalnim kategorijama između ukupnih proteina iz klijanaca duhana koji su pokazali razlikovnu ekspresiju nakon tretmana s a) AgNP i b) $AgNO_3$. Kratice: n.i. – nije identificiran, n.p. – nije pronađen.

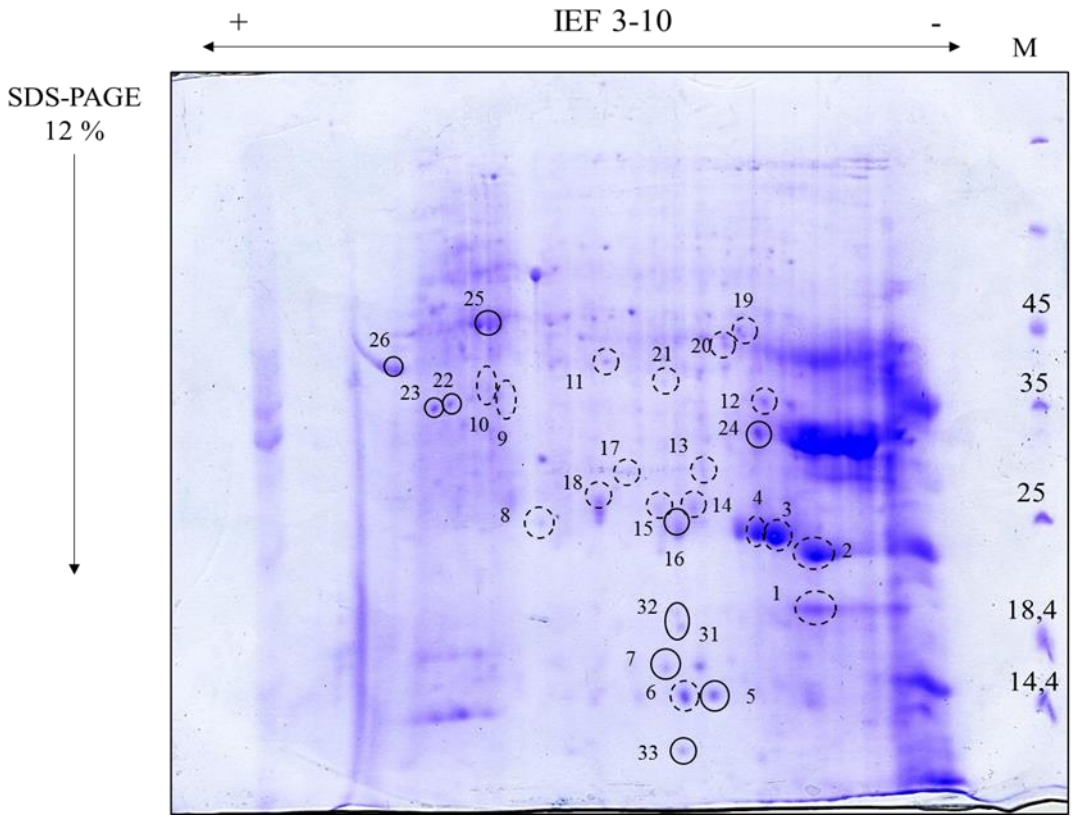
4.7.2. Korijen

Rezultati kvantitativne obrade 2-D gelova prikazani su na Slikama 71. - 73. U Prilogu 8. prikazani su biološki procesi i stanični odjeljci u kojima sudjeluju identificirani proteini korijena duhana te njihove funkcionalne kategorije i razlikovna ekspresija u usporedbi s kontrolom. Uspješno je identificirano 27 proteinskih mrlja, a za šest mrlja identifikacija nije uspjela (mrlje 3, 4, 5, 7, 26 i 33). U tkivu korijenja biljke koja je bila tretirana s AgNP, 11 proteina pokazalo je pojačanu ekspresiju, a 22 smanjenu ekspresiju. U tkivu korijena biljke tretirane s $AgNO_3$, pojačanu ekspresiju pokazalo je 11 proteina, njih 18 imalo je smanjenu ekspresiju, dok su tri proteina pokazala ekspresiju jednaku kontroli. Proteinski profili ukupnih topivih proteina tkiva korijenja biljaka duhana tretiranih s AgNP i $AgNO_3$ pokazuju da 18 proteina ima smanjenu ekspresiju, 10 proteina ima povećanu ekspresiju, a svega pet proteina različitu ekspresiju ovisno o tretmanu (Prilog 8.).

Identificirane proteine sistematizirala sam prema biološkim procesima u kojima sudjeluju u 10 kategorija: Odgovor na stres, Metabolizam ugljikohidrata, Obrana od gljivica i bakterija, Rast i razvoj biljaka, Oksidacijsko-redukcijski procesi, Glikozilacija proteina, Organizacija kloroplasta, Sinteza ATP-a, Metabolizam nukleotida i Metabolizam aminokiselina (Prilog 8.). Mogući prekursor receptora *Rhicadhesin* (mrlje 14, 15 i 18) te protein sličan alfa-manozidazi (mrlja 27) svrstala sam u dvije kategorije bioloških procesa (Prilog 8.). Najveći broj identificiranih proteina sudjeluje u Odgovoru na stres (devet proteina ili 33%), a zatim slijede Metabolizam ugljikohidrata (pet proteina ili 18%), Obrana od gljivica i bakterija (tri proteina ili 11%) te u Rast i razvoj biljaka (dva proteina ili 7%). Ostale kategorije bioloških procesa zastupljene su s udjelima jednakima ili manjima od 4% (Prilog 8.).



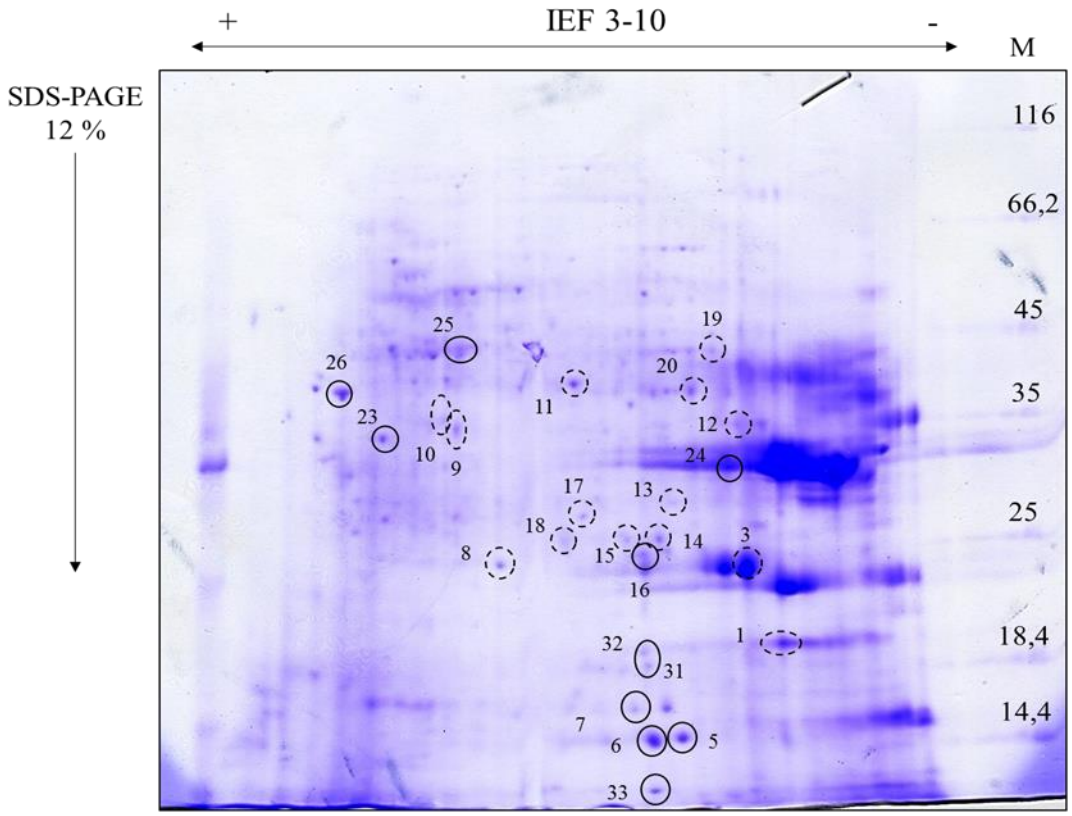
Slika 71. Ukupni topivi proteini korijena biljaka duhana (kontrola), koji su razdvojeni 2-DE. Gel je obojan bojom CBB i obrađen računalnim programom *Image Master 2D Platinum*. M – biljezi molekulskih masa (kDa), IEF pI 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove molekulske mase.
○ - povećana ekspresija identificiranih proteina u odnosu na tretmane



Slika 72. Ukupni topivi proteini korijena biljaka duhana tretiranih sa 100 µM AgNP, koji su razdvojeni 2-DE. Gel je obojan bojom CBB i obrađen računalnim programom *Image Master 2D Platinum*. M – biljezi molekulskih masa (kDa), IEF pI 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove molekulske mase.

○ - povećana ekspresija identificiranih proteina u odnosu na kontrolu

◌ - smanjena ekspresija identificiranih proteina u odnosu na kontrolu



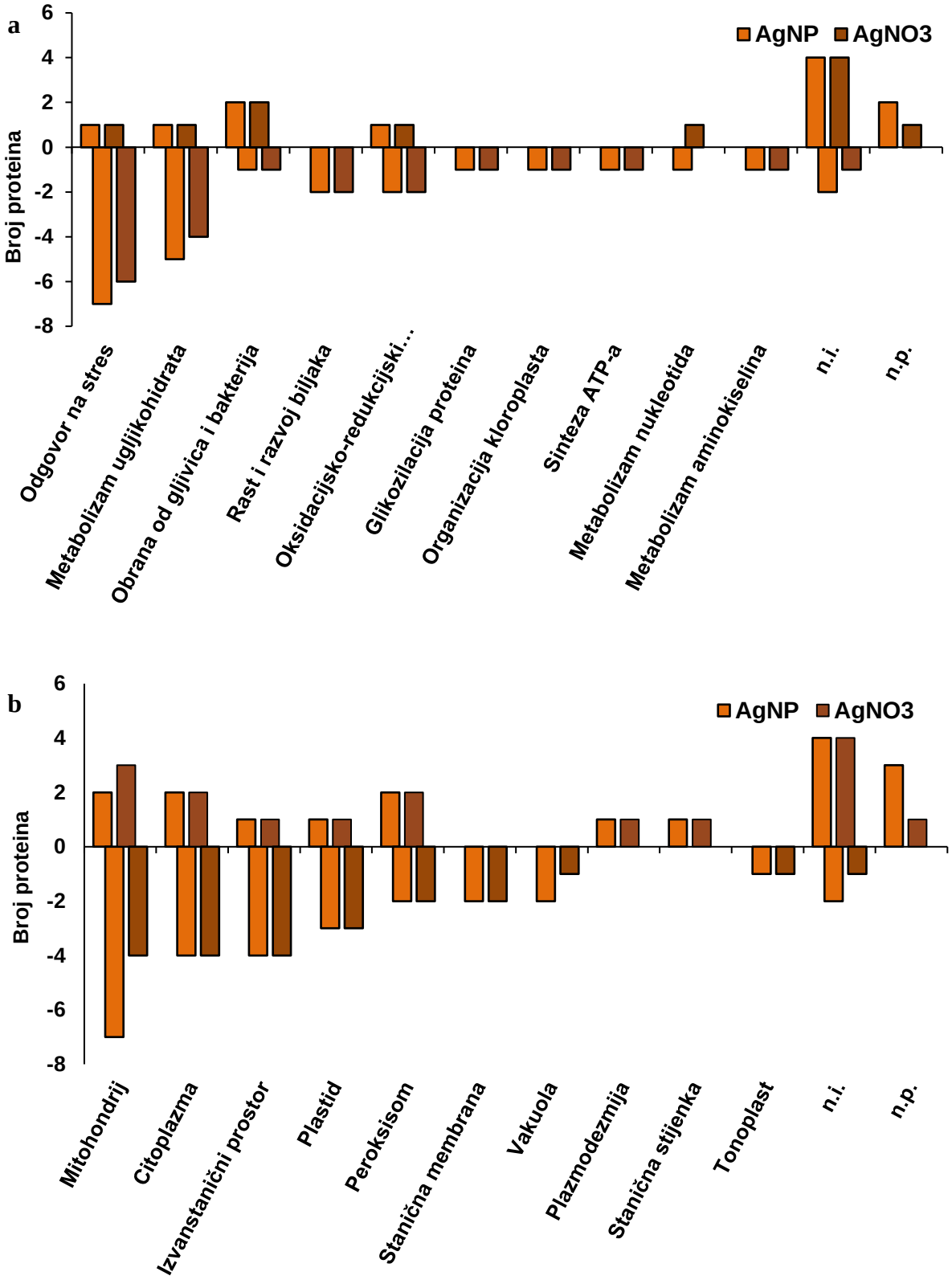
Slika 73. Ukupni topivi proteini korijena biljaka duhana tretiranih sa 100 µM $AgNO_3$, koji su razdvojeni 2-DE. Gel je obojan bojom CBB i obrađen računalnim programom *Image Master 2D Platinum*. M – biljezi molekulskih masa (kDa), IEF pI 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS–PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove molekulske mase

○ - povećana ekspresija identificiranih proteina u odnosu na kontrolu,

◌ - smanjena ekspresija identificiranih proteina u odnosu na kontrolu

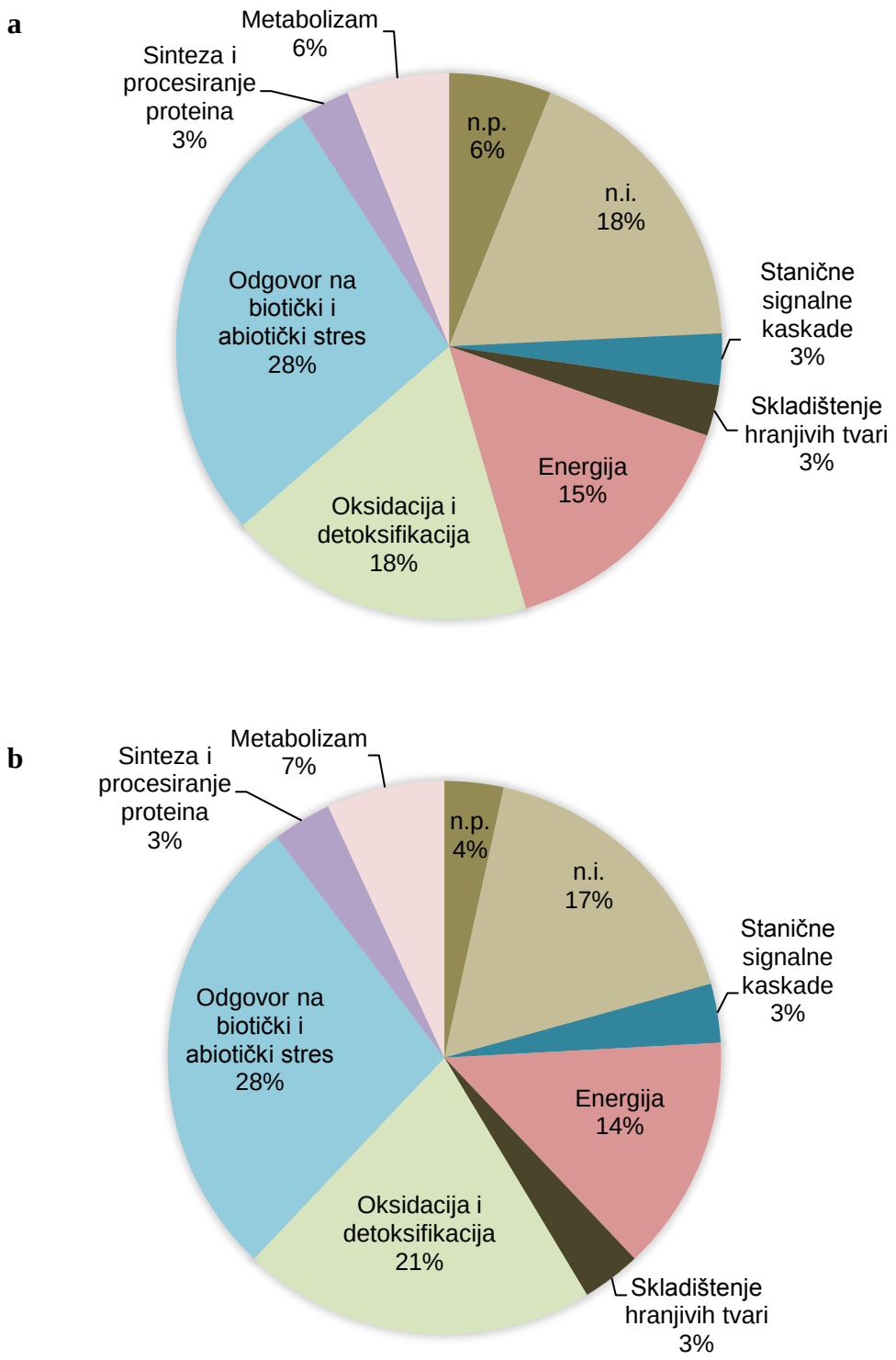
Identificirane proteine sistematizirala sam prema biološkim procesima u kojima sudjeluju u 10 kategorija: Odgovor na stres, Metabolizam ugljikohidrata, Obrana od gljivica i bakterija, Rast i razvoj biljaka, Oksidacijsko-redukcijski procesi, Glikozilacija proteina, Organizacija kloroplasta, Sinteza ATP-a, Metabolizam nukleotida i Metabolizam aminokiselina (Prilog 8.). Mogući prekursor receptora *Rhicadhesin* (mrlje 14, 15 i 18) te protein sličan alfa-manozidazi (mrlja 27) svrstala sam u dvije kategorije bioloških procesa (Prilog 8.). Najveći broj identificiranih proteina sudjeluje u Odgovoru na stres (devet proteina ili 33%), a zatim slijede Metabolizam ugljikohidrata (pet proteina ili 18%), Obrana od gljivica i bakterija (tri proteina ili 11%) te u Rast i razvoj biljaka (dva proteina ili 7%). Ostale kategorije bioloških procesa zastupljene su s udjelima jednakima ili manjima od 4% (Prilog 8.). Kategorizacija identificiranih proteina prema navedenim biološkim procesima u odnosu na njihovu razlikovnu ekspresiju prikazana je na Slici 74a. na kojoj je vidljivo da je većina identificiranih proteina pokazala smanjenu ekspresiju u većini bioloških procesa nakon oba tipa tretmana. Izuzetak je bila kategorija Obrana od gljivica i bakterija, gdje je veći broj proteina pokazao pojačanu ekspresiju nakon oba tipa tretmana. Najveći broj proteina smanjenje ekspresije zabilježen je u biološkim procesima Odgovor na stres (13) i Metabolizam ugljikohidrata (devet), iako je manji broj proteina pokazao i pojačanu ekspresiju. Proteini bioloških procesa Rast i razvoj biljaka, Glikozilacija proteina, Organizacija kloroplasta, Sinteza ATP-a i Metabolizam aminokiselina pokazali su isključivo smanjenu ekspresiju nakon oba tipa tretmana.

Proteini su klasificirani i s obzirom na stanični odjeljak, a najveći broj proteina svrstan je u proteine Mitohondrija (devet), Citoplazme (šest) i Izvanstaničnog prostora (pet), nešto manji broj u proteine Peroksisoma (četiri) i Plastida (tri) te Stanične membrane i Vakuole (po dva). Po jedan protein svrstan je u proteine Tonoplasta, Stanične stijenke i Plazmodezmija (Prilog 8.). Analiza ekspresije proteina prema staničnim odjeljcima prikazana je na Slici 74b. Nakon tretmana s AgNP, najveći broj proteina smanjene ekspresije (sedam) zabilježen je za Mitohondrij, dok su nakon tretmana s $AgNO_3$ četiri proteina Mithondrija imala smanjenu ekspresiju. Istom staničnom odjeljku pripadali su i proteini pojačane ekspresije; tri proteina nakon tretmana s $AgNO_3$ te dva proteina nakon tretmana s AgNP. U Citoplazmi i Izvanstaničnom prostoru smanjenu ekspresiju nakon oba tipa tretmana imala su po četiri proteina, a povećana je ekspresija za svaki tretman detektirana za dva proteina. Proteini Plastida i Peroksisoma sadržavali su proteine i smanjene i pojačane ekspresije, proteini Stanične membrane, Vakuole i Tonoplasta pokazali su isključivo smanjenu ekspresiju, dok su svi proteini Plazmodezmija i Stanične stijenke bili pojačane ekspresije.



Slika 74. Kategorizacija identificiranih proteina prema a) biološkim procesima i b) staničnim odjeljcima u odnosu na razlikovnu ekspresiju proteina iz korijena odraslih biljaka duhana tretiranih s AgNP ili $AgNO_3$. Na pozitivnoj osi ordinate prikazan je broj proteina povećane ekspresije, a na negativnoj broj proteina smanjene ekspresije. Kratice: n.i. – nije identificiran, n.p. – nije pronađen.

Identificirane proteine razvrstala sam i prema funkcionalnoj kategoriji (Prilog 8.) te je za proteine korijena biljaka tretiranih s AgNP i $AgNO_3$ utvrđeno sedam istih funkcionalnih kategorija: Stanične signalne kaskade, Skladištenje hranjivih tvari, Energija, Oksidacija i detoksifikacija, Odgovor na biotički i abiotički stres, Sinteza i procesiranje proteina i Metabolizam. Udjeli pojedinih funkcionalnih kategorija identificiranih proteina korijena nakon tretmana biljaka s AgNP prikazani na Slici 75a., a nakon tretmana s $AgNO_3$ na Slici 75b. Proteini u najvećoj mjeri pripadaju funkcionalnim kategorijama Odgovor na biotički i abiotički stres (za oba tretmana 28%), zatim Oksidacija i detoksifikacija (tretman s AgNP 18%; tretman s $AgNO_3$ 21%) te funkcionalnim kategorijama Energija (tretman s AgNP 15%; tretman s $AgNO_3$ 14%) i Metabolizam (tretman s AgNP 6%; tretman s $AgNO_3$ 7%). Udjeli proteina preostalih kategorija sudjeluju sa po 3% u oba tretmana (Slika 75a. i 75b.).

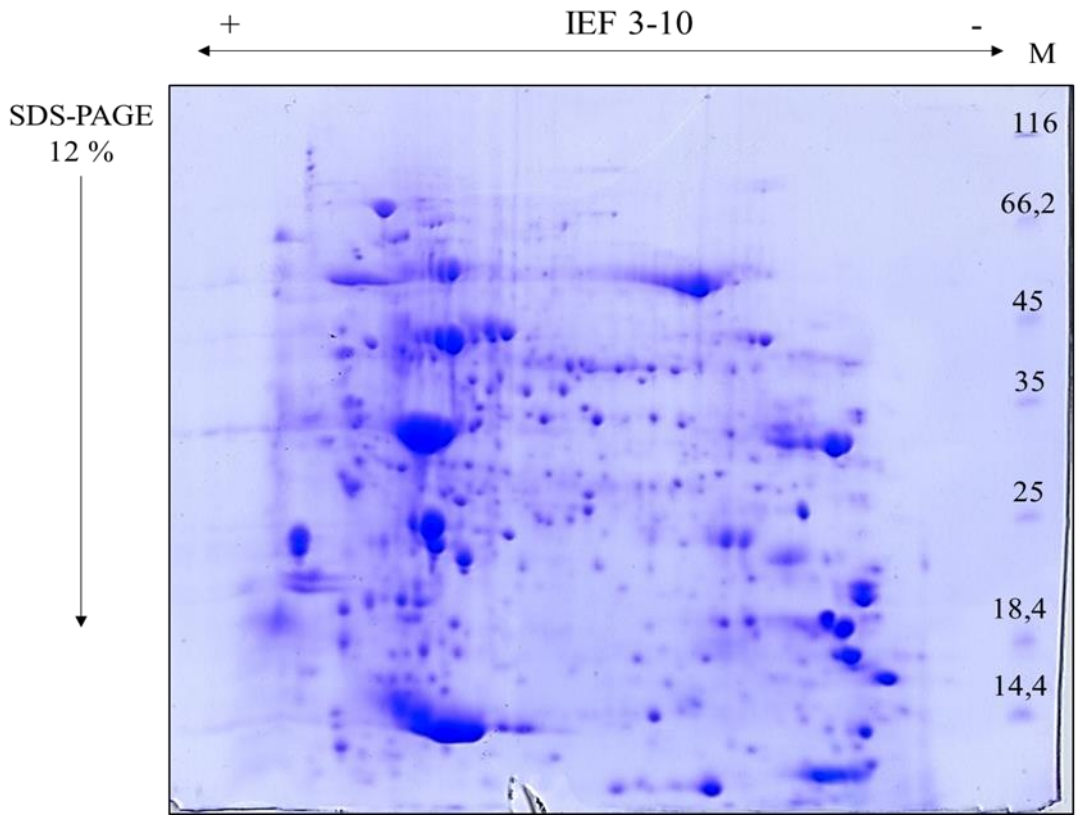


Slika 75. Udio proteina u pojedinim funkcionalnim kategorijama među ukupnim proteinima iz korijena odraslih biljaka duhana koji su pokazali razlikovnu ekspresiju nakon tretmana s a) AgNP i b) $AgNO_3$. Kratice: n.i. – nije identificiran, n.p. – nije pronađen.

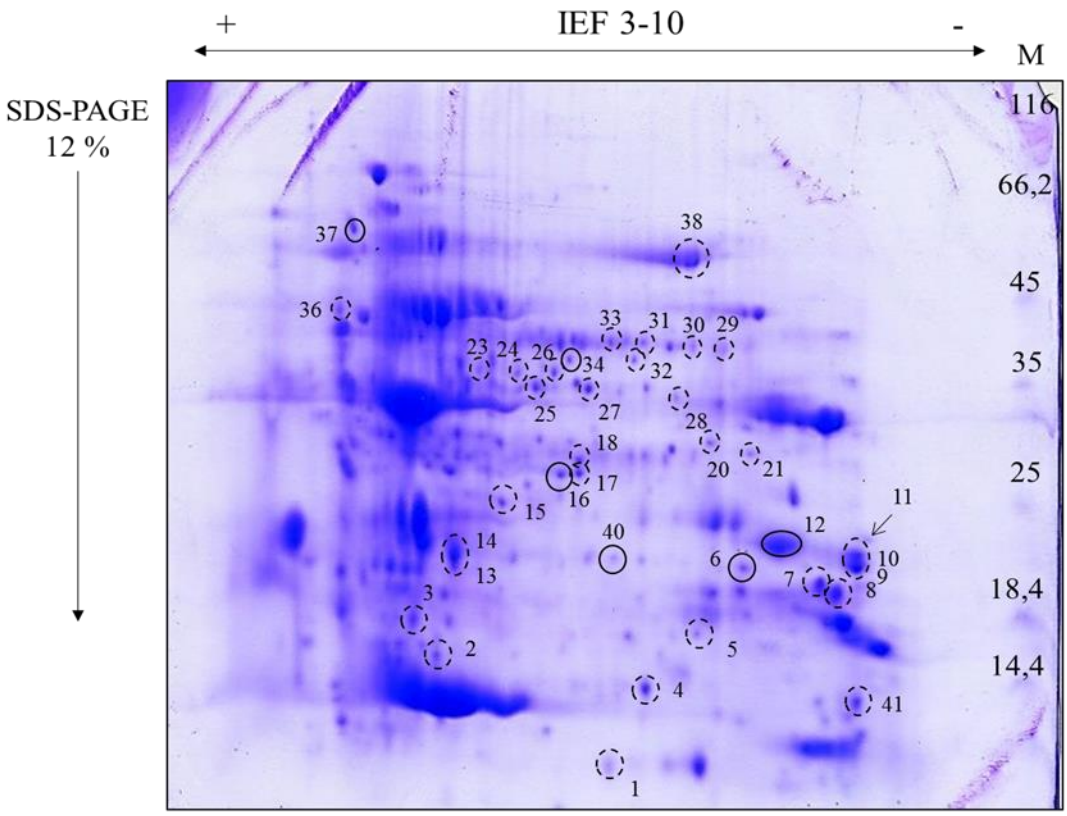
4.7.3. List

Rezultati kvantitativne obrade 2-D gelova prikazani su na Slikama 76. - 78. U Prilogu 9. prikazani su biološki procesi i stanični odjeljci u kojima sudjeluju identificirani proteini listova duhana te njihove funkcionalne kategorije i razlikovna ekspresija u usporedbi s kontrolom. Ukupno je analiziran 41 protein, od čega ih je 38 uspješno identificirano, a za tri proteina identifikacija nije uspjela (mrlje 39, 40, 41). U tkivu lista biljaka duhana tretiranih s AgNP, sedam proteina pokazalo je pojačanu ekspresiju u odnosu na kontrolu, 30 ih je imalo smanjenu ekspresiju, a četiri su proteina pokazala ekspresiju jednaku kontroli. U tkivu lista biljke tretirane s $AgNO_3$ pojačanu ekspresiju pokazalo je 12 proteina, smanjenu ekspresiju imalo je njih 14, dok je 15 proteina pokazalo ekspresiju jednaku kontroli. Proteinski profili ukupnih topivih proteina tkiva lista duhana tretiranih s AgNP i $AgNO_3$ ukazuje na to da najveći broj proteina ima različitu ekspresiju ovisno o tretmanu (24), manji je broj proteina koji u različitim tretmanima pokazuju isključivo smanjenu ekspresiju (13), dok je najmanji broj proteina s isključivo povećanom ekspresijom (četiri).

Opisane proteine sistematizirala sam prema biološkim procesima u kojima sudjeluju i tako dobila 16 kategorija: Fotosinteza, Metabolizam ugljikohidrata, Obrana od gljivica i bakterija, Sklapanje fotosustava II, Oksidacijsko-redukcijski procesi, Proteoliza, Vezanje nukleinskih kiselina i alternativni splicing molekule RNA, Sinteza ATP-a, Metabolizam nukleotida, Metabolizam aminokiselina, Smatanje proteina, Fotorespiracija, Regulacija sinteze proteina, Vezanje molekule RNA, Aktivacija enzima Rubisco i Odgovor na stres (Prilog 9.). Veliku podjedinicu enzima Rubisco (mrlje 6 i 38) svrstala sam u dvije biološke kategorije (Prilog 9.). Najveći broj identificiranih proteina uključen je u procese Fotosinteze i Metabolizma ugljikohidrata (svaki po 11 proteina ili svaki s udjelom od 29%). Po dva proteina (svaki s udjelom po 5%) pripala su kategorijama Odgovor na stres i Vezanje molekule RNA. Ostale kategorije bioloških procesa bili su zastupljene svaka sa po 3% (Prilog 9.).



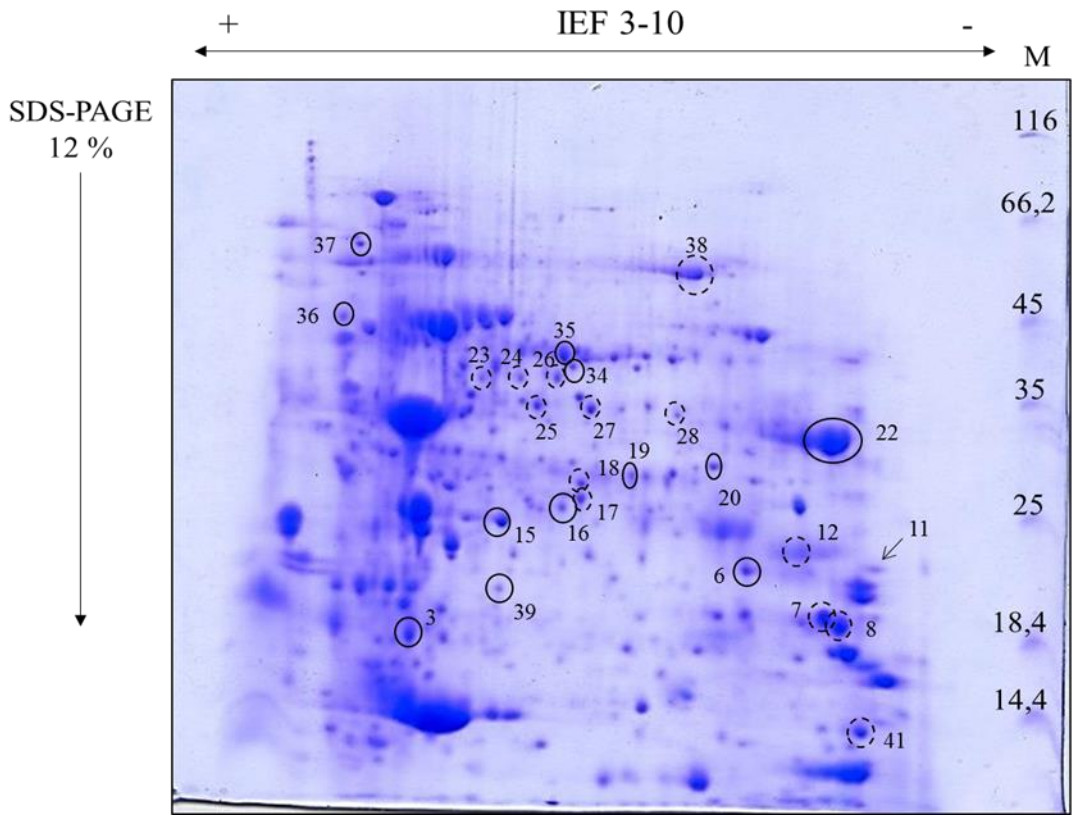
Slika 76. Ukupni topivi proteini lista biljke duhana (kontrola), koji su razdvojeni 2-DE. Gel je obojan bojom CBB i obrađen računalnim programom *Image Master 2D Platinum*. M – biljezi molekulskih masa (kDa), IEF pI 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove molekulske mase.



Slika 77**.** Ukupni topivi proteini lista biljke duhana tretirane sa 100 µM AgNP, koji su razdvojeni 2-DE. Gel je obojan bojom CBB i obrađen računalnim programom *Image Master 2D Platinum*. M – biljezi molekulskih masa (kDa), IEF pI 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove molekulske mase.

○ - povećana ekspresija identificiranih proteina u odnosu na kontrolu

◌ - smanjena ekspresija identificiranih proteina u odnosu na kontrolu



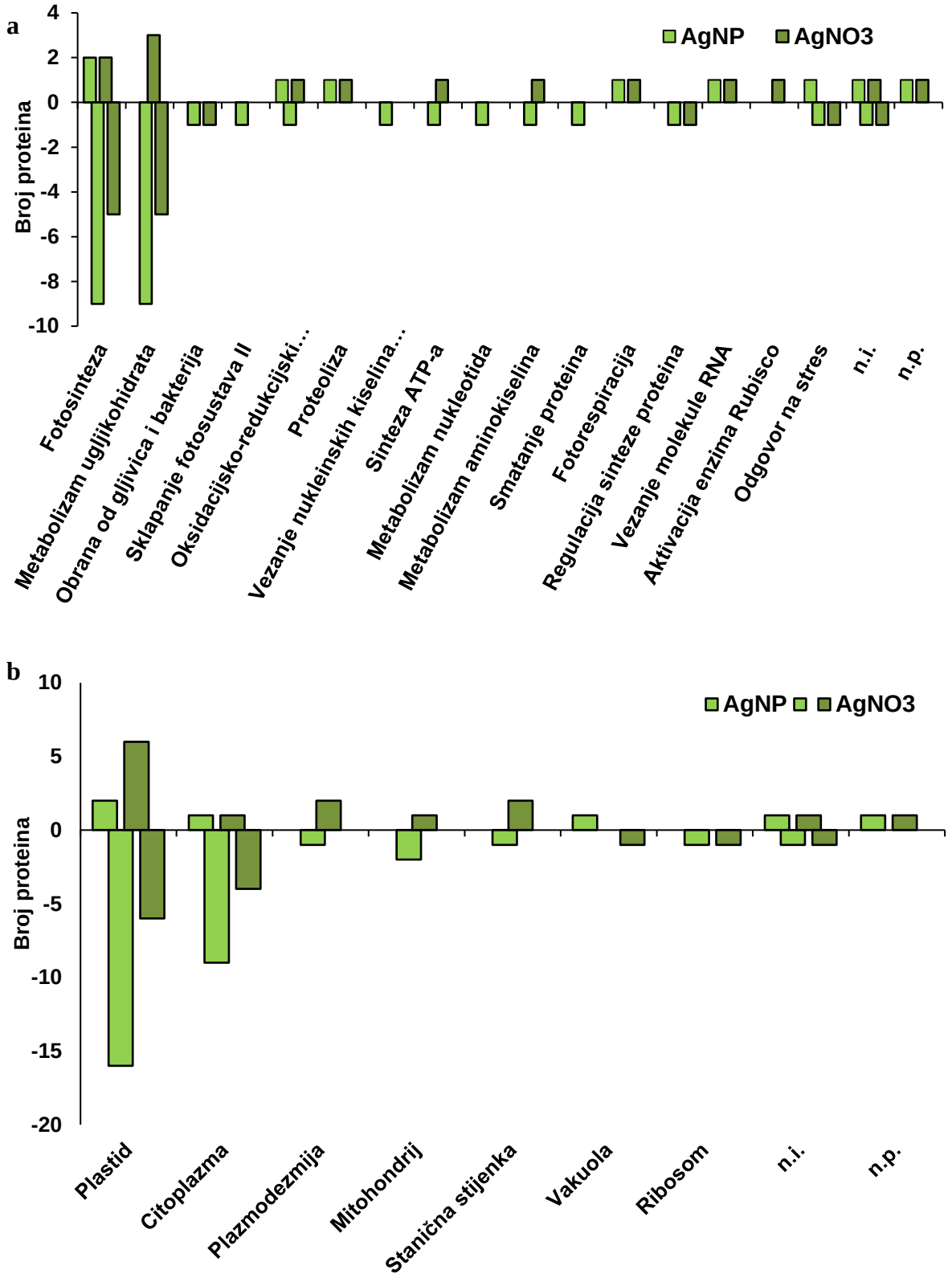
Slika 78. Ukupni topivi proteini lista biljke duhana tretirane sa 100 µM $AgNO_3$, koji su razdvojeni 2-DE. Gel je obojan bojom CBB i obrađen računalnim programom *Image Master 2D Platinum*. M – biljezi molekulskih masa (kDa), IEF pI 3-10 – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na vrijednost njihove izoelektrične točke, SDS-PAGE 12% – relativan položaj proteina na gelu u odnosu na njihove molekulske mase.

○ - povećana ekspresija identificiranih proteina u odnosu na kontrolu

◌ - smanjena ekspresija identificiranih proteina u odnosu na kontrolu

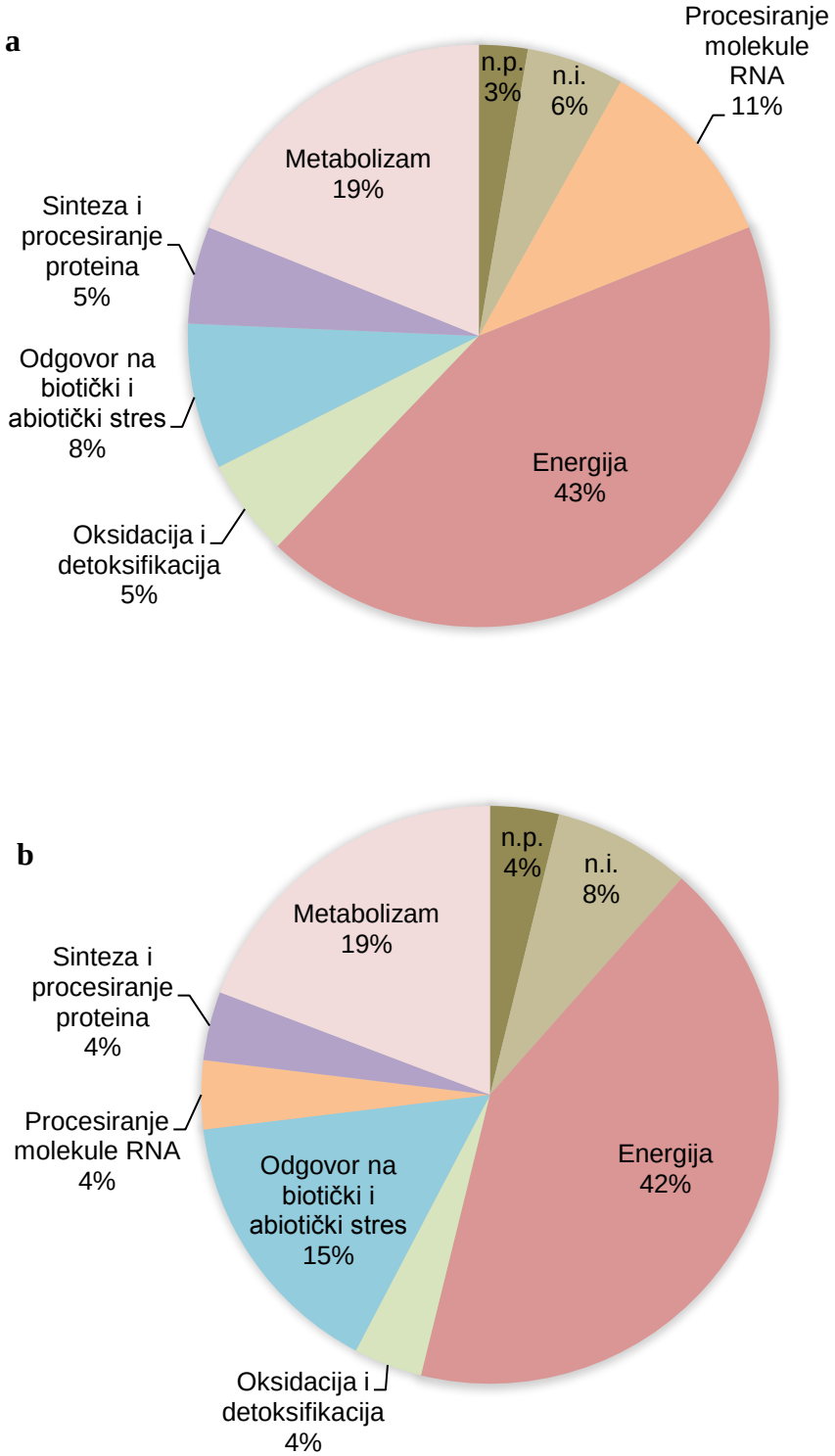
Kategorizacija analiziranih proteina prema navedenim biološkim procesima u odnosu na njihovu razlikovnu ekspresiju i pojedinačni tretman s AgNP i $AgNO_3$ prikazana je na Slici 79a. Najveći broj identificiranih proteina pokazao je smanjenu ekspresiju nakon tretmana sa AgNP u kategorijama Fotosinteza i Metabolizam ugljikohidrata (svaki po devet proteina). U istim biološkim procesima, tretman s $AgNO_3$ izazvao je smanjenje ekspresije pet proteina. Povećana ekspresija najvećeg broja proteina zabilježena je u kategoriji Metabolizam ugljikohidrata nakon tretmana s $AgNO_3$ (tri proteina), dok u istoj kategoriji nakon tretmana s AgNP nijedan protein nije pokazao povećanu ekspresiju. U kategoriji Fotosinteza, dva proteina pokazala su pojačanu ekspresiju nakon oba tipa tretmana, dok su biološki procesi Obrana od gljivica i bakterija, Regulacija sinteze proteina, Sklapanje fotosustava II, Vezanje nukleinskih kiselina i alternativni splicing molekule RNA, Metabolizam nukleotida te Smatanje proteina sadržavali samo po jedan protein smanjene ekspresiju (Slika 79a.). Oba tipa tretmana izazvala su pojačanu ekspresiju po jednog proteina u kategorijama Proteoliza, Fotorespiracija i Vezanje molekule RNA, dok je u kategoriji Aktivacija enzima Rubisco zabilježen samo jedan protein povećane ekspresije nakon tretmana s $AgNO_3$ (Slika 79a.).

Analiza ekspresije proteina prema staničnim odjeljcima prikazana je na Slici 79b. Najveći broj proteina identificiran je u odjeljcima Plastid (20), slijedi Citoplazma s 11 proteina, dok su ostali odjeljci zastupljeni sa znantno manjim brojem proteina (Mitohondrij, Stanična stijenka i Plazmodezmija sa dva proteina; Ribosom i Vakuola s jednim proteinom). Proteini sa smanjenom ekspresijom bili su najzastupljeniji u odjeljku Plastid, u kojem je 16 proteina imalo smanjenu ekspresiju nakon tretmana s AgNP, a šest nakon tretmana s $AgNO_3$. U istom staničnom odjeljku zabilježen je najveći broj proteina s povećanom ekspresijom (šest) i to nakon tretmana s AgNP. Devet proteina Citoplazme pokazalo je smanjenu ekspresiju nakon tretmana s AgNP, a četiri nakon tretmana s $AgNO_3$, dok je po jedan protein pokazao pojačanu ekspresiju nakon oba tretmana (Slika 79b.).



Slika 79. Kategorizacija identificiranih proteina prema a) biološkim procesima i b) staničnim odjeljcima u odnosu na razlikovnu ekspresiju koju je pokazao list odrasle biljke duhana tretirane s AgNP ili $AgNO_3$. Na pozitivnoj osi ordinate prikazan je broj proteina povećane ekspresije, a na negativnoj broj proteina smanjene ekspresije. Kratice: n.i. – nije identificiran, n.p. – nije pronađen.

Analizirani proteini razvrstani su i prema funkcionalnoj kategoriji (Prilog 9.), pa je za oba tretmana utvrđeno šest istih funkcionalnih kategorija: Energija, Metabolizam, Procesiranje molekule RNA, Oksidacija i detoksifikacija, Odgovor na biotički i abiotički stres te Sinteza i procesiranje proteina. Udjeli pojedinih funkcionalnih kategorija analiziranih proteina lista nakon tretmana biljaka s AgNP prikazani su na Slici 80a., a nakon tretmana s $AgNO_3$ na Slici 80b. Najveći broj proteina pripada funkcionalnim kategorijama Energija (tretman AgNP 43%, tretman $AgNO_3$ 42%), a zatim slijedi Metabolizam (oba tipa svaki s 19%). Nakon tretmana s AgNP, kategorija Procesiranje molekule RNA bila je zastupljena sa 11% proteina, a kategorija Odgovor na biotički i abiotički stres sa 8%, dok je kategorijama Sinteza i procesiranje proteina te Oksidacija i detoksifikacija pripalo po 5% proteina. Nakon tretmana s $AgNO_3$, uz navedene najzastupljenije funkcionalne kategorije, uočava se značajan udio proteina u kategoriji Odgovor na biotički i abiotički stres (15%), dok preostale kategorije sudjeluju s udjelom od 4% svaka (Slika 80a. i 80b.).



Slika 80. Udio proteina u pojedinim funkcionalnim kategorijama između ukupnih proteina iz listova biljaka duhana koji su pokazali razlikovnu ekspresiju nakon tretmana s a) AgNP i b) $AgNO_3$. Kratice: n.i. – nije identificiran, n.p. – nije pronađen.

5. RASPRAVA

Mogućnost manipulacije tvarima na razini atoma otvorila je put razvoju novog područja - nanotehnologije. To je nakon informacijsko-komunikacijske posljednja u nizu tehnologija s velikim potencijalom za korijenite promjene u gotovo svim sferama društva, no s još uvijek nedovoljno istraženim učincima na okoliš i zdravlje ljudi (Ruffini-Castiglione i sur. 2016). Naime, poznato je da čestice nanometarskih dimenzija imaju drugačija električna, kemijska i fizikalna svojstva u usporedbi s istovrsnim česticama mikrometarskih dimenzija te da je njihova sudbina, bioraspoloživost i reaktivnost još uvijek nedovoljno istražena. Veća aktivna površina po masi razlog je drugačijih (često izraženijih) svojstava, pa su očekivano biološki reaktivnije (Navarro i sur. 2008).

Budući da je sve više proizvoda široke potrošnje koji sadrže nanočestice, one pronalaze svoj put u vodene ekosustave, atmosferu i tlo, a njihova bioakumulacija, sklonost agregaciji i učinci ovise o tipu nanočestica (Hotze i sur. 2010). Među najzastupljenijim vrstama nalaze se nanočestice srebra (AgNP), jer njihova nanostruktura potencira već dobro poznata protubakterijska i protugljivična svojstva srebra (Ag).

Za žive organizme Ag je neesencijalni element. U biljne stanice može ući putem transportnog mehanizma za sulfat/tiosulfat, preko transportera kationa ili pasivnim transportom preko plazmatske membrane u obliku kompleksa s klorom (Cl) (Campbell i sur. 2002). Neki znanstvenici podastiru dokaze o tome da Ag unutar stanice stvara komplekse s aminokiselinama i nukleotidima, oštećuje fotosintetski aparat te inhibira staničnu diobu (Fortin i Campbell 2001, Xu i sur. 2010). Nadalje, ioni Ag^+ mogu dovesti do poremećaja staničnog metabolizma, narušavajući ravnotežu makronutrijenata kao što su dušik (N) i fosfor (P), ali i mikronutrijenata: kalija, cinka, bakra i željeza (K, Zn, Cu i Fe) (Jiang i sur. 2012). Chudobova i sur. (2013) su na temelju svojih istraživanja zaključili da Ag^+ interferiraju s transportnim lancem elektrona, a posljedica je prekomjerno stvaranje ROS, osobito superoksidnog radikala ($^{\bullet}O_2^-$). Osim toga, postoje dokazi o pohrani Ag u vakuolama i staničnoj stijenci te njegovim štetnim učincima kao što su inhibicija stanične diobe, reakcije s nukleinskim kiselinama te tiolnim skupinama enzima i proteina, koji su neophodni za normalno funkcioniranje stanice (Fortin i Campbell 2001, Levard 2012).

Iako se trenutno provode brojna biološka i toksikološka istraživanja o učincima AgNP, zasad nema usuglašenih i jednoznačnih zaključaka o njihovom mehanizmu djelovanja. Naime, dosadašnji rezultati pokazali su i pozitivne i negativne utjecaje AgNP na mikroorganizme i

stanice sisavaca *in vitro*, ali i na biljke (Navarro i sur. 2008), pa su u ovome području još otvorena brojna pitanja. Kao što je već rečeno, jedna od osnovnih nepoznanica je mehanizam toksičnosti nanočestica, što otvara pitanje potječe li toksičnost nanočestica od iona Ag^+, koji se otpuštaju s AgNP ili od samih AgNP (Yin i sur. 2011). Prema nekim istraživanjima učinak na promjene u staničnom metabolizmu imaju Ag^+ oslobođeni s AgNP (Navarro i sur. 2008), dok neki drugi autori prezentiraju rezultate o učincima samih AgNP (Yin i sur. 2011, Vannini i sur. 2013, Ribeiro i sur. 2014).

Budući da biljke kao sesilni organizmi imaju snažnu interakciju s neposrednim okolišem, djelovanje AgNP ispuštenih u okoliš na njih je neizbježno (Ruffini-Castiglione i sur. 2016). Stoga sam ovim istraživanjem na vrsti *Nicotiana tabacum* L. sorta Burley ispitala učinke AgNP i ionskog srebra ($AgNO_3$), primijenjenih u istim koncentracijama (25, 50, 75, 100 i 500 μM) na parametre oksidacijskog stresa i status antioksidacijskog sustava te na ekspresiju staničnih proteina u klijancima i odraslim biljkama duhana. Na osnovi dobivenih rezultata načinjena je i usporedba učinaka koje su navedeni tretmani imali na klijance u odnosu na učinke koji su utvrđeni u korijenu i listu odraslih biljaka duhana, pa ovo istraživanje donosi i komparativnu analizu djelovanja navedenih tretmana na tkiva različitog razvojnog stadija iste biljne vrste.

5.1. Učinci u klijancima duhana

5.1.1. Unos čestica AgNP i akumulacija Ag

Srebro nije element esencijalan za rast biljaka, no ioni Ag^+ topivi su u vodi, što ih čini bioraspoloživima za akumulaciju u biljno tkivo. Iako u okolišu nije utvrđena prisutnost Ag u količinama koje karakteriziraju slične onečišćujuće tvari, kao što su npr. živa (Hg) i olovo (Pb), radi široke primjene proizvoda koji ga sadrže u nanoobliku njegovo otpuštanje i pojava u ekosustavima je neizbježna i s vremenom raste. Poznato je da su unos, translokacija i akumulacija AgNP u stanici ovisni o strukturi stanice, njenoj propusnosti i veličini nanočestica (Li i sur. 2015). Naime, mali promjer i velika površina AgNP omogućava im da kroz pore stanične stijenke uđu u stanicu i dospiju do plazmatske membrane (Tripathi i sur. 2017a).

U ovom je istraživanju uočeno da su klijanci koji su bili izloženi tretmanima s $AgNO_3$ akumulirali više Ag u odnosu na klijance koji su bili izloženi AgNP, što je u skladu s rezultatima istraživanja provedenima na klijancima vrste *Ricinus communis* (Yasur i Rani 2013), klijancima kukuruza (Pokhrel i Dubey 2013) te na vrsti *Brassica* sp. (Vishwakarma i sur. 2017). Yasur i

Rani (2013) su pretpostavili da je veća količina Ag u klijancima kukuruza tretiranih s $AgNO_3$ u odnosu na količinu Ag koja je izmjerena nakon tretmana klijanaca s AgNP (s citratnim omotačem) dokaz stabilnosti čestica nanosrebra, odnosno njihovog minimalnog otapanja u vodenoj otopini. Autori Pokhrel i Dubey (2013) su pretpostavili kako je, u odnosu na tretman s AgNP, veći unos Ag nakon tretmana s $AgNO_3$ posljedica povećanog unosa vode u klijance kukuruza.

Nadalje, Vishwakarma i sur. (2017) su zaključili da je štetan učinak tretmana s AgNP na antioksidacijski sustav i molekulu DNA u vrsti *Brassica.* sp. manji u odnosu na učinak tretmana s $AgNO_3$ povezan upravo s manjom akumulacijom Ag. Ipak, postoje i drugačiji rezultati istraživanja. Tako su Geisler-Lee i sur. (2012) izvijestili da je pri nižim primjenjenim koncentracijama tretmana s AgNP i $AgNO_3$ akumulacija Ag u korijenu klijanaca *A. thaliana* bila viša nakon tretmana s AgNP u odnosu na akumulaciju Ag nakon tretmana s $AgNO_3$. U istom je istraživanju utvrđeno da su pri višim koncentracijama navedenih tretmana koncentracije akumuliranog Ag imale podjednake vrijednosti.

Nair i Chung (2014a) su zaključili da je mogući razlog većoj akumulaciji Ag nakon tretmana klijanaca *A. thaliana* s AgNP upravo direktni unos AgNP te pretpostavili da AgNP mogu biti i oksidirane (Ag^+) prije ulaska u korijen i to na samoj njegovoj površini, što im omogućava da direktno prodru u tkivo korijena.

Zasad neobjavljeni rezultati istraživanja (Peharec Štefanić i sur., rad u postupku recenzije) provedeni transmisijskom elektronskom mikroskopijom (TEM) i energetsko disperzivnom spektroskopijom (eng. *energy dispersive X-ray spectroscopy* – EDX) dokazuju ulazak i akumulaciju AgNP u stanicama korjenčića klijanaca. Naime, tehnika EDX potvrđuje da čestice, koje su prethodno bile detektirane elektronskom mikroskopijom u tkivu korjenčića sadrže Ag, što je dokaz direktnog unosa AgNP u stanice korjenčića. U istom istraživanju AgNP nisu detektirane u listićima klijanaca, što pokazuje da se AgNP akumuliraju u korjenčićima i ne prenose dalje u izdanak i listove klijanaca.

5.1.2. Oksidacijski stres i aktivnost antioksidacijskih enzima

ROS često nastaju u biljkama koje su izložene različitim stresnim uvjetima, što uključuje i stres uzrokovan izlaganjem metalima (Balen i sur. 2011, Tkalec i sur. 2014). Dugotrajnim učinkom ksenobiotika, ROS se prekomjerno akumuliraju u stanicama što može dovesti do oštećenje DNA, proteina i lipida (Gill i Tuteja 2010). Osim toga, ROS mogu imati i signalnu ulogu, odnosno sudjelovati u prijenosu signala koji dovode do ekspresije gena važnih za biosintezu enzima i drugih molekula. Smatra se da Ag, osobito u ionskom obliku, ima učinak na transportni lanac elektrona i aktivnost antioksidacijskih enzima, što može rezultirati prekomjernom akumulacijom ROS te pojavom oksidacijskog stresa (Chudobova i sur. 2013). Nadalje, fizikalno-kemijske karakteristike čestica AgNP olakšavaju njihov ulazak u biljnu stanicu, u kojoj se onda AgNP mogu vezati na biološke molekule te uzrokovati formiranje visoko reaktivnih i toksičnih ROS (Navarro i sur. 2008, Tripathi i sur. 2017a).

Rezultati ovog istraživanja pokazali su da se količina ROS u klijancima tretiranima s AgNP statistički značajno povećala samo pri najvišim koncentracijama od 100 i 500 μM AgNP, što je u skladu sa rezultatima istraživanja utjecaja AgNP na klijancima vrste *Oryza sativa* (Mirzajani i sur. 2014) te s istraživanjem na vrsti *Brassica rapa* (Baskar i sur. 2015). U klijancima koji su bili tretirani s $AgNO_3$ također je izmjeren povećani sadržaj ROS, koji je bio statistički značajno veći u odnosu na kontrolu već nakon tretmana s 50 μM $AgNO_3$ i dalje je postupno rastao s porastom koncentracije $AgNO_3$. U odnosu na učinak tretmana s AgNP, veći učinak $AgNO_3$ na nastajanje ROS zabilježen je u radu Vishwakarma i sur. (2017). Naime, na temelju istraživanja učinaka oba tretmana na klijance vrste *Brassica* sp., ovi su autori utvrdili pojavu oksidacijskog stresa mjerenjem $^{\bullet}O_2^-$ i H_2O_2. Iako je oksidacijski stres bio više izražen nakon tretmana s $AgNO_3$, tretman s AgNP je u odnosu na tretman s $AgNO_3$ uzrokovao veću aktivnost APX i CAT. Stoga su autori zaključili da je pri tretmanu s AgNP razinu oksidacijskog stresa umanjila povećana aktivnost istraživanih antioksidacijskih enzima. S druge strane, Nair i Chung (2014a) su nakon tretmana klijanaca vrste *A. thaliana* s AgNP i $AgNO_3$ ustanovili snažniji oksidacijski stres nakon tretmana s AgNP u odnosu na tretmane istih koncentracija $AgNO_3$, pa se može zaključiti da odgovor ovisi o vrsti biljke.

Zanimljivo je da su pri najvišim ispitanim koncentracijama AgNP (100 i 500 μM), vrijednosti sadržaja ROS u klijancima bile slične onima dobivenima nakon tretmana s 100 i 500 μM $AgNO_3$, što bi moglo ukazivati na toksičnost AgNP neovisno o otpuštanju iona Ag^+ (Yin i sur. 2011). Naime, Yin i sur. (2011) su ovakve rezultate pojasnili time da je za veću toksičnost AgNP zaslužna veća reaktivna površina nanočestica, kao i time da cistein koji veže oslobođene

Ag^+ ublažava djelovanje ionskog srebra ($AgNO_3$). U istom je istraživanju zaključeno da tkivo korijena biljke oksidira dio Ag koji se oslobađa s AgNP te da se toksični učinak AgNP može pripisati samim AgNP, kao i dijelu oksidiranog Ag.

Veći sadržaj Ag izmjeren u klijancima koji su bili tretirani s $AgNO_3$, u usporedbi s tretmanima s AgNP, također se može povezati s većim učinkom $AgNO_3$ na nastajanje ROS u klijancima nakon tretmana s 50 i 75 μM $AgNO_3$. Direktna povezanost sadržaja Ag u tkivu i učinaka AgNP odnosno $AgNO_3$ pokazana je i u drugim istraživanjima (Nair i Chung 2014a, Vishwakarma i sur. 2017).

Biološke membrane većinom su izgrađene od višestruko nezasićenih masnih kiselina, koje su sastavni dijelovi lipidnih molekula. Uslijed dugotrajnog djelovanja povišenih koncentracija ROS, višestruko nezasićene masne kiseline podložne su procesu peroksidacije u kojem razgradnjom lipidnih hidroperoksida nastaju brojni reaktivni aldehidi (Moller i sur. 2007), što oslabljuje integritet membrana i povećava propuštanje elektrolita te na kraju dovodi do smrti stanice (Anjum i sur. 2013). Brojna istraživanja pokazala sa da abiotički stres utječe na povećanje sadržaja MDA u biljnim stanicama (Guan i sur. 2009, Nair i Chung 2014a, Tkalec i sur. 2014, Balen i sur. 2013). U mom istraživanju niti jedan tretman s AgNP nije uzrokovao statistički značajan porast sadržaja MDA u odnosu na kontrolu, iako je u tretmanu s 100 μM AgNP izmjerena nešto veća vrijednost. S druge strane, tretmani s $AgNO_3$ su značajno povećali lipidnu peroksidaciju pri svim primijenjenim koncentracijama, osim one najniže od 25 μM. Iz ovog rezultata može se zaključiti da su ioni Ag^+ (iz $AgNO_3$), imali veći toksični učinak na klijance duhana u odnosu na tretmane s AgNP, što je dodatna potvrda da se AgNP u tkivo klijanaca unosi u obliku nanočestica te da su one stabilne, što su opisali i Vannini i sur. (2013).

Produkti oksidacijskog stresa mogu oštetiti proteine direktno – oksidacijom aminokiselinskih ostataka (His, Arg, Pro, Lys, Trp i Thr) ili indirektno – sekundarnim reakcijama s aldehidnim produktima lipidne peroksidacije. Oštećenje proteina potaknuto pojačanim stvaranjem ROS utvrdila sam mjerenjem sadržaja proteinskih karbonila u stanici. U klijancima koji su rasli na podlogama s AgNP nije utvrđen statistički značajan porast sadržaja proteinskih karbonila, iako je pri najvišim ispitanim koncentracijama (100 i 500 μM) izmjeren nešto veći sadržaj karbonila u odnosu na kontrolu, što sugerira da je u tim tretmanima došlo do pojave oksidacijskih modifikacija proteina u klijancima, iako ona nije bila statisitički značajna. Za razliku od tretmana s AgNP, tretmani s $AgNO_3$ uzrokovali su povećanje razine sadržaja proteinskih karbonila pri svim koncentracijama, izuzev najniže od 25 μM, što pokazuje da tretman s $AgNO_3$, za razliku od AgNP, u tkivu klijanaca inducira proteinske modifikacije i nastanak karbonila.

Osim proteina i lipida, ROS mogu oštetiti i molekulu DNA. Vishwakarma i sur. (2017) su tako na klijancima vrste *Brassica* sp. utvrdili da tretmani s AgNPs i $AgNO_3$ uslijed povećanog stvaranja ROS ($^{\bullet}O_2^-$ i H_2O_2) uzrokuju pojavu oksidacijskog stresa, što je rezultiralo oštećenjem molekule DNA. U ovom istraživanju zabilježila sam povećanu razinu oštećenja DNA pri tretmanima s najvišim koncentracijama AgNP (100 i 500 μM), pri čemu je zanimljivo istaknuti da je veće vrijednosti pokazala koncentracija od 100 μM nego od 500 μM AgNP. To je u skladu s istraživanjem genotoksičnosti AgNP kojeg su proveli Ghosh i sur. (2010), a u kojem su izmjerili povećane razine oštećenja DNA u korijenju luka i duhana, pri čemu se razina oštećenja postupno smanjivala povećanjem koncentracije AgNP. Taj su fenomen pripisali sposobnosti nanočestica da stvaraju aglomerate, koji s povećanjem koncentracije pokazuju tendenciju precipitacije. Dosadašnja istraživanja na klijancima drugih biljnih vrsta pokazuju da tretmani s AgNP ili nemaju učinak na oštećenje molekule DNA ili je on vrlo mali. Naime, Vannini i sur. (2014) nisu zabilježili pojačano oštećenje molekule DNA u klijancima pšenice nakon izlaganja tretmanu s AgNP, a Vishwakarma i sur. (2017) su uočili veća oštećenja molekule DNA nakon tretmana s $AgNO_3$ u odnosu na tretman s AgNP u klijancima vrste *Brassica* sp., što je u skladu s rezultatima mog istraživanja. Nadalje, potrebno je istaknuti da su rezultati dobiveni Comet testom na klijacima izloženima djelovanju AgNP u skladu s rezultatima nastanka ROS, budući da je sadržaj ROS pri tim koncentracijama AgNP u odnosu na kontrolu bio statistički značajno povišen. Također pri tim višim koncentracijama tretmana AgNP uočeno je i povećanje lipidne peroksidacije (pri 100 μM) i oksidacije proteina (100 i 500 μM), no u odnosu na kontrolu povećanje nije bilo statistički značajno. Navedeni rezultati dobiveni Comet testom, kao i određivanjem sadržaja ROS upućuju na zaključak da primijenjene čestice AgNP izazivaju pojavu oksidacijskog stresa i mogu oštetiti biološki važne makromolekule u stanicama klijanaca duhana samo kada se primijene u višim koncentracijama. U klijancima koji su rasli na podlogama s $AgNO_3$, povećana razina oštećenja DNA u odnosu na kontrolu bila je statistički značajna već pri najnižoj koncentraciji od 25 μM i postupno je rasla do koncentracije od 75 μM, nakon čega se počela smanjivati. Ipak, najviša ispitana koncentracija $AgNO_3$ (500 μM) rezultirala je vrijednošću koja je i dalje bila veća od kontrole, iako ne više statistički značajno. I u tretmanima klijanaca s $AgNO_3$ rezultati Comet testa koreliraju s rezultatima nastanka ROS, ali i lipidne peroksidacije i oksidacije proteina, što potvrđuje da tretman s $AgNO_3$ izaziva oksidacijski stres u stanicama klijanaca duhana pri značajno nižim koncentracijama i u većem obimu nego što ga izaziva tretman s AgNP.

Kako bi se obranile od štetnih učinaka povišenih koncentracija ROS i nastanka oksidacijskog stresa, biljke su stvorile učinkovite mehanizme obrane kojima pripada i

antioksidacijski sustav, koji obuhvaća različite enzimske i neenzimske mehanizme zadužene za uklanjanje ROS (Mittler i sur 2004). Antioksidacijski enzimi kataliziraju serije reakcija detoksifikacije (Zhang i sur. 2005), a njihove aktivnosti u biljnim stanicama međusobno su povezane. Enzim SOD predstavlja prvu liniju obrane stanice od oksidacijskog stresa i katalizira razgradnju $^{\bullet}O_2^-$ u H_2O_2 i O_2. Stvaranje $^{\bullet}O_2^-$ moguće je na svim mjestima u stanici gdje je prisutan transportni lanac elektrona (Elstner 1991), a najviše ga nastaje u kloroplastima, mitohondrijima i peroksisomima (Fridovich 1986, Takahashi i Asada 1983). U mom istraživanju zabilježen je statistički značajan porast aktivnosti SOD nakon primjene svih koncentracija AgNP te nakon izlaganja klijanaca tretmanima s 25 i 50 µM $AgNO_3$. Pojačanu aktivnost ovog enzima zabilježili su i Rani i sur. (2016) nakon tretmana vodenog zumbula s AgNP i objasnili je kao posljedicu pojave oksidacijskog stresa. Nadalje, povećana aktivnost SOD utvrđena je i u klijancima vrste *R. communis* (Yasur i Rani 2013) te u kalusu pšenice varijeteta „Raweta“ (Barbasz i sur. 2016) nakon izlaganja česticama AgNP. Povećane razine SOD izmjerene u klijancima duhana mogu se povezati s izmjerenim sadržajem ROS koji je bio sličan kontrolnim vrijednostima, barem pri nižim koncentracijama tretmana. Naime, detekcija ROS u ovom se istraživanju temeljila na DHE testu koji detektira nastajanje $^{\bullet}O_2^-$ (Domijan i Abramov 2011), najštetnijeg oblika ROS, kojeg SOD neutralizira. Ovi rezultati su također u skladu s rezultatima imunodetekcije, koja je pokazala pojačani intenzitet izoformi SOD1 i SOD2 pri svim ispitanim koncentracijama AgNP u odnosu na kontrolu. I u kalusu varijeteta vrste *Triticum aestivum* osjetljivom na oksidacijski stres (Dimkpa i sur. 2013) te u klijancima vrste *A. thaliana* (Syu i sur. 2014) primjenom imunodetekcije uočene su slične promjene. Navedeni rezultati ukazuju na to da AgNP vjerojatno inducira nastanak ROS, ali da se istovremeno aktiviraju i mehanizmi antioksidacijske obrane biljke, koji do neke mjere (kod nižih koncentracija) uspješno neutraliziraju nastale ROS. U odnosu na tretmane s AgNP, aktivnost SOD izmjerena nakon tretmana s $AgNO_3$ opadala je s porastom ispitanih koncentracija, a pri najvišoj koncentraciji od 500 µM bila je jednaka kontroli. Ovaj rezultat je u skladu s rezultatima analize izoformi u gelu, gdje je intenzitet SOD1 i SOD2 nakon tretmana s $AgNO_3$ bio slabiji i nije pokazivao veće razlike u odnosu na kontrolu. Smanjenje aktivnosti SOD pri rastućim koncentracijama $AgNO_3$ ukazuje na zasićenje antioksidacijskog sustava zbog velike koncentracije ROS (Van der Lubben i sur. 2003) i pokazatelj je jakog oksidacijskog stresa u klijancima duhana, što je u skladu s izmjerenim oštećenjima makromolekula u klijancima duhana.

U ovom radu mjerila sam i aktivnost PPX, koju ubrajamo u nespecifične peroksidaze, budući da koristi H_2O_2 za različite oksidacijske reakcije. Statistički značajno smanjenje aktivnosti PPX, izmjereno spektrofotometrijeski zabilježila sam u svim tretiranim klijancima, i

na podlogama s dodatkom AgNP i s dodatkom $AgNO_3$. Poznato je da se PPX nalaze u staničnoj stijenci i apoplastu te da razgrađuju štetni H_2O_2 (Apel i Hirt 2004). Biljke često akumuliraju teške metale upravo u apoplastu nastojeći tako zaštiti unutarstanični metabolizam i prevenirati toksične učinke metala (Brune i sur. 1995). Također je dokazano da teški metali mogu smanjiti aktivnost enzima, vezujući se na njihov cisteinski ogranak ili utjecati na aktivnost enzima na način da su u kompeticiji s njegovim kofaktorom – koenzimom ili metalom (Podgórska i sur. 2017), a u slučaju PPX kofaktor je ion Fe^{3+}. Stoga je moguće da je nakon izlaganja biljaka tretmanima s AgNP i $AgNO_3$, akumulirano srebro rezultiralo smanjenjem aktivnost PPX, enzima, koji je zadužen za razgradnju štetnog H_2O_2 (Mittler i sur. 2004), što može biti uzrok veće razine ROS i oksidacijskog stresa pri većim koncentracijama tretmana. U ovom istraživanju veće smanjenje sadržaja PPX u odnosu na kontrolu izazvali su tretmani s $AgNO_3$, što se opet može povezati s nešto većom akumulacijom srebra. S druge strane, temeljem rezultata analize ekspresije PPX izoformi u nativnom gelu, gdje je u klijancima tretiranima ionskim i nanosrebrom detektiran veći broj izoformi i njihov pojačani intenzitet u odnosu na kontrolu, moglo bi se zaključiti da biljka aktivira pojedine izoforme ovog enzima. Naime spektrofotometrijski možemo odrediti ukupnu aktivnost svih PPX izoenzima, dok na gelu vidimo aktivnost pojedinih izoformi, čija aktivnost može biti različito regulirana ovisno o njihovoj ulozi, odnosno kompartimentu u kojem se nalaze. Tome u prilog idu i rezultati dobiveni metodom imunodetekcije, u kojima je nakon oba tretmana također bila vidljiva ekspresija više proteinskih vrpci, a kod tretmana s AgNP najveći je intenzitet pokazao tretman s 50 µM. Zanimljivo je da se s porastom koncentracije AgNP smanjivala ekspresija izoformi PPX detektiranih na membrani, što može biti posljedica njihovog oštećenja uslijed visokih koncentracija AgNP (Hatami i Ghorbanpour 2013, Rani i sur. 2016). Nadalje, iz rezultata imunodetekcije vidljivo je i to da su klijanci tretirani s $AgNO_3$ pokazali pojačanu ekspresiju većeg broja vrpci u odnosnu na klijance tretirane s AgNP, a pri najvišoj koncentraciji $AgNO_3$ jasno je bilo vidljivo svih 5 izoformi ovog enzima. Navedeni rezultati ukazuju na pojačanu ekspresiju PPX na svim tretmanima s $AgNO_3$. U trenutno dostupnoj literaturi nisu pronađeni podaci o učinku $AgNO_3$ na ekspresiju PPX u biljkama. Nadalje, ovi rezultati u skladu su i s rezultatima mjerenja parametara oksidacijskog stresa koji su bili povišeni nakon tretmana s $AgNO_3$, što potvrđuje jači učinak tretmana s $AgNO_3$ u odnosu na tretmana s AgNP te također ukazuje na različite mehanizme djelovanja nanočestica i ionskog srebra. Pritom treba napomenuti da je za razliku od spektrofotometrijske analize aktivnosti enzima i metode nativne elektroforeze, metoda imunodetekcije specifična, odnosno može se pretpostaviti da je HRP reagirala vrlo specifično s određenim tipom PPX na koji nanosrebro i ionsko srebro mogu imati

različite učinke. Ipak, na osnovi rezultatata dobivenih imunodetekcijom ne mogu se donijeti zaključci o aktivnosti PPX, već samo o većoj ili manjoj količini ovog proteina, u odnosu na kontrolu. Zaključno, smanjenje aktivnosti PPX koje je izmjereno spektrofotometrijski moglo bi se povezati sa toksičnim učinkom oba tretmana, od kojih je tretman s ionskim srebrom pokazao veći učinak. Naime, poznato je da oksidacijski stres izazvan teškim metalima može utjecati na aktivnost enzima PPX te SOD i CAT (Hossain i sur 2012, Qureshi i sur. 2005). S druge strane, jača ekspresija pojedinih izoformi PPX u nativnom gelu te onih dokazanih imunodetekcijom mogla bi ukazivati na to da je biljka u svrhu uklanjanja toksičnog učinka AgNP i $AgNO_3$ eksprimirala veću količinu specifičnih izoformi PPX, osobito pri višim koncentracijama oba tretmana. Pojačana ekspresija izoenzima PPX, koja je nakon tretmana s ionskim srebrom utvrđena u nativnom gelu i imunodetekcijom, mogla bi biti povezana sa snažnijim oksidacijskim stresom kojeg sam detektirala pri istom tretmanu, mjereći sadržaj ROS, MDA i proteinske karbonile.

S druge strane, interesantno je da je, za razliku od PPX, koja je prisutna u staničnoj stijenci i apoplastu, APX kao unutarstanični enzim s većim afinitetom prema H_2O_2 pokazala značajno povećanje aktivnosti u gotovo svim tretmanima s AgNP i $AgNO_3$ u odnosu na kontrolu. Nadalje, rezultati imunodetekcije pokazali su više izoformi APX pojačane ekspresije u gotovo svim koncentracijama kod oba tipa tretmana, u odnosu na kontrolu. Ovaj rezultat ukazuje na to da je APX glavni enzim za uklanjanje H_2O_2 u stresu izazvanom s AgNP i $AgNO_3$ u klijancima. Naime, poznato je da je povećanje aktivnosti APX povezano s kontrolom regulacije razine H_2O_2 i njegovim uklanjanjem pri pojavi oksidacijskog stresa potaknutog metalima (Qureshi i sur. 2005). Povećana aktivnosti APX također je izmjerena nakon izlaganja klijanaca vrste *Pisum sativum* (Tripathi i sur. 2017b) i dvije sorte pelargonije (Hatami i Ghorbanpour 2013) česticama AgNP.

Važnu ulogu u antioksidacijskom sustavu biljke ima i CAT koja neutralizira H_2O_2, odnosno razgrađuje ga na O_2 i H_2O. Njena aktivnost u stanici je stalna, a može se promijeniti uslijed pojave jakog oksidacijskog stresa (Siedlecka i Krupa 1999) i ima važnu ulogu u razgradnji visokih koncentracija ROS (Gupta i sur. 2009). U ovom istraživanju spektrofotometrijski izmjerena aktivnost CAT smanjivala se u klijancima duhana nakon tretmana s AgNP i $AgNO_3$, uz izuzetak aktivnosti izmjerene pri 25 μM AgNP. Ipak, statistički značajno smanjenje utvrđeno je isključivo nakon tretmana s višim koncentracijama $AgNO_3$ (75, 100 i 500 μM). Jača inhibicija aktivnosti CAT nakon tretmana s $AgNO_3$ u usporedbi s AgNP zabilježena je i u kalusima kultivara pšenice (Barbasz i sur. 2016), klijancima ricinusa

(Yasur i Rani 2013) te u klijancima vrste *Brassica sp.* (Vishwakarma i sur. 2017). Smanjenje aktivnosti CAT bilo je vidljivo i u gelu nakon nativne elektorforeze, gdje je detektirana jedna izoforma CAT, koja je u gotovo svim tretmanima bila smanjenog intenziteta u odnosu na kontrolu. Nadalje, imunodetekcijom je nakon oba tretmana bila detektirana jedna izoforma ovog enzima koja je u odnosu na kontrolu najsnažniji intenzitet imala nakon tretmana s nižim koncentracijama, što se može povezati s trenutnim odgovorom obrambenog antioksidacijskog mehanizma biljke na ulazak ksenobiotika već pri nižim koncentracijama (Song i sur. 2012, Zhang i sur. 2015). S druge strane, slabija ekspresija CAT zabilježena je pri višim koncentracijama AgNP i $AgNO_3$, što zajedno s rezultatima izmjerene aktivnosti ukazuje na inhibitorni učinak srebra na taj enzim, osobito u ionskom obliku, što kao posljedicu ima jači oksidacijski stres. Poznato je da Ag reagira s tiolnim skupinama enzima i proteina (Fortin i Campbell 2001, Levard 2012) i može rezultirati njihovom inaktivacijom, što se može povezati sa smanjenjenom aktivnosti PPX i CAT koja je ovim radom utvrđena nakon oba tipa tretmana.

5.1.3. Ekspresija staničnih proteina

Proteini su makromolekule izravno odgovorne za odvijanje većine bioloških procesa u stanicama. Oni su direktni produkti gena i odražavaju njihovu karakterističnu ekspresiju. Na promjene u proteinskoj slici, što uključuje promjene u sintezi i funkciji proteina, mogu utjecati različiti biotički i abiotički čimbenici. Od abiotičkih čimbenika može se izdvojiti onečišćenje metalima, što predstavlja globalni okolišni problem koji ugrožava ljude, životinje i biljke (Cvjetko i sur. 2014b). Sposobnost biljke da preživi u takvom okruženju ovisi o različitim mehanizmima prilagodbe na stres kojima upravlja mali broj gena, vjerojatno uz doprinos većeg broja modifikacija (Schat i sur. 2000). Naime, narušavanjem normalne ravnoteže biljnog organizma zbog vanjskih utjecaja dolazi do niza promjena koje se mogu pratiti na razini tkiva ili stanice, a određivanje ukupne koncentracije staničnih proteina predstavlja rani pokazatelj takvih utjecaja. Neka su istraživanja pokazala da metali poput kadmija (Cd), olova (Pb), nikla (Ni) i Ag mogu promijeniti ukupnu količinu proteina u biljci (Ewais 1997, Rostami i Ehsanpour 2009). Stoga se smatra da je ovo pokazatelj važan za utvrđivanje ireverzibilnih i reverzibilnih promjena metabolizma, budući da se mijenja kao odgovor na široki raspon stresnih čimbenika (Doganlar i Atmaca 2011).

U ovom istraživanju izmjerila sam koncentraciju ukupnih topivih proteina u klijancima nakon izlaganja tretmanima s AgNP i $AgNO_3$. Rezultati analize pokazali su da tretmani s AgNP ne uzrokuju značajne promjene u koncentraciji ukupnih topivih proteina u odnosu na kontrolu,

za razliku od tretmana s $AgNO_3$ koji su izazvali značajan porast ukupnih proteina pri svim primijenjenim koncentracijama. Smatra se da je prvi odgovor biljke na stresne uvjete smanjenje normalne metaboličke aktivnosti, a time i koncentracije ukupnih topivih proteina. Međutim, kao odgovor na stres, sadržaj proteina može biti i povišen uslijed aktivacije različitih procesa u biljkama koji uključuju sintezu proteina *de novo*, osmotsku regulaciju, antioksidacijsku obranu i druge procese (Hossain i Komatsu 2013).

Elektroforetska analiza ekspresije ukupnih staničnih proteina i jednodimenzionalnom (SDS-PAGE) i dvodimenzionalnom (2-DE) tehnikom rezultirala je sličnim proteinskim profilima u klijancima nakon izlaganja tretmanima s AgNP i $AgNO_3$. Detektirane promjene u odnosu na kontrolu bile su jače izražene u klijancima koji su rasli na podlogama s $AgNO_3$, što se može povezati sa snažnijim oksidacijskim stresom, koji je u ovom istraživanju utvrđen u klijancima na osnovi rezultata parametara oksidacijskog stresa. Treba napomenuti da su kod provođenja SDS-PAGE tretmani kojima su izlagani klijanci bili su u koncentracijama 25, 50, 75, 100 i 500 µM AgNP i $AgNO_3$, a 2-DE je provedena nakon tretmana klijanaca sa 100 µM AgNP i $AgNO_3$.

Kvantitativne promjene u ekspresiji staničnih proteina u klijancima duhana koji su bili izloženi izabranim tretmanima sa 100 µM AgNP i 100 µM $AgNO_3$ pokazale su da je većina diferencijalno eksprimiranih proteina imala pojačanu ekspresiju nakon oba tipa tretmana, iako je pojačana ekspresija bila osobito izražena nakon tretmana s $AgNO_3$ u kojem je 58 od ukupno 64 proteina pokazalo povećanu ekspresiju u odnosu na kontrolu. Najveći broj proteina s povećanom ekspresijom nakon oba tipa tretmana pripisan je kategoriji Fotosinteza, iako je s velikim brojem proteina bila zastupljen i kategorija Metabolizam ugljikohidrata. Budući da je fotosinteza (uključujući i Calvinov ciklus) kao skup bioloških procesa kontrolirana od strane mnogih gena i genskih produkata (Nouri i sur. 2015), ne iznenađuje rezultat da je nakon izlaganja tretmanima s AgNP i $AgNO_3$ najveći broj identificiranih proteina pridružen upravo kategoriji Fotosinteza. Prevladavajuća zastupljenost tih proteina ukazuje na činjenicu da je proteom listića klijanaca zasjenio proteom korijenčića, što su također zaključili i Vannini i sur. (2014) u istraživanju proteoma klijanaca pšenice izloženih djelovanju AgNP i $AgNO_3$.

Poznato je da abiotički stres štetno utječe na transport elektrona, fiksaciju ugljika i sintezu ATP-a (Nouri i sur. 2015). Primjerice, neki su autori uočili da proteini povezani sa fiksacijom ugljika, fotosustavom I (engl. *photosystem I*, PSI) i fotosustavom II (eng. *photosystem II*, PSII) te s aktivnosti podjedinica enzima Rubisco, ugljične anhidraze i proteina koji sudjeluju u transportu elektrona (npr. feredoksin-$NADP^+$ reduktaza) imaju smanjenu ekspresiju uslijed abiotičkog stresa, kao što su povišena okolna temperatura (Han i sur. 2009 i

Ahsan i sur. 2010), ali i djelovanje teških metala (Monnet i sur 2001, Foyer i Noctor 2005, Ritter 2010). Stoga je iznenađujuće da je ekspresija većine proteina identificiranih u ovom radu, a povezanih s fotosintezom bila povećana, što može ukazivati da je odabrana koncentracija srebra bila stresna, ali ne u tolikoj mjeri da se biljka ne može prilagoditi. Među identificiranim proteinima nalazili su se proteini kompleksa PSI i PSII. PSI je proteinski kompleks viših biljaka, algi i cijanobakterija koji se sastoji od najmanje 17 različitih podjedinica (Scheller i sur. 1997), koje posreduju u transportu elektrona od plastocijanina do feredoksina (Naver i sur. 1996). Ukoliko se zbog stresnih uvjeta, izazvanih biotičkim ili abiotičkim čimbenicima, protok elektrona do feredoksina smanji, posljedica je smanjenje produkcije NADPH, što značajno smanjuje učinkovitost fotosinteze (Hajirezaei i sur. 2002). U ovom radu identificirala sam nekoliko proteinskih podjedinica kompleksa PSI. Protein PSI-E (oko 16 kDa) smješten je na reducirajućem kraju kompleksa PSI sa stromalne strane i uključen je u prihvaćanje topivih akceptora elektrona, osobito feredoksina (Sétif i sur. 2002), a u mom istraživanju je pokazao smanjenu ekspresiju nakon tretmana klijanaca s $AgNO_3$ u odnosu na kontrolu. Smatra se da skupina kloroplastnih proteina, među kojima je i PsaE, osigurava veću tolerantnost biljke na različite stresne čimbenike okoliša te da je njihova smanjena ekspresija posljedica stresa kojem su izložene (Jeanjean i sur. 2008). Nadalje, Jeanjean i sur. (2008) su zaključili da PSI-E ima važnu ulogu u sprječavanju fotooksidacijskog oštećenja i stvaranja ROS u cijanobakteriji *Synechocystis sp*. S druge strane, podjedinica PSI-D (oko 23 kDa) je u odnosu na kontrolu pokazala pojačanu ekspresiju u klijancima nakon oba tipa tretmana, što se može povezati s rezultatima analize ukupnih staničnih proteina koju sam provela u ovom istraživanju, gdje je ekspresija proteina molekulske mase od oko 23 kDa bila pojačana u odnosu na kontrolne uzorke. Poznato je da podjedinica PSI-D stvara komplekse sa feredoksinom i feredoksin-$NADP^+$ reduktazom koji sudjeluju u transportu elektrona i također su dio kompleksa PSI (Haldrup i sur. 2000). Moguće je da je smanjeni transport elektrona zbog slabije ekspresije proteina PSI-E potaknuo sintezu proteina PSI-D, kako bi se povećao broj molekula feredoksina u interakciji s PSI i osigurao transport elektrona. Naime, feredoksin je protein koji prihvaća elektrone s PSI i prenosi ih na feredoksin-$NADP^+$ reduktazu te uz pomoć tog enzima nastaje NADPH. Također, pojačana ekspresija kloroplastnog prekursora feredoksin-$NADP^+$ reduktaze, zabilježena nakon oba tipa tretmana, pokazuje da biljka nastoji održati normalan prijenos elektrona u stresnim uvjetima izloženosti srebru. Sam enzim feredoksin-$NADP^+$ reduktaza pokazao je pojačanu ekspresiju samo nakon tretmana s $AgNO_3$, što upućuje na snažnije djelovanje ionskog srebra na proces fotosinteze u odnosu na tretman s AgNP.

Kompleks PSII za pokretanje enzimske reakcije oksidacije vode koristi Sunčevu energiju, čime se pokreće niz redoks reakcija koje rezultiraju proizvodnjom ATP-a (Barber i sur. 1997). PSII sadrži i proteine PsbO (33 kDa), PsbP (23 kDa) i PsbQ (17 kDa) koji imaju važnu ulogu u oksidaciji vode te u održavanju cjelovitosti kompleksa PSII (Kumar i sur. 2017). Mustafa i sur. (2015) su u istraživanju učinka AgNP na navedene proteine identificirali neke podjedinice proteinam, čija je ekspresija bila smanjena nakon primjene tretmana, iako se radilo o drugim proteinima u odnosu na rezulte u mom istraživanju. U svom sam radu, nakon tretmana s $AgNO_3$, zabilježila pojačanu ekspresiju proteina PsbQ. Poznato je da smanjenje aktivnosti PsbQ usporava fotokemijske reakcije PSII, odnosno da uklanjanje proteina PsbQ iz PSII može rezultirati značajnim smanjenjem aktivnosti PSII (Allahverdiyeva i sur. 2014). Budući da je tretman s $AgNO_3$ izazvao veći oksidacijski stres u usporedbi s kontrolom i s tretmanom AgNP, utvrđeno povećanje ekspresije PsbQ može upućivati na zaključak da su klijanci nastojali održati energetsku homeostazu u stresnim uvjetima sintetizirajući više PsbQ. Sličan rezultat i zaključak izveli su Tamburino i sur. (2017) koji su zabilježili pojačanu ekspresiju ovog proteina u proteomu kloroplasta rajčice nakon izlaganja stresu sušom. S druge strane, tretmani s AgNP izazvali su smanjenu ekspresiju proteina PsbQ, pa se može zaključiti da AgNP drugačije utječe na PSII od ionskog srebra. Poznato je da je smanjena ekspresija proteina PsbQ povezana sa djelomičnim oštećenjem PSII. U istraživanju kojeg su proveli Allahverdiyeva i sur. (2015) potvrđeno je da se smanjenjem ekspresije proteina PsbQ smanjuje i reducirajuća aktivnost PSII, što dovodi do smanjenog toka elektrona s kompleksa PSII na kompleks PSI. Međutim, budući da su dva proteina identificirana kao PsbQ, što ukazuje da u duhanu kao i u arabidopsisu postoji više oblika (homologa) tog proteina (Ifuku 2014) te da nisu dobiveni isti učinci tretmana s AgNP na njihovu ekspresiju potrebna su dodatna istraživanja. Druga dva proteina, PsbO i PsbP (više oblika) uglavnom su pokazali povećanje ekspresije nakon oba tretmana, što se može povezati s njihovom ulogom u stabilizaciji i zaštiti PSII. Tako je za PsbO otkriveno da ima ulogu u popravku PSII nakon fotoinhibicije i zaštiti proteina D1 od ROS (Gururani i sur. 2015). Budući da je i kod oba tretmana zabilježeno i povećanje sadržaja ROS, može se pretpostaviti da povećanje ekspresije ovih proteina ima ulogu u zaštiti i popravku PSII.

Među enzimima koji su u stanici odgovorni za održavanje normalne energetske homeostaze, detektirane su podjedinice plastidne ATP-sintaze: CF1 epsilon i CF1 beta podjedinica. Dok je u odnosu na kontrolu CF1 epsilon podjedinica pokazala pojačanu ekspresiju nakon oba tipa tretmana, CF1 beta podjedinica pokazala je diferencijalnu ekspresiju: nakon izlaganja tretmanu s AgNP smanjenu, a nakon tretmana s $AgNO_3$ povećanu ekspresiju. U istraživanju Vannini i sur. (2013) pokazano je da izlaganje klijanaca vrste *E. sativa* tretmanu

s $AgNO_3$ uzrokuje specifično povećanje nekoliko proteina koji su uključeni u proizvodnju energije, uključujući i plastidnu podjedinicu ATP sintaze. Rezultati navedenih istraživanja u korelaciji su s rezultatima mog istraživanja te se može zaključiti da biljke izložene AgNPs i $AgNO_3$ nastoje proizvesti više energije, koja se zatim može iskoristiti za proizvodnju metabolita odgovornih za obranu od učinaka stresa.

U uvjetima stresa mijenja se bazalni metabolizam stanice i aktivnost određenih enzima odgovornih za regulaciju procesa koji zahtijevaju dodatne zalihe energije, što dovodi do pojačane aktivnosti enzima uključenih u metabolizam ugljikohidrata (Vinocur i Altman 2005). Istraživanja autora Maayan i sur. (2008) pokazuju da reakcije fotosinteze snažno koreliraju s akumulacijom proteina Rubisco (eng. *ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase*), koji katalizira prvi korak fiksacije CO_2 U ovom istraživanju 3 različita proteina identificirana su kao velika podjedinica enzima Rubisco s promijenjenom ekspresijom nakon oba tipa tretmana, iako je ekspresija proteina br. 9 i 14 bila pojačana, a proteina br. 45 smanjena u odnosu na kontrolu. Smanjena ekspresija proteina Rubisco u skladu je s rezultatima Kosove i sur. (2013), koji su pokazali da abiotički stres uzrokuje smanjenu fiksaciju CO_2, a smanjena stopa fiksacije CO_2 odražava se smanjenjem količine enzima Rubisco (Foyer i sur. 2012). Nadalje, Hayano-Kanashiro i sur. (2009) dokazali su smanjenu ekspresiju enzima Rubisco u kukuruzu nakon izlaganja stresu izazvanim sušom. Taj su rezultat objasnili kao odgovor biljke na prekomjernu redukciju transportnog lanca elektrona te prekomjernu proizvodnju ROS, što se očitovalo u smanjenju fotosintetske aktivnosti uslijed smanjene asimilacije ugljika. Povećana količina proteina br. 9 i 14 vjerojatno je rezultat degradacije proteina Rubisco. Naime, ako se usporede molekulske mase identificiranih proteina, uočava se da su mase proteina br. 9 (oko 18,5 kDa) i 14 (oko 29,7 kDa) znatno manje od molekulske mase velike podjedinice enzima Rubisco (oko 56 kDa), dok jedino protein br. 45 po molekulskoj masi (oko 53 kDa) odgovara nativnom proteinu. Poznato je da produkti razgradnje enzima Rubisco imaju manju molekulsku masu u usporedbi s nativnim proteinom (Taylor i sur. 2016). Degradacija enzima Rubisco zabilježena je u biljkama šećerne repe (Hajheidari i sur. 2005), koje su bile izložene vodnom stresu što pokazuje osjetljivost ovog enzima na stresne uvjete. Rogić i sur. (2015) utvrdili su da oksidacijski stres dovodi do ubrzane degradacije proteina Rubisco, što je u skladu s rezultatima ovog istraživanja, budući da je u klijancima duhana koji su bili tretirani s 100 μM AgNP i $AgNO_3$ dokazano povećanje sadržaja ROS-a i parametara oksidacijskog stresa.

Stresni abiotički i biotički čimbenici okoliša u biljci mogu uzrokovati denaturaciju i gubitak biološke aktivnosti proteina. Kako bi neutralizirale takve štetne učinke, biljke su razvile mehanizme kojima mogu mijenjati ekspresiju gena i aktivnost proteina (Yan i sur. 2005). Jedan

takav protein je enzim Rubisco aktivaza, ATP-azni protein koji uklanja metabolite koji mogu inhibirati aktivaciju enzima karbamilacijom, osiguravajući tako njegovu konformacijsku stabilnost i aktivnost (Portis 2003). U ovom su radu dva proteina identificirana kao kloroplastna Rubisco aktivaza 2. Ekspresija ove veće izoforme Rubisco aktivaze bila je povećana nakon oba tipa tretmana. Fukayama i sur. (2012) dokazali su da prekomjerna ekspresija Rubisco aktivaze smanjuje kapacitet asimilacije CO_2 smanjivanjem sadržaja enzima Rubisco u listovima riže, no slična istraživanja na klijancima pretragom literature nisam pronašla. Poznato je da se Rubisco aktivaza akumulira uslijed stresa izazvanog sušom (Rollins i sur. 2013) i teškim metalima (Son i sur. 2013). Chen i sur. (2015) su utvrdili da velika podjedinica Rubisco aktivaze pojačano nastaje u odnosu na malu podjedinicu istog enzima, kao odgovor na stres uzrokovan dehidratacijom i povišenom temperaturom te jačim osvjetljenjem, kojima su bile izlagane biljke riže. Naime, dvije izoforme Rubisco aktivaze rezultat su alternativnnog splicinga (Chen i sur. 2015). Kada biljka nije izložena stresu, u većoj je mjeri prisutna mala podjedinica enzima koja aktivira Rubisco i fiksaciju CO_2. Pri normalnim fotosintetskim uvjetima velika podjedinica Rubisco aktivaze je prisutna u manjoj mjeri, no uslijed stresnih uvjeta njen se sadržaj značajno povećava u cilju zaštite ostalih funkcionalnih proteina od stresnih uvjeta. Rezultati istraživanja autora Chen i sur. (2015) ukazuju na to da biljke pri stresnim uvjetima nastoje postići ravnotežu između fotosinteze i tolerancije na stresne uvjete, prilagođavajući odnos sadržaja velike i male podjedinice Rubisco aktivaze.

Ugljična anhidraza je metaloenzim koji sadrži cink, a katalizira reverzibilnu pretvorbu HCO_3^- u CO_2, kako bi se osigurala dovoljna količina CO_2 koju će fiksirati enzim Rubisco. Ovaj se enzim nalazi u različitim tkivima biljke, a unutar stanice najzastupljeniji je u kloroplastu, citosolu i mitohondrijima. Više biljke sadrže tri evolucijski različite porodice ovog enzima: alfa, beta i epsilon. Poznato je da je plastidna beta ugljična anhidraza dio obrambenog sustava biljke od biotičkog stresa (Jung i sur. 2008, Collins i sur. 2010). U ovom istraživanju u klijancima duhana četiri proteina identificirana su kao beta ugljična anhidraza, a njihova ekspresija bila je povećana nakon oba tipa tretmana. Vannini i sur. (2013) su u istraživanju utjecaja AgNP i $AgNO_3$ na klijance vrste *E. sativa* zabilježili povećanu ekspresiju ovog proteina samo nakon tretmana s $AgNO_3$, što je djelomično u skladu s rezultatima ovog istraživanja. Povećana ekspresija ovog enzima mogla bi biti posljedica degradacije i smanjene aktivnosti enzima Rubisco.

Trioza fosfat izomeraza (eng. *triose phosphate isomerase*, TPI) katalizira reverzibilnu konverziju izomera trioza fosfata (dihidroksiaceton fosfata) do gliceraldehid 3-fosfata. To je enzim koji je ključan u procesu glikolize i esencijalan za učinkovitu proizvodnju energije. U

dosadašnjim radovima dokazano je da je ekspresija enzima TPI inducirana sušom i solnim stresom (Yan i sur. 2005). Također, istraživanja koja su proveli Thimm i sur. (2001) potvrđuju da abiotički stres uzrokovan manjkom esencijalnog metala željeza (Fe) u biljci *A. thaliana* rezultira povećanom ekspresijom ovog enzima. U mom istraživanju je jedan protein identificiran kao citosolna TPI, a njegova je ekspresija bila povećana nakon oba tipa tretmana. To dokazuje da i AgNP i $AgNO_3$ djeluju na proteine uključene u još jedan primarni metabolizam biljke – glikolizu. Povećana ekspresija proteina TPI u ovom bi istraživanju mogla biti dokaz da biljke unatoč učincima tretmana s AgNP i $AgNO_3$ nastoje osigurati dostatnu razinu energije potrebne za normalne metaboličke funkcije. Osim toga, povećana razina citosolne TPI može utjecati na smanjenje sadržaja citotoksičnog nusprodukta glikolize, metilglioksala i tako doprinijeti obrani biljke od oksidacijskog stresa (Sharma i sur. 2012b). Naime, metilglioksal može doprinijeti formiranju štetnih ROS, koji mogu oštetiti strukturu proteina i molekulu DNA. Stoga povećana razina enzima TPI, detektirana u klijancima duhana nakon oba tipa tretmana, potvrđuje da je ovaj protein uključen u obranu biljke od oksidacijskog stresa, koji je u ovom istraživanju dokazan i drugim parametrima.

U ovom radu identificiran je i protein mitohondrijska NAD-ovisna malat dehidrogenaza (eng. *malate dehydrogenase*, MDH). Radi se o enzimu Krebsovog ciklusa koji je jedan je od temeljnih metaboličkih ciklusa stanice, a odvija se u mitohondrijima eukariotskih stanica. Posljednju reakciju ovog ciklusa, tj. oksidaciju malata u oksaloacetat, katalizira MDH, koja koristi još jednu molekulu NAD^+ kao primatelja vodika kako bi se proizveo NADH. Oksaloacetat zatim ulazi u novi ciklus. U radu Vannini i sur. (2014) u klijancima pšenice zabilježeno je povećanje ekspresije citoplazmatske MDH nakon tretmana s AgNP. Rezultati navedenog rada te ovog istraživanja upućuju na zaključak da biljka koja pokazuje povišenu razinu ovog enzima treba povećanu količinu energije za obranu od oksidacijskog stresa.

Protein identificiran kao nukleozid difosfat kinaza 1 (NDP kinaza 1) pokazao je povećanu ekspresiju nakon oba tipa tretmana. NDP kinaze su nespecifični enzimi i kataliziraju prevorbe različitih di- i tri- fosfata. Otero (2000) je utvrdio da NDP kinaza ima važnu ulogu u procesu signalizacije koji je potaknut oksidacijskim stresom. Također je utvrđeno da NDP kinaze reguliraju redoks stanje stanice i povećavaju toleranciju na višestruki stres u transgeničnim biljkama *A. thaliana* (Moon i sur. 2003). Rogić i sur. (2015) uočili su da je ekspresija adenozin kinaze 2 bila povećana u tumorskom tkivu kaktusa koji je bio izložen osmotskom stresu, a pojačana sinteza ovog proteina bila je povišena i tijekom izloženosti različitih biljnih vrsta solnom stresu (Aghaei i sur. 2008, Sobhanian i sur. 2010). Osim

kategorije Odgovor na stres (abiotički), ovaj protein sam svrstala i u kategoriju Metabolizam nukleotida, jer ima ključnu ulogu i u sintezi nukleozid trifosfata.

RNA-vezujući proteini imaju ključnu ulogu u kontroli postranslacijskog metabolizma RNA tijekom rasta i razvoja biljaka i njihovog odgovora na stres (Lorković i sur. 2009, Xu i sur. 2014). U ovom istraživanju dva su proteina identificirana kao glicinom bogati RNA-vezujući protein (eng. *glycine-rich RNA-binding protein*, GRP), koji u odnosu na kontrolu nije pokazao promjenu u ekspresiji nakon tretmana s AgNP, ali je nakon izlaganja klijanca tretmanu s $AgNO_3$ njegova ekspresija bila povećana. Kim i sur. (2007) objavili su pojačanu ekspresiju proteina GRP7 nakon izlaganja biljke *A. thaliana* stresu uzrokovanom sušom, povišenim salinitetom te hladnoćom te je povezali s boljom adaptacijom biljaka na navedne stresne čimbenike. Stoga možemo pretpostaviti da i u duhanu izloženom tretmanima srebra ovi proteini imaju ulogu u adaptaciji na stres. Osim u kategoriju Odgovor na stres (abiotički), protein GRP svrstala sam i u kategoriju Transkripcija molekule RNA, jer veže jednolančanu molekulu RNA i molekulu DNA te je uključen u alternativni splicing molekule mRNA. Iida i sur. (2004) utvrdili su da je alternativni splicing, koji omogućava sintezu različitih peptida prema informaciji iz jednog gena, reguliran različitim abiotičkim stresnim čimbenicima, kao npr. stresom izazvanim hladnoćom.

Proteinske molekule su finalni produkti protoka informacije koji započinje s DNA i preko RNA završava sintezom proteina (Nelson i sur. 2008). Biljke reguliraju procese sinteze proteina kako bi odgovorile na razne stresne uvjete, a za te procese važni su proteini koji djeluju kao transkripcijski i elongacijski faktori. U svom istraživanju identificirala sam dva eukariotska elongacijska faktora (eIF5A), eIF5A-1 i eIF5A-3, koje sam svrstala u kategoriju Biosinteza proteina. Protein eIF5A-1 pokazao je povećanu ekspresiju nakon oba tipa tretmana, dok je eIF5A-3 pokazao povećanu ekspresiju samo nakon tretmana s $AgNO_3$. Smatra se da je eIF5A uključen u selektivnu translaciju mRNA i da ima važnu ulogu u prilagodbi biljaka promjenjivim uvjetima okoline (Wang i sur. 2012). Naime, može biti pojačano eksprimiran uslijed abiotičkog stresa, prilikom čega povećava toleranciju biljke na solni stres i stres uzrokovan teškim metalima na način da utječe na povećanje sinteze proteina za detoksifikaciju ROS, a također djeluje na povećanje aktivnosti antioksidacijskih enzima, sprječava gubitak klorofila te oštećenje staničnih membrana (Wang i sur. 2012, Zheng i sur. 2017). Vannini i sur. (2013) zabilježili su povećanu ekspresiju proteina eIF5A u klijancima vrste *E. sativa* nakon tretmana s $AgNO_3$, dok su Vannini i sur. (2014) u klijancima pšenice zabilježili povećanu ekspresiju istog proteina nakon tretmana s AgNP. Navedena istraživanja su u skladu s rezultatima dobivenima ovim radom.

Novosintetizirani protein je biološki neaktivan sve dok procesom smatanja ne poprimi svoju nativnu trodimenzionalnu strukturu (Hartl i Hayer-Hartl 2009). Ako protein ne poprimi svoju pravilnu konformaciju, ne može izvoditi svoju biološku funkciju (Valastyan i Lindquist 2014). U stanicama postoji nekoliko mehanizama koji se aktiviraju kao odgovor na nepravilno smatanje proteina, a jedan od najčešćih je ekspresija različitih molekulskih šaperona koji pomažu nesmotanim ili nepravilno smotanim proteinima da poprime pravilnu konformaciju i time osiguraju izvršavanje svoje biološke uloge. U svom sam istraživanju identificirala nekoliko skupina molekulskih šaperona, koji su u usporedbi s kontrolom pokazali uglavnom pojačanu ekspresiju nakon oba tipa tretmana. Poznato je da kao odgovor na različite biotičke i abiotičke čimbenike stresa, biljke aktiviraju tzv. odgovor na toplinski šok (eng. *heat shock response*, HSR), što rezultira ekspresijom gena koji kodiraju molekulske šaperone, proteaze i druge proteine neophodne za zaštitu i oporavak staničnog oštećenja (Bromberg i Weiss 2016). Biljni proteini toplinskog šoka (eng. *heat shock proteins*, HSPs) kategorizirani su prema svojoj molekulskoj masi u pet razreda: Hsp (12 - 40 kDa), Hsp60, Hsp70, Hsp90 i Hsp100 (Virdi i sur. 2015), a odgovorni su za pravilno smatanje i stabiliziranje proteina, translokaciju i degradaciju u mnogim staničnim procesima (Wang i sur. 2004). Iako su proteini HSP prvo identificirani kao proteini čija ekspresija ovisi o toplinskom stresu, njihova se uloga pokazala važna i u ostalim stresnim stanjima poput suše, povišenog saliniteta ili infekcija patogena (Wang i sur. 2011, Breiman 2014, Rogić i sur. 2015). U ovom istraživanju uočila sam pojačanu ekspresiju kloroplastnog i citoplazmatskog Hsp70 nakon tretmana s $AgNO_3$. Neka istraživanja pokazuju da su proteini Hsp70 uključeni u odgovor biljke na stres koji je uzrokovan teškim metalima, pri čemu je uočena njihova zaštitna uloga kod primarnih oštećenja staničnih membrana (Hall 2002). Nadalje, smatra se da ovi proteini u stresnim uvjetima kontroliraju i pravilno smatanje proteina (Whitley i sur. 1999) te stabiliziraju proteine (Huttner i Strasser 2012). Stoga sam ovaj protein osim u kategoriju Odgovor na stres (abiotički) svrstala i u kategoriju Smatanje proteina. Povećanu ekspresiju proteina Hsp70 detektirali su Vannini i sur. (2013) nakon tretmana klijanaca vrste *E. sativa* s AgNP, što je djelomično u skladu s rezultatom mog istraživanja u kojem je ekspresija proteina Hsp70 bila povećana nakon tretmana s $AgNO_3$, a nepromijenjena nakon tretmana s AgNP. U ovom radu zabilježila sam i pojačanu ekspresiju plastidne alfa i beta podjedinice šaperonina 60 nakon tretmana s $AgNO_3$. Kim i sur. (2013) utvrdili su da ovaj kloroplastni šaperon sudjeluje u smatanju velike podjedinice enzima Rubisco u riži. Ovi rezultati upućuju na zaključak da navedeni proteini imaju ključnu ulogu u odgovoru biljke na abiotički stres uzrokovan tretmanom s $AgNO_3$.

Nakon tretmana s $AgNO_3$, u klijancima je u ovom radu utvrđena i povećana ekspresija kalretikulina, šaperona endoplazmatskog reitikuluma, koji je uz smatanje proteina odgovoran i za vezanje iona Ca^{2+}. Endoplazmatski retikulum je stanični organel uključen u sintezu, smatanje, modifikaciju i provjeru kvalitete proteina, a sam proces smatanja proteina vrlo je osjetljiv na promjene u homeostazi tog organela, kao što je npr. oksidacijski stres (Schwarz i Blower 2016). Akumulacija nesmotanih ili pogrešno smotanih proteina u endoplazmatskom retikulumu aktivira odgovor na nesmotane proteine (eng. *unfolded protein response*, UPR), koji rezultira povećanjem kapaciteta za smatanje proteina, smanjenom globalnom sintezom proteina i pojačanom degradacijom pogrešno smotanih proteina (Cao i Kaufman 2012). Osim karletikulina, u ovom sam radu zabilježila i pojačanu ekspresiju plastidnog ciklofilina nakon tretmana s $AgNO_3$, dok su citoplazmatski ciklofolin i plastidni prekursor šaperonina 21, proteini koji su također uključeni u smatanje proteina i to u citoplazmi odnosno plastidu (Wang i Heitman 2005), imali povećanu ekspresiju nakon oba tipa tretmana. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da je u ovom istraživanju aktivaciju odgovora UPR izazvao samo tretman s $AgNO_3$. Što se tiče odgovora HSR, on je također bio aktiviran nakon primjene tretmana s $AgNO_3$, ali i nakon tretmana s AgNP, što pokazuje pojačana ekspresija citoplazmatskog ciklofolina i plastidnog prekursora šaperonina 21. Iz ovih se rezultata može zaključiti da je tretman s $AgNO_3$ izazvao snažniji stres, što je dokazano i parametrima oksidacijskog stresa, koji su izmjereni u ovom radu (ROS, MDA, sadržaj proteinskih karbonila i % DNA u repu).

Biljke su razvile niz obrambenih mehanizama, a jedan od njih je indukcija i akumulacija tzv. PR proteina (eng. *pathogenesis-related*, PR). Naime, ti su proteini uključeni u odgovor biljke na ranjavanje ili infekciju prouzročenu patogenima, a akumuliraju se u većim količinama na mjestu infekcije (Leubner-Metzger i Meins 1999). U ovom je radu u klijancima detektirana beta bazična 1,3-glukanaza, čija je ekspresija bila smanjenja nakon oba tretmana. Za ovaj se protein smatra da djeluje direktno na degradaciju stanične stijenke patogena te da pokazuje indukciju, osobito pri obrani od gljivičnih patogena (Cheong i sur. 2000). U ovom radu detektirala sam i hitinaze, kiselu hitinazu i endohitinazu A. Za hitinaze je dokazana povećana ekspresija u korijenu nekih biljaka uslijed izlaganja povišenim koncentracijama metala (Beáta i Ildikó 2011, Vannini i sur. 2014). U mom istraživanju kisela hitinaza je nakon tretmana s AgNP pokazala ekspresiju jednaku kontroli, dok je nakon tretmana s $AgNO_3$ ekspresija bila povećana. Ishige i sur. (1993) su uočili da se prilikom izlaganja biljke *Vigna angularis* tretmanima s etilenom povećava akumulacija kisele hitinaze. S druge strane, u ovom je radu ekspresija endohitinaze A bila smanjena nakon oba tipa tretmana.

Kao što je prethodno navedeno, abiotički stres često negativno utječe na transportni lanac elektrona, uslijed čega u kloroplastima i mitohondrijima nastaju $^{\bullet}O_2^-$ i $^1O_2$ (Li i Jin 2007), što može rezultirati pojavom oksidacijskog stresa (Balen i sur. 2011, Cvjetko i sur. 2014a, Rogić i sur. 2015), kao i aktivacijom antioksidacijskog sustava biljke. Tako je povećana razina izoformi SOD, kao prve linije obrane biljke od oksidacijskog stresa, zabilježena u mnogim vrstama biljaka izloženima stresu metalima (Hossain i Komatsu 2015). U ovom je istraživanju nakon tretmana klijanaca s AgNP i $AgNO_3$ izmjerena povećana aktivnost SOD spektrofotometrijski, u nativnom gelu i imunodetekcijom. To je u skladu s rezultatima analize proteoma klijanaca izloženih tretmanu s 100 μM AgNP i $AgNO_3$ u kojima je identificirana pojačana ekspresija Fe-SOD, izoforme koja se primarno nalazi u kloroplastima. Vannini i sur. (2013) također su zabilježili pojačanu ekspresiju Fe-SOD i aktivnost SOD nakon izlaganja klijanaca vrste *E. sativa* tretmanu s AgNP. Nadalje, ovaj rezultat je u korelaciji s ostalim rezultatima proteomske analize na temelju kojih se može zaključiti da je većina proteina koji su pokazali diferencijalnu ekspresiju nakon oba tipa tretmana pripada upravo proteinima kloroplasta, što ukazuje na to da su kloroplasti organeli koji su najosjetljiviji na ovaj tip abiotičkog stresa. U prilog ovom zaključku govore i promjene u ultrastrukturi kloroplasta, koje su nakon izlaganja tretmanima s AgNP zabilježene u vodenoj leći *Spirodela polyrhiza* (Jiang i sur. 2014). Uklanjanje H_2O_2 nastalog aktivnošću SOD preuzimaju enzimi PPX, APX i CAT. Proteomskom analizom tri proteina identificirana su kao APX, čija je ekspresija bila povećana nakon oba tipa tretmana, što se slaže i s mjerenjima aktivnosti tog enzima te ukazuje na pojačanu aktivnost ovog enzima uslijed oksidacijskog stresa. Svi ovi rezultati potvrđuju pojavu oksidacijskog stresa uslijed tretmana s obje vrste srebra te aktivaciju obrambenih mehanizama klijanaca.

U svom sam istraživanju identificirala i protein CBSX3 sličan mitohondrijskom (oko 23 kDa), koji sadrži domene cistationin β-sintaze (eng. *cystathionine beta synthase*, CBS). Iako je broj radova koji obrađuju funkcije domena ovoga proteina mali, pretpostavlja se da on regulira aktivaciju tioredoksina i time utječe na razinu staničnog H_2O_2 te tako sudjeluju u biljnom razvoju i odgovoru na stres (Ok i sur. 2012). Treba napomenuti da je tioredoksin mali, sveprisutan protein koji se nalazi u svim organizmima, a zahvaljujući svom niskom redoks potencijalu glavna je stanična disulfidna reduktaza koja sudjeluje u različitim fiziološkim procesima te djeluje kao antioksidans (Holmgren 1995). Smatra se da bi mitohondrijski CBSX3 mogao imati ulogu u različitom odgovoru biljaka na stres uzrokovan ionima Ag^+ i AgNP (Banić 2017). U ovom je radu ekspresija proteina CBSX3 bila povišena nakon oba tipa tretmana. Ova povišena ekspresija je u skladu s rezultatima analize ukupnih staničnih proteina (SDS-PAGE)

ovog istraživanja, gdje sam uočila povećanu ekspresiju proteina molekulske mase od oko 23 kDa, što bi moglo biti povezano s pojačanom ekspresijom CDSX3.

Protein kalmodulin-2 uključen je u prijenos signala ionima Ca^{2+}, a nakon interakcije s Ca^{2+} prolazi kroz konformacijsku promjenu i utječe na aktivnosti različitih CaM-vezujućih proteina (Virdi i sur. 2015). U ovom sam istraživanju zabilježila pojačanu ekspresiju ovog proteina, što ukazuje na unutarstanične promjene u razini Ca^{2+} što može biti povezano sa stresnim uvjetima (Wilkins i sur. 2016). Brojni proteini koji vežu CaM također su uključeni u reakcije koje su u biljnim stanicama potaknute različitim tipovima stresa, što dokazuje da CaM ima značajnu ulogu u prilagodbi biljke na nepovoljne uvjete okoline (Wilkins i sur. 2016).

5.2. Učinci na odraslim biljkama duhana

5.2.1. Unos čestica AgNP i akumulacija Ag

Nakon primjene tretmana s AgNP i $AgNO_3$, analizirana je akumulacija Ag u korijenu i listu biljke duhana. Usporedbom količine Ag akumuliranog u različitim dijelovima biljke, može se zaključiti da je korijen akumulirao značajno veće količine Ag u odnosu na list; naime, koncentracija Ag u tkivu korijena bila je 30 do 100 puta veća nakon tretmana s AgNP te 30 do 70 puta veća nakon tretmana s $AgNO_3$. Ti su rezultati u skladu s istraživanjem kojeg su na odraslim biljkama pšenice proveli Shtangeeva i sur. (2011), gdje je nakon tretmana s AgNP i $AgNO_3$ u korijenu biljaka uočena veća koncentracija akumuliranog Ag. Nadalje, Geisler-Lee i sur. (2014) su također nakon izlaganja vrste *A. thaliana* tretmanu s AgNP uočili da je razina Ag u korijenu bila 10 puta veća od razine Ag akumuliranog u listu. Tripathi i sur. (2017a) navode da su stanice korijena glavno mjesto unosa AgNP te da u korijen ulaze zajedno s vodom i u njoj otopljenim tvarima. Neki autori smatraju da se AgNP uglavnom zadržavaju u stanicama korijena biljke i da se slabo transportiraju u list (Thuesombat i sur. 2014) te da je to obrambeni mehanizam koji sprječava akumulaciju Ag u ostale dijelove biljke, potpuno ili djelomično (Yin i sur. 2012, Vannini i sur. 2014).

Promatrajući rezultate unosa Ag u pojedinoj vrsti tkiva s obzirom na izloženost različitim oblicima Ag, dobivene su slične vrijednosti nakon oba tipa tretmana, koje se nisu statistički značajno razlikovale na istoj primijenjenoj koncentraciji tretmana AgNP i $AgNO_3$. Također, sadržaj Ag rastao je s porastom koncentracija AgNP i $AgNO_3$ i u korijenu i u listu. Kao što sam već navela, unos i akumulacija AgNP u stanici ovise o strukturi i propusnosti stanice, veličini nanočestica (Li i sur. 2015) te vrsti biljke, pa neka istraživanja na različitim biljnim vrstama pokazuju nižu akumulaciju Ag nakon tretmana s AgNP u odnosu na tretman s

$AgNO_3$ (Yasur i Rani 2013, Pokhrel i Dubey 2013, Cvjetko i sur. 2017), a druga istraživanja daju oprečne rezultate (Geisler-Lee i sur. 2012, Nair i Chung 2014a). U mom se istraživanju veće koncentracije akumuliranog Ag u stanicama korijena nakon oba tipa tretmana mogu povezati s rezultatima svjetlosne i elektronske mikroskopije, koji su pokazali vakuolizaciju stanica korijena nakon izlaganja odraslih biljaka duhana tretmanima sa 100 μM AgNP i 100 μM $AgNO_3$, u usporedbi s kontrolom (Cvjetko i sur. 2018). To navodi na zaključak da bi upravo vakuole mogle biti glavno mjesto skladištenja akumuliranog Ag. Vakuolizacija stanica korijena uočena je i nakon izlaganja biljaka vrste *E. sativa* (Vannini i sur. 2014) i *Lolium multiflorum* (Yin i sur. 2011) tretmanima s AgNP. Nadalje, analiza stanica korijena odraslih biljaka duhana izloženih tretmanu sa 100 μM AgNP elektronskom mikroskopijom pokazala je prisutnost crnih točkica u stanicama korijena, a analiza EDX potvrdila je da se radi o česticama AgNP (Cvjetko i sur. 2018). Čestice AgNP detektirane su u vakuolama stanica korijena riže (Mazumdar i Ahmed 2011) i gorušice (Mazumdar 2014) te u plazmodezmijama, staničnoj stijenci te središnjim lamelama stanica korijena *A. thaliana* (Geisler-Lee i sur. 2012). S druge strane, prisutnost AgNP u stanicama listova biljaka duhana tretiranih sa 100 μM AgNP nije zabilježena (Cvjetko i sur. 2018), što se slaže s puno nižom količinom Ag, koja je detektirana u listovima.

5.2.2. Oksidacijski stres i aktivnost antioksidacijskih enzima

Neka od dosadašnjih istraživanja pokazala su da AgNP i $AgNO_3$ mogu izazvati oksidacijski stres u stanicama odraslih biljaka povećanjem razine ROS (Nair i Chung 2014a, Jiang i sur. 2014, Barbasz i sur. 2016). Rezultati dobiveni u ovom istraživanju ukazuju na to da je u korijenu odraslih biljaka duhana do povećanog sadržaja ROS došlo samo pri najvišim ispitanim koncentracijama $AgNO_3$ (100 i 500 μM), dok u tretmanima s AgNP nije bilo promjena u odnosu na kontrolu. To je u skladu s rezultatima istraživanja drugih autora, koji su pokazali da $AgNO_3$ jače inducira oksidacijski stres u odnosu na tretman s AgNP u vrstama *A. thaliana* (Nair i Chung 2014a) i *O. sativa* (Nair i Chung 2014b). Istraživanje fitotoksičnosti čestica AgNP s različitim tipovima omotača, provedeno na korijenu biljke *Allium cepa*, pokazalo je da tretmani s AgNP s citratnim omotačem, koje sam koristila i ja u svom istraživanju, nisu rezultirali povećanim sadržajem ROS niti na jednom tretmanu; AgNP-PVP i AgNP-CTAB su izazvali oksidacijski stres nakon primjene 50, 75 i 100 μM koncentracija, dok su izlaganja tretmanima s $AgNO_3$ rezultirala povećanim stvaranjem ROS već nakon primjene najniže koncentracije od 25 μM (Cvjetko i sur. 2017). Slične rezultate su zabilježili i Panda i

sur. (2011) u svom istraživanju na vrsti *A. cepa*, u kojem su pokazali da je tretman s $AgNO_3$ izazvao nastanak većeg sadržaja $^{\bullet}O_2^-$ i H_2O_2 u usporedbi s AgNP, te je uslijed povišene razine ROS inducirao smrt stanica i oštećenje DNA. Svi navedeni rezultati upućuju na to da $AgNO_3$ ima veći toksični učinak na korijen biljke duhana u usporedbi s AgNP. Ovi bi se rezultati mogli objasniti stabilnošću čestica AgNP za koje je dokazan direktni unos u biljku. Naime, AgNP su nakon unosa stabilne, odnosno ostaju u obliku nanočestica i ne oslobađaju ione Ag^+, koji imaju toksične učinke. Što se tiče listova odraslih biljaka, u ovom istraživanju AgNP i $AgNO_3$ nisu izazvali nastanak ROS, što je u skladu s nižim sadržajem Ag izmjerenim u listovima u odnosu na korijen. Međutim neka istraživanja pokazuju da se toksičnost AgNP ne može u potpunosti pripisati ionskom srebru, jer su tretmani s AgNP pokazali veću toksičnost nego ekvivalentna koncentracija iona Ag^+ (Geisler-Lee i sur. 2012, Qian i sur. 2013). Dakle odgovor biljke na tretman s AgNP ovisi o vrsti biljke te o tipu AgNP, primarno o tome imaju li nanočestice omotač ili ne, te ukoliko imaju omotač, postoje razlike u učinku na biljni organizam koji ovisi o vrsti omotača.

Cjelovitost stanične membrane može biti narušena peroksidacijom lipida, koju uzrokuju ROS (Suresh i sur. 2010, Anjum i sur. 2013, Sosan i sur. 2016,), čime se može promijeniti cjelokupno fuunkcioniranje stanice (Labudda 2013). Dosadašnja istraživanja učinaka AgNP na lipidnu peroksidaciju u odraslim biljakama nisu dala jednoznačne rezultate. Naime, u stabljici vrste *Gerbera jamesonii* detektirano je smanjenje sadržaja MDA u odnosu na kontrolu (Kazemi i Ameri 2012), dok je u kalusu pšenice uočen veći sadržaj MDA (Barbasz i sur. 2016) nakon tretmana s $AgNO_3$ u usporedbi s AgNP. Rezultati mog istraživanja pokazali su da u korijenu nije došlo do pojačane lipidne peroksidacije nakon tretmana s AgNP, što je u skladu s izmjerenim sadržajem ROS. Nakon tretmana s $AgNO_3$, značajno povećani sadržaj MDA izmjerila sam pri svim koncentracijama, izuzev najviše koncentracije od 500 μM, što je također uglavnom u skladu s povećanim sadržajem ROS. Smanjenje sadržaja MDA pri najvišoj koncentraciji $AgNO_3$ može biti posljedica oštećenja tkiva i stanica korijena, koji su bili izloženi vrlo jakom oksidacijskom stresu koji je nadvladao obrambene mehanizme biljke (Barbasz i sur. 2016).

Nakon tretmana s AgNP, u tkivu lista sadržaj MDA bio je značajno povećan pri najvišoj koncentraciji (500 μM), što je donekle iznenađujući rezultat s obzirom da u istom tretmanu nije zabilježen povećani sadržaj ROS u odnosu na kontrolu. Pritom treba napomenuti da je u ovom istraživanju sadržaj ROS određen DHE testom, kojim se uglavnom mjeri stvaranje $^{\bullet}O_2^-$ (Domijan i Abramov 2011), dok lipidnu peroksidaciju mogu izazvati i drugi oblici ROS, čiju koncentraciju u ovom radu nisam mjerila.

Ovaj rezultat djelomično je u skladu s rezultatima drugih autora, koji su uglavnom zabilježili povećani sadržaj MDA u listovima nakon izlaganja različitih biljnih vrsta tretmanima s AgNP (Qian i sur. 2013). S druge strane, Hatami i Ghorbanpour (2013) su uočili početno smanjenje MDA pri nižim koncentracijama te nagli porast pri višim koncentracijama AgNP u kultivarima vrste *Pelargonium zonale*. Slično kao i nakon tretmana s AgNP, nakon tretmana s $AgNO_3$, značajno povišene vrijednosti sadržaja MDA izmjerila sam nakon primjene najviših koncentracija (100 i 500 μM), iako sadržaj ROS na istim tretmanima nije bio značajno povišen. Značajno povećanje lipidne peroksidacije u listu nakon izlaganja biljke tretmanu s $AgNO_3$ zabilježeno je i u istraživanju Navabpour i sur. (2003), koji su također utvrdili da $AgNO_3$ uzrokuje nastanak različitih vrsta ROS.

U odraslim biljakama duhana nakon tretmana s AgNP nisam zabilježila povećani sadržaj proteinskih karbonila ni u korijenu, niti u listu, što je uglavnom u skladu s izmjerenim sadržajem ROS i MDA. S druge strane, nakon tretmana s $AgNO_3$, u korijenu i listu duhana sadržaj karbonila značajno se povećao u odnosu na kontrolu nakon svih primijenjenih koncentracija, uz iznimku najmanje koncentracije od 25 μM $AgNO_3$ u listu. Povećanje oksidacijskog oštećenja proteina zabilježeno je i u korijenu luka nakon tretmana s 75 i 100 μM $AgNO_3$ (Cvjetko i sur. 2017), iako je u istom radu sadržaj proteinskih karbonila bio povećan i nakon primjene tretmana s AgNP-citrat, koje sam koristila i ja u svom istraživanju, što govori u prilog teoriji da odgovor biljke na tretman s istim tipom AgNP ovisi o vrsti biljke.

Analiza oštećenja molekule DNA provedena Comet testom pokazala je da u korijenu i listovima duhana nema povećanog oštećenja molekule DNA nakon tretmana s AgNP, što je u skladu sa dobivenim rezultatima sadržaja ROS, MDA i proteinskih karbonila. Ovi su rezultati također u korelaciji s rezultatima istraživanja kojeg su proveli Cvjetko i sur. (2017), u kojem također nije zabilježeno značajno oštećenje molekule DNA u korijenu luka nakon tretmana s AgNP s citratnim omotačem. Nasuprot tome, tretmani s $AgNO_3$ rezultirali su povećanim oštećenjem DNA u stanicama korijena nakon svih ispitanih koncentracija, a u listu nakon primjene dvije najviše koncentracije (100 i 500 μM). Ovi rezultati u skladu su s dobivenim vrijednostima za ostale izmjerene parametre oksidacijskog stresa nakon tretmana s $AgNO_3$, izuzev sadržaja ROS u listovima, koji nije pokazao statistički značajno povećanje. Nadalje, ovi rezultati koreliraju i s rezultatima toksičnosti iona Ag^+ ispitanim u vrstama *A. thaliana* (Nair i Chung 2014a).

Kako je već prethodno navedeno, aktivnost antioksidacijskog sustava biljke, koji uključuje i antioksidacijske enzime, ovisan je o stadiju razvoja biljke, mjestu unosa, vremenu izlaganja te o vrsti i koncentraciji ksenobiotika. To je potvrđeno i ovim istraživanjem, gdje za

razliku od klijanaca, tretman odraslih biljaka s AgNP nije pokazao značajnu razliku u aktivnosti SOD ni u korijenu ni u listu u odnosu na kontrolu. To se može povezati s rezultatima sadržaja ROS dobivenima testom DHE. Naime, test DHE određuje sadržaj ROS uglavnom mjerenjem stvaranja $^{\bullet}O_2^-$ (Domijan i Abramov 2011), kojeg neutralizira SOD. U korijenu i listu biljaka tretiranih s AgNP nije došlo do povećanog stvaranja $^{\bullet}O_2^-$ te stoga nisu bile zabilježene značajne promjene u aktivnosti SOD spektrofotometrijskim mjerenjem i analizom izoformi u gelu, iako su rezultati imunodetekcije pokazali prisutnost dviju izoformi, od kojih je vrpca SOD1 pokazala pojačanu ekspresiju nakon tretmana sa 100 i 500 μM AgNP. No, pojačana ekspresija proteina ne mora biti nužno povezana s njegovom povećanom aktivnošću. U istraživanju Barbasz i sur. (2016), nakon izlaganja kalusa pšenice tretmanu s AgNP također nije bilo značajne razlike u aktivnosti SOD. Što se tiče tretmana s $AgNO_3$, povećanje aktivnosti SOD u korijenu, zabilježeno nakon primjene najnižih koncentracija (25 i 50 μM) u skladu je niskim vrijednostima sadržaja ROS, što pokazuje da je SOD uspješno neutralizirao ROS. S druge strane, pri najvišim koncentracijama $AgNO_3$ (100 i 500 μM) zabilježeno je značajno povećanje sadržaja ROS i smanjenje aktivnosti SOD, što ukazuje na jaki oksidacijski stres koji je suprimirao aktivnost enzima, a to potvrđuju i rezultati oštećenja proteina, membrana i DNA. Ovi se rezultati mogu povezati i s rezultatima imunodetekcije, gdje je detektirana jedna izoforma SOD, čija je ekspresija bila najjača na tretmanu s 25 μM $AgNO_3$ i postupno se smanjivala s povećanjem koncentracije $AgNO_3$, da bi pri najvišoj ispitanoj koncentraciji bila slabija od kontrole. I Barbasz i sur. (2016) su nakon izlaganja kalusa pšenice tretmanima s $AgNO_3$ detektirali početno povećanje aktivnosti SOD, koje je u odnosu na kontrolu bilo statistički značajno, no s povećanjem koncentracije tretmana uočili su smanjenje aktivnosti ovog enzima. U tkivu lista spektrofotometrijski izmjerena aktivnost SOD nije bila značajno različita od kontrole nakon primjene oba tipa tretmana. Ovi rezultati koreliraju i s rezultatima koje sam dobila analizom izoformi SOD u gelu i s rezultatima imunodetekcije te potvrđuju da je učinak ispitanih tretmana bio slabiji u listovima odraslih biljaka duhana u odnosu na korijen, a mogu se objasniti činjenicom da manja akumulacija Ag u listu ne izaziva značajnije povećanje sadržaja $^{\bullet}O_2^-$, a time se ne povećava ni aktivnost SOD.

Korijen biljke nije pokazao značajnu razliku u aktivnosti enzima PPX nakon tretmana s AgNP u odnosu na kontrolu, što je u skladu s rezultatima istraživanja provedenim na luku *A. cepa*, u kojem se nakon tretmana s AgNP s citratnim omotačem aktivnost PPX nije značajno promijenila u odnosu na kontrolu (Cvjetko i sur. 2017). Tretmani s $AgNO_3$ inducirali su povećanje aktivnosti PPX u korijenu na svim primijenjenim koncentracijama u odnosu na kontrolu, iako statistički značajno samo nakon 50 μM. To je u skladu s rezultatima dobivenim

u gelu, gdje je intenzitet obojenja vrpci PPX1 i PPX2 bio snažniji nakon svih primjenjenih koncentracija $AgNO_3$ u odnosu na kontrolu. Slične su rezultate objavili i Cvjetko i sur. (2017), koji su nakon tretmana korjenčića luka s $AgNO_3$ uočili početni porast i značajno povećanja aktivnosti PPX pri koncentracijama od 50 i 75 μM, nakon čega je s porastom koncentracija tretmana aktivnosti enzima smanjena na razinu kontrolnog uzorka. Aktivnosti PPX u listu pokazala je značajno smanjenje pri dvije najviše koncentracije AgNP (100 i 500 μM) u odnosu na kontrolu, što je djelomično u skladu s rezultatima istraživanja koje su proveli Hatami i Ghorbanpour (2013), u kojem je nakon početnog povećanja aktivnosti PPX u listu vrste *P. zonale* uočeno smanjenje aktivnosti pri višim koncentracijama AgNP. Tretmani s $AgNO_3$ u listu su izazvali linearni porast aktivnosti PPX do koncentracije od 75 μM, nakon čega je uslijedilo smanjenje aktivnosti, koja je pri najvišoj koncentraciji bila podjednaka kontroli. Rezultati mog istraživanja upućuju na zaključak da je ekspresija PPX povezana s pojavom oksidacijskog stresa, koji može izazvati pojačanu aktivnost ovog enzima, što je zabilježeno pri nižim koncentracijama $AgNO_3$ ili inhibirati njegovo djelovanje uslijed preopterećenosti antioksidacijskog sustava, što sam dobila nakon izlaganja biljaka većim koncentracijama oba tipa tretmana, a naročito je bilo izraženo u tretmanima s $AgNO_3$. Iako nakon tretmana biljke s AgNP, ovim istraživanjem nije utvrđeno značajnije povećanje $^{\bullet}O_2^-$, moguće je da je oksidacijski stres bio uzrokovan pojavom drugih oblika ROS, koji u ovom radu nisu mjereni, a mogli bi biti uzrokom aktivacije/inaktivacije PPX. Zhang i sur. (2005) uočili su linearni porast aktivnosti PPX s porastom koncentracija s $AgNO_3$ u jagodi, dok su Barbasz i sur. (2016) zabilježili smanjenje aktivnosti u kalusu pšenice nakon tretmana s AgNP i $AgNO_3$.

Aktivnost APX u korijenu odraslih biljaka bila je značajno smanjena pri najvišim koncentracijama AgNP i $AgNO_3$ (100 i 500 μM), što se u slučaju primjene tretmana s $AgNO_3$ može povezati sa porastom sadržaja ROS, koji je utvrđen pri navedenim koncentracijama.. Naime, nakon enzima SOD, koji dismutira $^{\bullet}O_2^-$ u slabije reaktivni H_2O_2, u detoksifikacijski se mehanizam uključuju i drugi enzimi, pa tako i APX. Stoga bi smanjenje aktivnosti APX u ovom istraživanju moglo ukazati na preopterećenost antioksidacijskog sustava, što rezultira smanjenjem aktivnosti ovog enzima. S druge strane, moguće je da je inhibicija aktivnosti APX direktna posljedica ionskog srebra, što zatim rezultira povećanim stvaranjem ROS. Cvjetko i sur. (2017) također su zabilježili smanjenje aktivnosti APX nakon izlaganja korijena vrste *A. cepa* tretmanu s AgNP s citratnim omotačem. Analize izoformi APX korijena u gelu nakon tretmana s AgNP i $AgNO_3$ otkrile su četiri vrpce, koje su pri višim koncentracijama oba tipa tretmana imale smanjeni intenzitet, što je u skladu s rezultatima spektrofotomerijskog mjerenja aktivnosti. Nadalje, imunodetekcijom je otkrivena samo jedna vrpca, čija je ekspresija slabila s

porastom koncentracija oba tipa tretmana, što je također u skladu s rezultatima dobivenim spektrofotometrijski i u gelu. List duhana nije pokazao promjene u aktivnosti APX u odnosu na kontrolu nakon tretmana s AgNP i $AgNO_3$, što se može povezati s niskom količinom akumuliranog Ag i s niskim sadržajem ROS. Ovi rezultati razlikuju se od literaturnih podataka koji navode povećanu aktivnost APX u listovima vrste *P. zonale* nakon tretmana s AgNP (Hatami i Ghorbanpour 2013) i jagode nakon tretmana s $AgNO_3$ (Qin i sur. 2005). Zanimljivo je uočiti da je u ovom istraživanju na gelu bilo detektirano 8 izoformi APX, čije su vrpce s porastom koncentracija oba tretmana pokazale jednaku ili smanjenu ekspresiju u odnosu na kontrolu, što je u skladu s rezultatima spektrofotometrijskog mjerenja aktivnosti.

Aktivnost CAT u korijenu biljaka pokazala je značajno povećanje na nižim koncentracijama AgNP i $AgNO_3$, dok je pri 100 µM uočen pad vrijednosti, koji je na najvišoj ispitanoj koncentraciji od 500 µM rezultirao vrijednostima sličnim kontroli. Ovi rezultati su u skladu s rezultatima mjerenja aktivnosti u gelu te s rezultatima imunodetekcije. Značajna inhibicija aktivnosti ovog enzima zabilježena je i u vodenoj leći nakon primjene viših koncentracija AgNP (Puntarić 2014) te u korijenu luka nakon primjene viših koncentracija AgNP i $AgNO_3$ (Cvjetko i sur. 2017). Kao i kod PPX, povećanje aktivnosti CAT pri nižim koncentracijama oba tipa tretmana upućuje na aktivaciju antioksidacijskog sustava kao obrane od oksidacijskog stresa, dok smanjenje aktivnosti CAT na višim koncentracijama može biti posljedica inhibitornog učinka. Poznato je da postoji više izoenzima katalaze koji mogu biti različito eksprimirani ovisno o razvojnom stadiju biljke, vrsti tkiva, uvjetima uzgoja i drugo. Smanjenje ekspresije katalaze molekularne mase od oko 60 kDa, što odgovara jednoj podjedinici, te istodobno povećanje ekspresije proteina manje mase (oko 40 kDa) dobiveno imunodetekcijom, ukazuje na okrnjeni polipeptid (Schmidt i sur 2010), vjerojatno kao posledjedica degradacije. U listu duhana sve koncentracije AgNP značajno su smanjile aktivnost CAT, što je bilo najjače bilo izraženo nakon tretmana s 100 i 500 µM. Barbasz i sur. (2016) su nakon izlaganja kalusa pšenice tretmanu s AgNP zabilježili rezultate slične mojima, dok je u vrsti *Spirodela polyrhiza* (Jiang i sur. 2014) uočeno povećanje aktivnosti CAT nakon tretmana s AgNP. Rezultati spektrofotometrijskog mjerenja aktivnosti u skladu su s rezultatima analize aktivnosti u gelu, gdje su uočene tri izoforme ovog enzima, čija je ekspresija slabila s porastom koncentracije tretmana. Imunodetekcijom proteina CAT u tkivu lista nakon tretmana s AgNP uočene su dvije vrpce, čija je aktivnost rasla s porastom koncentracija tretmana, da bi pri 500 µM bila najizraženije ekspresije. Istovremeno, javlja se i manji protein koji ukazuje na degradaciju, pa je moguće da biljka povećanjem ekspresije proteina pokušava nadomjestiti oštećeni protein. Hatami i Ghorbanpour (2013) su u vrsti *P. zonale* uočili porast aktivnosti CAT

pri nižim koncentracijama AgNP, a smanjenje pri višim koncentracijama i zaključili da je oksidacijski stres nadvladao antioksidacijski kapacitet ovog enzima. Međutim, ja u tkivu lista nisam utvrdila značaniji oksidacijski stres, samo je pri najvišoj koncentraciji od 500 μM AgNP utvrđen statistički značajan porast sadržaja MDA. Što se tiče tretmana s $AgNO_3$, na nižim koncentracijama zabilježila sam blagi porast aktivnosti CAT, koji je dosegao najveću vrijednost pri 75 μM, a zatim se smanjivao i pri najvišoj koncentraciji od 500 μM bio značajno manji u odnosu na kontrolu. Ovi bi rezultati mogli upućivati na aktivaciju antioksidacijskog enzima CAT pri nižim koncentracijama $AgNO_3$, čija je aktivnost pri najvišoj koncentraciji $AgNO_3$ ipak bila nadvladana uslijed preopterećenosti antioksidacijskog sustava, što se slaže s pokazateljima oksidacijskog oštećenja koji su bili povišeni. S druge strane ovaj rezultat nije u skladu sa sadržajem ROS izmjerenim u listu. Budući da test DHE primarno mjeri stvaranje $^{\bullet}O_2^-$, trebalo bi izmjeriti i sadržaj H_2O_2, jer je pokazano da tretmani s $AgNO_3$ induciraju oksidacijski stres uslijed povećanja razine H_2O_2, kojeg CAT dismutira (Vishwakarma i sur. 2017). Budući da je smanjenje aktivnosti katalaze, kao i njena moguća degradacija izraženija kod AgNP, moguće je da baš AgNP direktno inhibira katalazu, jer kod ionskog srebra ovaj učinak nije toliko izražen.

Razmatrajući sve prethodno navedene rezultate, pokazatelji nastanka oksidacijskog stresa ukazuju na štetan učinak $AgNO_3$ već pri niskim primijenjenim koncentracijama, i na korijen i na list, iako je jači učinak zabilježen u korijenu, što je u skladu sa izmjernim većim sadržajem Ag. Ioni Ag^+ imaju učinak na transportni lanac elektrona i aktivnost antioksidacijskih enzima, što može rezultirati prekomjernom akumulacijom ROS te pojavom oksidacijskog stresa (Chudobova i sur. 2013). S druge strane, fitotoksičnost AgNP odnosno oksidacijska oštećenja makromolelula uglavnom nisam utvrdila. No, promjene u aktivnosti antioksidacijskih enzima ukazuju na to da se i biljke tretirane s AgNP ipak nalaze u stresnim uvjetima, uslijed čega se aktivirao antioksidacijski enzimski sustav, koji uspješno savladava učinke stresa. Pri višim koncentracijama AgNP zabilježeno je smanjenje aktivnosti PPX i CAT u listu te APX u korijenu, što ukazuje na preopterećenost antioksidacijskog sustava ili na njegovu direktnu inhibiciju. Navedene su promjene također jače izražene u korijenu u odnosu na list, što je u direktnoj vezi s količinom akumuliranog Ag. Budući da su sve navedene promjene jače izražene pri tretmanima s $AgNO_3$ u odnosu na AgNP, te da su neki učinci na enzime različiti, može se zaključiti AgNP nakon ulaska u stanice korijena ostaju većim dijelom u obliku nanočestica koje uzrokuju određene učinke, iako se otpuštanje Ag^+ s površine AgNP ne može sasvim isključiti, osobito pri višim koncentracijama.

5.2.3. Ekspresija staničnih proteina

Tretmani s AgNP nisu izazvali značajne promjene u koncentraciji ukupnih staničnih proteina u odnosu na kontrolu u korijenu i listu, dok su tretmani s $AgNO_3$ značajno smanjili vrijednosti pri svim primijenjenim koncentracijama u korijenu. Smanjena koncentracija proteina ukazuje na smanjenje metaboličke aktivnosti, kao prvog odgovora biljke na stresne uvjete, iako koncentracija proteina može biti i povišena uslijed aktivacije različitih procesa (Hossain i Komatsu 2013). Nadalje, elektroforetska analiza ekspresije ukupnih staničnih proteina korijena pokazala je da je u odnosu na kontrolu isti broj proteina pokazao povećanu ekspresiju nakon izlaganja tretmanu sa 100 µM AgNP i $AgNO_3$ (11), a da je smanjenu ekspresiju pokazalo više proteina nakon tretmana s AgNP (22), u odnosu na tretman s $AgNO_3$ (18). Povećanu ekspresiju u listu duhana zabilježila sam za 7 proteina nakon tretmana s AgNP te za 12 proteina nakon tretmana s $AgNO_3$, dok je smanjenu ekspresiju pokazalo 30 proteina nakon tretmana s AgNP te 14 proteina nakon tretmana s $AgNO_3$. S obzirom da su nakon oba tipa tretmana u oba tkiva zabilježene promjene u parametrima oksidacijskog stresa i/ili aktivnosti antioksidacijskih enzima, promjene u ekspresiji proteina bile su očekivane. No, ono što je iznenađujuće je da je izlaganje biljaka nanočesticama srebra rezultiralo većim promjenama u broju proteina u odnosu na $AgNO_3$ i u korijenu (AgNP – 33; $AgNO_3$ – 29) i u listu (AgNP – 37; $AgNO_3$ – 28) te da je podjednaki broj proteina pokazao razlikovnu ekspresiju u korijenu i listu nakon oba tipa tretmana.

5.2.4.1. Promjene u proteomskoj slici korijena duhana

Kvantitativna analiza ekspresije staničnih proteina u korijenu biljaka duhana, koje su bile izložene tretmanima sa 100 µM AgNP i $AgNO_3$, pokazala je da je u odnosu na kontrolu većina diferencijalno eksprimiranih proteina imala smanjenu ekspresiju, što je bilo jače izraženo nakon tretmana s AgNP. Najveći broj proteina sa smanjenom ekspresijom nakon oba tipa tretmana pripisan je kategoriji bioloških procesa Odgovor na stres i Metabolizam ugljikohidrata, što je u skladu s dostupnom literaturom. Naime, nakon izlaganja vrste *Brassica napus* česticama AgNP, smanjena ekspresija proteina korijena pripisana je promjenama u aktivnosti antioksidacijskih enzima, gdje je aktivnost SOD i CAT u korijenu biljke bila smanjena, kao i promjenama u ekspresiji nekih specifičnih proteina (Pozveh i sur. 2014).

U mom su istraživanju od proteina povezanih s odgovorom na stres (abiotički i biotički) detektirani osmotin, aneksini, proteini koji pripadaju potporodici 1 proteina *germin-like*, nukleozidna difosfat kinaza (NDP kinaza) i bazična beta-1,3-glukanaza. Osmotin je

niskomolekularni protein i neenzimski antioksidans koji pripada porodici proteina vezanih uz patogene (eng. *pathogenesis-related (PR)-5 family*), budući da sudjeluje u proteolizi membrane patogena (Kumar i sur. 2015). Osim što u biljkama ima zaštitnu ulogu pri pojavi biotičkog stresa, poznato je da se njegova se ekspresija povećava i pri abiotičkom stresu, čime se povećava sadržaj osmolita prolina, što je osobito izraženo pri snažnijem osmotskom stresu (Kumar i sur. 2015). Naime, tijekom stresa, osmotin pomaže u akumulaciji prolina, koji neutralizira ROS i slobodne radikale (Kishor i Sreenivasulu 2014). Prolin smanjuje i mogućnost oksidacijskog oštećenja biljnog tkiva, osobito tijekom izlaganja nanočesticama metala (Wang i sur. 2011, Zhao i sur 2012, Siddiqi i Husen 2017). U mom istraživanju osmotin je pokazao smanjenu ekspresiju u korijenu nakon tretmana s AgNP, dok je nakon tretmana s $AgNO_3$ njegova ekspresija bila nepromijenjena.

Aneksini su multifunkcionalni proteini koji pripadaju porodici membranskih proteina ovisnih o ionima Ca^{2+}, a imaju ulogu u transportu i organizaciji membrana te regulaciji aktivnosti ionskih kanala i metabolizmu fosfolipida (Gerke i Moss 2002). Za neke članove ove porodice proteina iz biljke *A. thaliana* utvrđeno je da mogu imati ulogu peroksidaza i sudjelovati u obrani biljke od oksidacijskog stresa (Gorecka i sur. 2005). Smatra se da je ekspresija pet različitih aneksina u vrsti Arabidopsis povezana s regulacijom različitih tipova abiotičkog stresa (Cantero i sur. 2006), što ih svrstava u enzime ključne za davanje odgovora na stresne uvjete (Monastyrskaya i sur. 2009). U mom istraživanju identificirane su dvije izoforme ovog proteina. Ekspresije obje izoforme bile su smanjene nakon oba tipa tretmana. U radu Clark i sur. (2010) autori navode da su tijekom izlaganja biljke stresnim uvjetima neki aneksini bili pojačano eksprimirani, a drugi smanjene ekspresije u odnosu na kontrolu te stoga uloga pojedinačnog proteina ove porodice može biti različita za određeni tip stresa. U ovom sam istraživanju identificirala i proteine koji pripadaju potporodici 1 *germin-like*. Članovi superporodice *germin-like* prisutni su u različitim biljnim vrstama i igraju ulogu u biljnom razvoju i odgovoru biljke na stresne uvjete (Wang i sur. 2011). Ekspresija ovog proteina je u korijenu duhana bila smanjena nakon oba tipa tretmana u odnosu na kontrolu, što pokazuje da je biljka duhana bila izložena jakom stresu.

Nakon tretmana s AgNP protein sličan NDP kinazi 1 imao je smanjenu, a nakon tretmana s $AgNO_3$ povećanu ekspresiju u odnosu na kontrolu. Tang i sur. (2008) utvrdili su da solni stres i povišena temperatura uzrokuju pojačanu ekspresiju ovog enzima u korijenu rajčice i zaključili da enzim sudjeluje u antioksidacijskom odgovoru biljke na stresne uvjete. U mom je istraživanju ovaj protein imao povećanu ekspresiju u klijancima duhana nakon oba tipa tretmana, a istraživanja drugih autora pokazuju njegovu uključenosti u signalne putove

potaknute oksidacijskim stresom (Otero 2000) te povećanu aktivnosti uslijed djelovanja osmotskog (Rogić i sur. 2015) i solnog stresa (Aghaei i sur. 2008, Sobhanian i sur. 2010).

U ovom sam istraživanju zabilježila i promjenu u ekspresiji proteina vezanih uz obranu od gljivica i bakterija. Nakon oba tipa tretmana utvrđena je pojačana ekspresija prekursora protugljivičnog proteina CBP20 induciranog patogenima i ranjavanjem. Protein CBP20 se pojačano sintetizira kada je korijen biljke napadnut gljivicama i bakterijama. Povišena ekspresija ovog proteina je u skladu s rezultatima analize ukupnih staničnih proteina, u kojoj sam uočila povećanu ekspresiju proteina molekulske mase od oko 22 kDa, što bi moglo biti povezano s pojačanom ekspresijom CBP20. Nadalje, CBP20 ima važnu ulogu u rastu i razvoju biljaka, a smatra se da je uključen i u odgovor biljke na okolišni stres, iako njegova funkcija u tom procesu još nije sasvim razjašnjena (Kong i sur. 2014). Pojačana ekspresija proteina povezanih s patogenezom (eng. *pathogenesis related,* PR) otkrivena je i u novijim istraživanjima utjecaja teških metala na biljke (Aina i sur. 2007, Bah i sur. 2010). To je u skladu s mojim rezultatima, jer sam identificirala i protein 1B povezan s patogenezom (eng. *pathogenesis-related protein 1B*), koji se također pojačano eksprimira pri izloženosti biljke biotičkom ili abiotičkom stresu (Edreva 2005). Nguyen i sur. (2016) su također uočili povećanu aktivnost ovog proteina u vrsti *A. thaliana*, koja je bila izložena toplinskom stresu te zaključili da ovaj protein sudjeluje u mehanizmu koji kontrolira posttranslacijsku regulaciju ekspresije gena, odnosno sudjeluje u regulaciji stabilnosti mRNA. Pretragom literature nisam pronašla radove koji daju informacije o razlikovnooj ekspresiji ovog proteina nakon tretmana biljaka s AgNP i $AgNO_3$.

Kao i u klijancima, i u korijenu odraslih biljaka identificirala sam bazičnu beta-1,3-glukanazu. Radi se o hidrolazi čija se sinteza povećava kao odgovor biljke na biotički stres uzrokovan napadom patogenih organizama te uslijed porasta koncentracije etilena (Mauch i Staehelin 1989). Smatra se da bazična beta-1,3-glukanaza, kao i hitinaza, djeluje direktno na degradaciju stanične stijeke patogena te da pokazuje pojačanu aktivnost pri obrani od gljivičnih patogena (Cheong i sur. 2000). Dok je njena ekspresija u klijancima nakon oba tipa tretmana bila smanjena, u korijenu je pokazala pojačanu ekspresiju, što je u skladu s rezultatima analize proteinskih profila tehnikom SDS-PAGE, gdje je u korijenu detektirana povećana ekspresija proteinske vrpce od oko 40 kDa, što bi prema molekulskoj masi moglo odgovarati bazičnoj beta-1,3-glukanazi. Poznato je da neki abiotički stresni čimbenici koji uzrokuju oksidacijsko oštećenje također induciraju i značajno povećanje proteina povezanih s biotičkim stresom (Kieffer i sur. 2008).

U skupini proteina vezanih uz odgovor na oksidacijski stres identificirala sam SOD, protein sličan anionskoj peroksidazi 1 povezanoj sa suberinizacijom, monodehidroaskorbat reduktazu (MDHAR) te katalazu koja veže salicilnu kiselinu. U biljnoj stanici SOD je prva linija obrane od ROS i ima ključnu ulogu u staničnoj obrani od oksidacijskog stresa, budući da je njena aktivnost direktno povezana s količinom $^{\bullet}O_2^-$ i H_2O_2. Povećanu koncentraciju $^{\bullet}O_2^-$, koja nastaje kao posljedica abiotičkog stresa uzrokovanog izlaganju biljke metalima, SOD disproporcionira do H_2O_2. Kako je prethodno navedeno, njegove se izoforme mogu naći u citosolu, kloroplastima, peroksisomima i mitohondrijima te prema metalnim kofaktorima u viših biljaka razlikujemo četiri izoforme SOD (Alscher i sur. 2002). Aktivnost SOD direktno je povezana s razinom tolerancije biljke na stres (Vicuna i sur. 2011). Dosadašnje proteomske analize su pokazale da postoji korelacija između toksičnog učinka metala i povećanja ekspresije proteina koji uklanjaju ROS (Hossain i sur. 2013). Primjerice, povećana ekspresija izoformi SOD (Cu/Zn-SOD, Fe-SOD) zabilježena je u biljkama koje su bile izložene Cd (Kieffer i sur. 2008, Hossain i sur. 2012). U mom istraživanju ekspresija Fe-SOD u korijenu bila je smanjena nakon oba tipa tretmana. Isti protein identificiran je i u klijancima duhana, međutim s pojačanom ekspresijom nakon oba tipa tretmana, što je dokaz da isti biljni organizam, ovisno o stupnju razvoja i duljini izlaganja, može imati različite odgovore na isti čimbenik stresa. Nakon razdvajanja ukupnih staničnih proteina korijena biljke tretirane s $AgNO_3$ SDS-PAG elektroforezom, uočila sam smanjenu ekspresiju proteina molekulske mase od oko 28 kDa, što bi se moglo povezati sa slabijom ekspresijom enzima Fe-SOD. Slabija ekspresija proteina identificiranog kao Fe-SOD može se povezati i sa smanjenom aktivnošću SOD, koju sam zabilježila u korijenu nakon tretmana biljke sa 100 µM AgNP, i 100 µM $AgNO_3$, osobito u odnosu na tretmane s 25 i 50 µM koncentracijom. U korijenu sam identificirala i izoformu Mn-SOD, koja je za razliku od Fe-SOD, imala povećanu ekspresiju nakon oba tipa tretmana. Razlike u ekspresiji Fe-SOD i Mn-SOD mogu biti posljedica različitih odgovora pojedinih izoformi SOD, budući da rezultati istraživanja drugih autora pokazuju da različiti geni odgovorni za sintezu SOD pokazuju različit ekspresijiski profil u odgovoru biljke na različite vrste okolišnog stresa (Feng i sur. 2016). Naime, različite izoforme SOD lokalizirane su u različitim staničnim odjeljcima te se tako Mn-SOD nalazi u mitohondrijima i peroksisomima, dok je Fe-SOD prisutna u plastidima (Grene 2002, Nath i sur. 2014). Povećanje ekspresije antioksidacijskih enzima kao što su SOD i APX, povećava otpornost biljaka na različite stresne čimbenike, među kojima su i metali npr. Zn i Cd (Zeng i sur 2011). Međutim, nađeno je i smanjenje ekspresije, npr ekspresija Cu-Zn SOD bila je snižena nakon izlaganja topole kadmiju (Kiefer i sur. 2008).

Protein sličan anionskoj peroksidazi 2 povezanoj sa suberinizacijom pokazao je smanjenu ekspresiju u korijenu odraslih biljaka nakon oba tipa tretmana. Za razliku od kutina, koji predstavlja polimernu barijeru između stabljike te lista biljke i njenog okoliša, suberin obavija korijen biljke, a može se pronaći i u ostalim dijelovima biljke, ukoliko je došlo do ranjavanja tkiva (Kolattukudy 1980). Elektroforetskom analizom ukupnih staničnih proteina korijena utvrdila sam smanjenu ekspresiju proteina molekulske mase od oko 35 kDa nakon tretmana s AgNP, što bi prema molekulskoj masi mogla biti anionska peroksidaza 1 povezana sa suberinizacijom. Katalaza koja veže salicilnu kiselinu također je pokazala smanjenu ekspresiju u korijenu nakon oba tipa tretmana. Katalaza razgrađuje H_2O_2 na O_2 i H_2O, a APX reducira H_2O_2 do H_2O u ciklusu askorbat-glutation, pri čemu nastaje monodehidroaskorbat (MDHA). Enzim MDHAR prevodi nestabilni MDHA natrag u askorbat ili spontanom reakcijom razlaže na askorbat i dehidroaskorbat. U ovom radu detektirane su dvije izoforme MDHAR, od kojih je jedna pokazala povećanu ekspresiju nakon oba tretmana, a druga smanjenu. Poznato je da postoji više gena koji kodiraju ovaj enzim te više izoformi smještenih u različite stanične kompartimente, a koje različito reagiraju na stresne uvjete (Jiménez i sur 1997). Smanjena eskpresija različitih proteina povezanih s uklanjanjem ROS zajedno s uočenim smanjenjem aktivosti antioksidacijskih enzima najvjerojatnije doprinosi neravnoteži između stvaranja i uklanjanja ROS, što u konačnici dovodi do oksidacijskog stresa.

Od proteina vezanih uz metabolizam ugljikohidrata, ovim je istraživanjem identificirana izoforma enzima slična citosolnoj trioza fosfat izomerazi (TPI), koja je pokazala smanjenu ekspresiju nakon oba tipa tretmana u korijenu. Ovaj rezultat je u suprotnosti s onim u klijanaca, gdje je nađeno povišenje ekspresije TPI. Također, u suprotnosti je i s rezultatima pojačane ekspresije TPI u korijenu soje nakon stresa uzrokovanog sušom (Toorchi i sur. 2009, Mohammadi i sur. (2012a), odnosno u korijenu uljane repice (Mohammadi i sur. 2012b) te biljaka riže (Cheng i sur. 2009, Li i sur. 2010), koje su bile izložene solnom stresu. Proteomske analize utjecaja Cd na biljke pokazale su smanjenu ekspresiju TPI u odnosu na kontrolu (Kieffer i sur. 2008). Istraživanje koje su proveli Dorion i sur. (2012) pokazalo je da smanjena ekspresija citosolne TPI u korijenu krumpira ima veliki utjecaj na promjenu distribucije ugljika u primarnom metabolizmu biljaka. Naime, poznato je da TPI sudjeluje u glikolizi i esencijalna je za učinkovitu produkciju energije, što može biti dokaz da abiotički stres izazvan tretmanima s AgNP i $AgNO_3$ utječe na smanjenje proizvodnje energije u stanici. Nadalje, smanjenu ekspresiju u korijenu pokazala je i citosolna gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza (eng. *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*, GAPD) nakon oba tipa tretmana. GAPD je ključni enzim u glikolizi koji katalizira prvi korak zamjene D-gliceraldehid 3-fosfata u 3-fosfo-D-

glicerol fosfat, tj. sudjeluje u razgradnji glukoze i esencijalna je za održavanje razine ATP-a u stanici. Smanjenje ekspresije dva glikolitička enzima, TPI i GAPD, ukazuje na smanjenu proizvodnju energije glikolitičkim putem. Inače, GAPD je multifunkcionalni protein koji pokazuje funkcijsku raznovrsnost u biljkama (Rius i sur. 2008). Pojačanu ekspresiju GAPD u biljkama izloženima različitim stresnim uvjetima opisali su mnogi autori (Gao i sur. 2009, Kappachery i sur. 2017). Osim toga, Gancedo i Flores (2008) dokazali su kako ovaj enzim glikolitičkog puta ima ulogu i u drugim nemetaboličkim procesima zvanima *moonlighting functions.* Jedna od uloga pripisana tom proteinu je i sudjelovanje u odgovoru stanice na oksidacijski stres (Sirover 2011). Također je otkriveno je da GAPD reagira s H_2O_2 u vrsti *A. thaliana* (Hancock i sur. 2005), pa se pretpostavlja da navedeni enzim posreduje u signalnom putu ROS, koji djeluju kao signalne molekule za ekspresiju gena uključenih u biosintezu antioksidacijskih enzima i drugih molekula uključenih u obranu biljke (Mittler 2004).

Kao jedan od proteina povezanih s metabolizmom ugljikohidrata identificiran je i enzim malat dehidrogenaza (*eng. malate dehydrogenase,* MDH). Radi se o oksidoreduktazi Krebsovog ciklusa, koja reverzibilno katalizira oksidaciju malata u oksaloacetat redukcijom NAD^+ u NADH. Također ovaj enzim važan je za održavanje homeostaze redoks stanja između različitih kompartimenata te je u stresnim uvjetima primijećena promjena u aktivnosti i ekspresiji različitih izoformi MDH proteina (Wang i sur. 2016). Ovaj je enzim identificiran u klijancima s pojačanom, a u korijenu odraslih biljaka sa smanjenom ekspresijom nakon oba tipa tretmana. Smanjena količina MDH izmjerena je u korijenu krastavca nakon solnog stresa (Yuan i sur. 2016), što je u skladu s mojim rezultatima smanjenja ekspresije MDH u korijenu duhana.

U korijenu duhana detektirana je i skupina proteina povezanih s metabolizmom aminokiselina, među kojima se ističe protein glutamat dehidrogenaza (eng. *glutamate dehydrogenase*, GDH). GDH ima važnu ulogu u metabolizmu dušika (N), tj. u njegovoj ugradnji u aminokiseline, gdje metabolizira suvišak amonijevih iona stvaranjem glutamata (Mokhele i sur. 2012). Nastali glutamat može ići dalje u sintezu prolina koji sudjeluje u regulaciji osmolarnosti u stresnim uvjetima (Skopelitis i sur. 2006). GDH također ima važnu ulogu u detekciji povećane koncentracija ROS u stanici te sukladno tome modulira odgovor na stres (Skopelitis i sur. 2006). Povećana aktivnost GDH u biljkama graha, koje su bile tretirane s Cd, upućuje na važnost ovog enzima u adaptaciji metabolizma na stresne uvjete (Gouia i sur. 2003). Moji rezultati odstupaju od tih podataka, jer je ekspresija GDH u oba tipa tretmana bila smanjena, što zajedno sa smanjenom ekspresijom enzima uključenih u metabolizam ugljika može ukazivati da je izlaganje srebru imalo negativan učinak na metabolizam odraslih biljaka duhana.

5.2.3.2. Promjene u proteomskoj slici lista duhana

U tkivu lista uspješno je identificirano 38 proteina, od kojih je većina imala smanjenu ekspresiju nakon tretmana sa 100 μM AgNP i $AgNO_3$ u odnosu na kontrolu. Naime, nakon tretmana s AgNP smanjenu ekspresiju pokazalo je 30 proteina, a nakon tretmana s $AgNO_3$ 14 proteina u odnosu na kontrolu. Najveći broj proteina sa smanjenom ekspresijom nakon oba tipa tretmana pripadao je kategorijama Metabolizam ugljikohidrata i Fotosinteza.

Proces fotosinteze nalazi se pod kontrolom kompleksne mreže proteina (PSI, PSII, ATP-sintaza i citokrom b6), koji su u velikoj mjeri podložni učincima abiotičkog stresa (Hippler i sur. 2001). Kao i u klijancima, fotosinteza se i u listovima pokazala kao jedan od važnih bioloških procesa na kojeg su tretmani s AgNP i $AgNO_3$ imali značajan utjecaj. Među identificiranim proteinima bilo je i osam proteina koji su dio kompleksa PSI i PSII, od kojih je sedam pokazalo smanjenu ekspresiju u odgovoru na tretman s AgNP, a dva u odgovoru na tretman s $AgNO_3$. Svi proteini kompleksa PSI i PSII identificirani nakon tretmana s AgNP u listu odraslih biljaka sa smanjenom ekspresijom, u klijancima su detektirani sa povećanom ekspresijom, što ukazuje na različite učinke AgNP ovisno o razvojnom stadiju i/ili duljini izlaganja AgNP stresu, a njihova važnost i uloga u odgovoru na stres opisana je u dijelu rasprave vezane uz ekspresiju proteina u klijancima (5.1.3.). Smanjenje ekspresije proteina kompleksa PSI i PSII nakon tretmana s AgNP ukazuje na inhibiciju fotosintetskog transportnog lanca elektrona.

Protein koji nije bio identificiran u klijancima, a pokazao je povećanu ekspresiju u listu nakon oba tipa tretmana je kloroplastni klorofil a-b vezujući protein 8, koji pripada porodici klorofil a-b vezujućih proteina (eng. *light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins*, LHCB). Ovaj protein prisutan je kao komponenta kompleksa PSI i PSII. Proteini LHCB pokazali su povećanu ekspresiju nakon stresa uzrokovanog povećanjem količine vode u biljci *Theobroma cacao* (Bertolde i sur. 2014). Nadalje, Xu i sur. (2012) su dokazali da proteini porodice LHCB igraju važnu ulogu u signalnom putu apscizinske kiseline (eng. *abscisic acid*, ABA) moduliranjem homeostaze molekula ROS. Naime, ABA je hormon koji je povezan s odgovorom biljke na abiotički stres i koji ima direktni učinak na funkcioniranje kompleksa PSII (Maslenkova i sur. 1989), a potrebna je za sintezu proteina LHCB (Xu i sur. 2012). Povećana količina proteina LHCB pronađena je i nakon izlaganja biljaka kombiniranom stresu hladnoća/svjetlo te hladnoća/mrak (Soitamo i sur. 2008), što ukazuje na njegovu ulogu u odgovoru biljke na stresne uvjete okoliša. Uz kloroplastni klorofil a-b vezujući protein 8, nakon tretmana biljaka s AgNP u listu je identificiran i prekursor PSI-D1, i to sa smanjenom

ekspresijom. Istraživanja fitotoksičnosti nanočestica pokazala su da TiO_2NP induciraju ekspresiju gena kompleksa PSI (Tiwari i sur. 2017), dok AgNP (Navarro i sur. 2015) i ZnO_2NP (Wang i sur. 2016) inhibiraju gene sustava PSI. Naime, Navarro i sur. (2015) su u svom istraživanju uočili da citratni omotač, kojim su bile stabilizirane AgNP, ima svojstvo zadržavanja iona Ag^+ na površini nanočestica, što može izazvati inhibiciju fotosinteze. Smanjena je bila i ekspresija kloroplastnog prekursora feredoksin-$NADP^+$ reduktaze, što se može povezati sa smanjenom ekspresijom proteina PSI i PSII, koji su odgovorni za proizvodnju visokoenergetskih elektrona i koji su feredoksin-$NADP^+$ reduktazi potrebni za sintezu NADPH. Promjena u ekspresiji zabilježena je i za podjedinicu ATP sintaze, enzima važnog za proizvodnju energije u obliku adenozin trifosfata (ATP). Hu i sur. (2015) pokazali su da stres uzrokovan sušom i povećanim salinitetom u riži izaziva smanjenje aktivnosti ATP sintaze, što je dokaz da abiotički stres može smanjiti proizvodnju energije u stanici. ATP sintaza je sastavljena od dvije regije, FO i F1. Podjedinice alfa i beta čine srž katalitičke regije F1. Rotacija centralnog dijela, epsilon podjedinice, u odnosu na alfa i beta podjedinice koje je okružuju, dovodi do sinteze ATP-a na tri razdvojena katalitička mjesta na beta podjedinici. U listu biljke identificirana je podjedinica CF1 epsilon kloroplastne ATP sintaze, protein koji je dio rotacijskog mehanizma i važan za transport protona, a njegova ekspresija bila je smanjena nakon tretmana s AgNP. S obzirom na to da su svi identificirani proteini kompleksa PSI i PSII te kloroplastni prekursor feredoksin-$NADP^+$ reduktaze u listu nakon tretmana s AgNP bili smanjene ekspresije, ne iznenađuje i smanjenje ekspresije podjedinice ATP sintaze, što se može povezati s negativnim učinkom AgNP na proces fotosinteze u listovima odraslih biljaka. S druge strane, tretman biljaka duhana s $AgNO_3$ rezultirao je povećanom ekspresijom CF1 epsilon kloroplastne ATP sintaze u listu biljke. Vannini i sur. (2013) zabilježili su da je izlaganje klijanaca vrste *E. sativa* tretmanu s $AgNO_3$ uzrokovalo specifično povećanje ekspresije nekoliko proteina, koji su uključeni u proizvodnju energije, uključujući i podjedinice ATP sintaze plastida i mitohondrija.

U kategoriji biološkog procesa Fotosinteze dva su proteina identificirana kao enzim Rubisco; produkt gena rbcL molekulske mase od oko 52 kDa, koji je pokazao smanjenu ekspresiju nakon oba tipa tretmana te parcijalna velika podjedinica proteina Rubisco od 43 kDa, čija je ekspresija bila povećana nakon oba tipa tretmana. S obzirom na to da je molekulska masa parcijalne velike podjedinice enzima Rubisco manja u odnosu na molekulsku masu kompletnog produkta gena *rbcL*, može se zaključiti da je detektirana pojačana ekspresija parcijalne podjedinice vjerojatno rezultat degradacije proteina Rubisco. Degradacija ovog enzima zabilježena je i u klijancima duhana nakon oba tipa tretmana, a uloga proteina opisana je u

poglavlju 5.1.3. Nadalje, u ovoj skupini proteina detektiran je i protein Ribuloza bifosfat karboksilaza/oksigenaza aktivaza 2, čija je ekspresija nakon AgNP bila podjednaka kontroli, a nakon tretmana s $AgNO_3$ povećana. Isti je protein bio detektiran i u klijancima, gdje je pokazao povećanu ekspresiju nakon oba tipa tretmana, što bi moglo ukazivati na snažniji učinak tretmana s AgNP u ranijem razvojnom stadiju iste biljne vrste.

U skupini proteina uključenih u Fotosintezu identificirana je i kloroplastna ribuloza-fosfat-3-epimeraza (eng. *ribulose-phosphate 3-epimerase*, RuPE), enzim Calvinovog ciklusa, koji je u listu odrasle biljke imao smanjenu ekspresiju u odnosu na kontrolu nakon oba tipa tretmana. Smanjenje ekspresije ovog proteina zabilježeno je i nakon izlaganja biljke *T. aestivum* stresu sušom (Xue i sur. 2008) te biljke *A. thaliana* pojačanom intenzitetu svjetlosti (Uberegui i sur. 2015), što pokazuje da je ovaj protein osjetljiv na različite čimbenike abiotičkog stresa. S druge strane, povećana ekspresija enzima RuPE zabilježena je nakon izlaganja modrozelene alge *Synechocystis sp*. povišenom salinitetu (Erdmann i Hagemann 2001), što sugerira da je njegova ekspresija ovisna o vrsti stresnog čimbenika. Generalno, može se zaključiti da je tretman srebrom uzrokovao smanjenju ekspresiju proteina povezanih s Calvinovim ciklusom, što je dovelo do smanjene fiksacije CO_2 te posljedično do manje potrošnje ATP i NADPH. Kao bi se spriječilo fotooksidativno oštećenje uslijed inhibicije transportnog lanca elektrona, došlo je i do smanjenje ekspresije proteina uključenih u primarne reakcije fotosinteze. Budući da je kod odraslih biljaka učinak AgNP bio značajniji, jer je rezultirao smanjenom ekspresijom većeg broja proteina povezanih s primarnim reakcijama fotosinteze u odnosu na $AgNO_3$, može se pretpostaviti da je to posljedica direktnog učinka nanosrebra na fotosintezu, a ne disocijacije Ag^+.

Plastidna aldolaza, koja je u bazi *UniProt* imenovana kao fruktoza 1,6-bisfosfat aldolaza (eng. *fructose bisphosphate aldolase*, FBPA) glikolitički je enzim koji katalizira reverzibilnu reakciju razgradnje fruktoza 1,6-bisfosfata u dihidroksiaceton fosfat. U listu odraslih biljaka enzim je pokazao smanjenu ekspresiju nakon oba tipa tretmana. U literaturi se uglavnom navodi pojačana ekspresija proteina FBPA nakon izlaganja biljaka različitim vrstama abiotičkog stresa, kao što su pojačano izlaganje svetlosti (Maayan i sur. 2008) i solni stres (Zeng i sur. 2009, Manaa i sur. 2011). U istraživanju tretmana s česticama AgNP na vrstu *A. thaliana* uočena je povećana ekspresija ovog enzima (Syu i sur. 2014), što nije u skladu s rezultatima mog istraživanja, a moglo bi se pripisati razlikama u obliku (osim sferičnih i AgNP u obliku trokuta i dekaedra) te veličini (sferične promjera 8 ± 2 nm) primjenjenih čestica AgNP. U listovima odraslih biljaka identificiran je i protein TPI, čija je ekspresija bila je smanjena nakon oba tipa tretmana. To je u skladu s rezultatima Kieffer i sur. (2008), koji su zabilježili smanjenje

ekspresije ovog enzima u listovima vrste *Populus tremula* nakon izlaganja biljke povećanim koncentracijama Cd. Detekcija pojačane ekspresije ovog proteina u klijancima te smanjene ekspresije u listovima i korijenu odraslih biljaka nakon oba tipa tretmana, još je jedan dokaz da tkiva iste biljne vrste, koja se razlikuju po starosti i stupnju razvitka, mogu dati drugačiji odgovor na isti čimbenik stresa (Upadhyaya i sur. 2014). Ekspresija nekih proteina povezanih s metabolizmom ugljikohidrata, kao što su gliceraldehid-3 fosfat dehidrogenaza i malat dehidrogenaza te metabolizmom aminokiselina bila je smanjenja nakon tretmana a AgNP a povećana ili bez promjene nakon tretmana a $AgNO_3$, što ukazuje da je nanosrebro imalo suprimirajući učinak na metabolizam u listu duhana.

Osmotin, koji pripada porodici proteina povezanih s patogenezom (PR)-5, sudjeluje u mehanizmima koji su odgovorni za podizanje razine tolerancije biljaka na biotički i abiotički stres, a različito se eksprimira u različitim razvojnim stadijima biljke u ovisnosti o vrsti stresnog čimbenika (Kumar i sur. 2014). U listovima duhana sam zabilježila povišenu ekspresiju osmotina nakon tretmana s AgNP, dok je nakon tretmana s $AgNO_3$ ekspresija bila smanjena. Povećana ekspresija osmotina dokazana je i u listu biljaka duhana izloženih tretmanu s Cd (Harada i sur. 2010), što dokazuje da uslijed izlaganja metalima biljke aktiviraju obrambene mehanizme. Naime, nakupljanje ROS u stanicama jedna je od glavnih posljedica toksičnog djelovanja teških metala na biljne stanice (Sharma i Dietz 2009). Tijekom oksidacijskog stresa razina osmotina se povećava i potiče akumulaciju prolina, koji zatim neutralizira ROS i slobodne radikale (Kishor i Sreenivasulu 2014). Povećanje ekspresije osmotina može se povezati s relativno niskom razinom oksidacijskog stresa, koja je u ovom istraživanju izmjerena nakon tretmana lista s AgNP (razina sadržaja ROS, proteinski karbonili i % DNA u repu). Detaljan opis uloge ovog proteina u odgovoru na oksidacijski stres nalazi se u poglavlju 5.2.4.1.

Među proteinima lista detektirana je i bazična beta-1,3-glukanaza, koja je nakon tretmana s AgNP imala ekspresiju podjednaku kontroli, a nakon tretmana s $AgNO_3$ pokazala je povećanu ekspresiju. Nakon analize ukupnih staničnih proteina lista, zapazila sam pojačanu ekspresiju vrpce molekulske mase od oko 40 kDa, koja bi mogla pripadati bazičnoj beta-1,3-glukanazi. Ovaj je enzim bio detektiran i u proteinima klijanaca sa smanjenom ekspresijom nakon oba tipa tretmana te u proteinima korijena s povećanom ekspresijom nakon oba tipa tretmana.

U listu biljke duhana identificiran je protein sličan glutation S-transferazi (eng. *gluthatione-S-transferase,* GST), koja ima važnu ulogu u detoksifikaciji biljne stanice od štetnih učinaka akumuliranih metala (Duressa i sur. 2011). U mom istraživanju ovaj protein je pokazao smanjenu ekspresiju nakon tretmana s AgNP, što nije u skladu s rezultatima Vannini i

sur. (2014), koji su zabilježili nakupljanje glutation S-transferaze u korijenu pšenice tretirane s AgNP. Ova razlika u rezultatima može se objasniti činjenicom da su Vaninni i sur. (2014) analizirali korijen, a ne list biljke, i to nakon izlaganja česticama AgNP koje su bile stabilizirane omotačem od polivinilpirolidona (PVP). Različite učinke čestica AgNP stabiliziranih s različitim omotačima već su zabilježili i Cvjetko i sur. (2017) na korijenu luka. Također nađena je smanjena ekspresija proteina Fe-SOD nakon tretmana s AgNP, a povišena nakon tretmana s $AgNO_3$ što se ne slaže s rezultatima mjerenja aktivnosti SOD, koja je bila slična kontrolnim vrijednostima, ali kao što sam već navela, razina ekspresije ne mora nužno biti povezana s razinom aktivnosti tog enzima. I ovaj rezultat ukazuje na suprimirajući učinak AgNP tretmana na metabolizam odrasle biljke te djelomično različit mehanizam djelovanja u odnosu na ionsko srebro.

5.3. Određivanje utjecaja citratnog omotača na duhan

Učinak AgNP može ovisiti o sastavu hranjivih podloga i vodene otopine te o sastavu tla, kao i o površinskom omotaču kojim su nanočestice obavijene radi stabilizacije (Coutris i sur. 2012). Kako bih sa sigurnošću utvrdila jesu li toksični učinci čestica AgNP na klijance i odrasle biljke duhana rezultat djelovanja AgNP samih (a ne i citratnog omotača kojime su obavijene), na navedena sam biljna tkiva utvrdila učinak samog citratnog omotača.

Budući da dosadašnja istraživanja ukazuju da su stanice korijena glavno mjesto unosa AgNP (Tripathi i sur. 2017a) te da prolaze kroz staničnu stijenku (Navarro i sur. 2008) i plazmatsku membranu epidermalnog sloja korijena i dalje odlaze u vaskularno tkivo (Tripathi i sur. 2017a), za ovaj su dio istraživanja bili odabrani klijanci i korijen odraslih biljaka duhana. Pretragom literature ustanovila sam da ne postoje istraživanja o utjecaju omotača citrata na nastanak oksidacijskog stresa, niti na aktivnost antioksidacijskih enzima, na bilo koji organizam.

U ovom sam istraživanju nakon izlaganja tkiva klijanaca i korijena odraslih biljaka duhana koncentracijama od 10 i 100 μM citrata analizirala utjecaj samog citratnog omotača na koncentraciju ukupnih topivih proteina, s ciljem utvrđivanja eventualnog utjecaja citrata na stabilnost i ekspresiju proteina. Također sam radi utvrđivanja utjecaja citrata na pojavu oksidacijskog stresa u duhanu izmjerila i sadržaj MDA, proteinskih karbonila i % DNA u repu te aktivnost antioksidacijskih enzima PPX, APX i CAT.

Dobiveni rezultati pokazali su da citrat ne uzrokuje statistički značajnu razliku u vrijednostima navedenih parametara u odnosu na kontrolu, tj. da nema učinka na stabilnost

ukupnih staničnih proteina u klijancima i korijenu duhana, kao niti učinka na oksidacijski stres i aktivnost antioksidacijskih enzima u navedenim tkivima. Stoga sam zaključila da analizu aktivnosti SOD, kao prve linije obrane stanice od oksidacijskog stresa nije potrebno provoditi. Kako bih potvrdila postoji li učinak citrata na list duhana, u listu je, uz analizu učinaka u korijenu, dodatno načinjena analiza oštećenja molekule DNA, a rezultati su pokazali da citrat ne uzrokuje statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolu. Kako citrat nije uzrokovao promjene u izmjerenim parametrima, može se zaključiti da su učinci koje sam zabilježila zaista rezultat djelovanja AgNP.

5.4. Usporedba rezultata dobivenih na klijancima i odraslim biljkama

Usporedbom rezultata parametara oksidacijskog stresa između klijanaca i odraslih biljaka nakon tretmana s AgNP vidljivo je da je oksidacijski stres bio jače izražen u klijancima (povišeni sadržaj ROS i % DNA) u odnosu na korijen i list odraslih biljaka, gdje niti jedan ispitani parametar nije pokazao značajno povećane vrijednosti u odnosu na kontrolu, iako je koncentracija Ag u odraslim biljkama višestruko premašivala vrijednosti zabilježene u klijancima. Aktivnosti antioksidacijskih enzima također su pokazale veće promjene u klijancima (SOD, PPX i APX pri svim ispitanim koncentracijama) u usporedbi s korijenom i listom odraslih biljaka. Ove razlike mogle bi se pripisati razlikama u razvojnom stupnju i starosti tkiva zbog kojih mlade biljčice, koje nemaju do kraja razvijene sve organe (vrlo nježan korijenov sustav i mali listići) i samim time niti sve obrambene mehanizme, snažnije reagiraju na izloženost stresu u odnosu na odrasle biljke, koje imaju potpuno diferencirani korjenov sustav i velike listove. Naime, Kotchoni i sur. (2006) su nakon istraživanja utjecaja solnog stresa na klijancima i odraslim biljkama divljeg tipa vrste *A. thaliana* na temelju rezultata sadržaja MDA zaključili kako su klijanci podložniji abiotičkom stresu u odnosu na odrasle biljke. Nadalje, Tkalec i sur. (2014) su nakon izlaganja klijanaca i odraslih biljaka duhana teškim metalima Cd i Zn zaključili da je njihov utjecaj ovisan o vrsti biljnog tkiva i starosti tkiva, jer se u klijancima i odraslim biljkama aktiviraju različiti mehanizmi koji kontroliraju otpornost biljke na stres izazvan metalima. Slične zaključke iznijeli su i Majsec i sur. (2016) nakon izlaganja klijanaca i odraslih biljka duhana tretmanih s Cd i Cu.

Razlike u odgovoru klijanaca i odraslih biljaka na tretmane s AgNP bile su jako izražene i na razini proteoma, i to u broju proteina koji su pokazali razlikovnu ekspresiju (43 u klijancima, a 33 u korijenu i 37 u listu odrasle biljke), ali isto tako i u načinu ekspresije, budući da je većina identificiranih proteina klijanaca pokazala pojačanu ekspresiju, dok su proteini

korijena i lista bili uglavnom smanjene ekspresije. Budući da je u klijancima duhana nakon tretmana s AgNP utvrđen veći broj proteina povećane ekspresije u odnosu na odrasle biljke, kao i s obzirom na činjenicu da je pri 100 µM AgNP sadržaj ROS u klijancima bio statistički značajan u odnosu na kontrolu (dok u korijenu i listu to nije bilo utvrđeno), može se zaključiti da su rezultati analize proteoma u skladu s rezultatima mjerenja oksidacijskog stresa, što je dodatna potvrda da su klijanci tretirani s AgNP bili jače izloženi stresu u odnosu na odrasle biljke. Usporedbom proteina identificiranih u klijancima nakon tretmana s AgNP s proteinima odraslih biljaka duhana koji su bili izloženi istom tretmanu, uočila sam samo pet zajedničkih proteina u korijenu, te devet u listu. Ove razlike u ekspresiji proteina klijanaca te proteina korijena i lista odraslih biljaka još su jedan dokaz da tkiva različite starosti i stupnja razvitka daju drugačiji odgovor na isti čimbenik stresa (Upadhyaya i sur. 2014). Osim toga, ovakvo relativno malo preklapanje identificiranih proteina između klijanaca i odraslih biljaka, dodatna je potvrda da tkiva različite starosti i stupnja razvitka reagiraju drugačije na istu jačinu i vrstu stresa, vjerojatno zbog aktivacije različitih mehanizama koji kontroliraju odgovor biljke na stres (Tkalec i sur. 2014, Majsec i sur. 2016). Međutim moguće je i da su utvrđene razlike posljedice načina i duljine trajanja tretmana. Naime klijaci su od početka klijali i rasli 30 dana na podlozi s AgNP, dok su odrasle biljke klijale i rasle bez AgNP, da bi zatim naglo bile izložene relativno kratkotrajno tretmanu s AgNP. Stoga bi se na osnovi manjih promjena u protemu i antioksidacijskom sustavu primijećenih u odraslim biljakama moglo pretpostaviti da su odrasle biljke na izlaganje nanosrebru reagirale mehanizmom „izbjegavanja stresa“ u kojem biljka uđe u fazu mirovanja, dok su klijancu reagirali mehanizmom „tolerancije na stres“ u kojem se održava visoka metabolička aktivnost kako bi se biljka aklimatizirala na dulje trajanje nepovoljnih uvjeta (Clemens 2006). Nedostatak odgovora u odraslih biljaka može se povezati i s izostankom oksidacijskog stresa, budući da ROS kao signalne molekule imaju učinak na aktivaciju gena, čiji produkti mogu uspostaviti novi stabilni metabolizam u biljnom organizmu (Inźe i Van Montagu 2002).

Nakon tretmana s $AgNO_3$, razlike u odgovoru između klijanaca i odraslih biljaka bile su manje izražene, osobito ako se usporede rezultati parametara oksidacijskog stresa koji su dobiveni u klijancima i korijenu odraslih biljaka, gdje su gotovo sve ispitane koncentracije $AgNO_3$ rezultirale značajno povećanim vrijednostima u odnosu na kontrolu. Ovi rezultati pokazuju da na odgovor biljke na stresne uvjete, osim starosti i razvojnog stupnja tkiva, utječe i tip i jačina primjenjenog stresa te još jednom potvrđuju kako je za duhan srebro u ionskom obliku toksičnije od nanosrebra. Što se tiče aktivnosti antioksidacijskih enzima nakon tretmana s $AgNO_3$, za klijance i korijen odraslih biljaka zajedničke su bile promjene u većini enzima

(PPX, APX i CAT) na većini ispitanih koncentracija, iako je zanimljivo istaknuti da su promjene imale suprotan predznak za sva tri navedena enzima. Naime, u usporedbi s kontrolom aktivnosti PPX i CAT bile su snižene u klijancima, a povišene u korijenu, dok je APX pokazao povećanje aktivnosti u klijacima, a smanjenje u korijenu. Ovakav, pomalo neočekivani, rezultat mogao bi se objasniti prethodnim navodom da tkiva različite starosti i stupnja razvitka aktiviraju različite mehanizme u odgovoru biljke na stres (Tkalec i sur. 2014, Majsec i sur. 2016), a dodatna potvrda tome su i razlike dobivene analizom proteoma. Naime, značajno veći broj proteina (65) promijenjene ekspresije identificiran je u klijancima nakon izlaganja 100 µM $AgNO_3$ u odnosu na korijen (29 proteina) i list (26 proteina) odrasle biljke, što ponovo ukazuje na različite mehanizme kojima klijanci i odrasle biljke reagiraju na stresne uvjete. Potvrda tome su i razlike uočene u načinu ekspresije. Naime, nakon tretmana klijanaca s $AgNO_3$, ali i nakon tretmana s AgNP većina je proteina bila pojačane ekspresije, dok je nakon oba tipa tretmana u odraslim biljkama većina proteina imala smanjenu ekspresiju. Nadalje, usporedbom proteina identificiranih u klijancima te u korijenu i listu duhana tretiranih s $AgNO_3$ uočeno je da klijanci s korijenom imaju samo pet zajedničkih proteina, a s listom 11. To ponovno ukazuje na relativno malo preklapanje identificiranih proteina u dijelovima iste biljne vrste različitog razvojnog stadija, vjerojatno zbog aktivacije različitih mehanizama obrane u njima (Tkalec i sur. 2014, Majsec i sur. 2016).

Budući da je ovim radom potvrđen utjecaj AgNP na proteom duhana, svakako je potrebno provesti daljnja istraživanja. Rezultati dobiveni u ovom radu nisu dovoljni da se do kraja razjasne mehanizmi koje biljka uključuje u odgovoru na izazvani stres te bi stoga daljnja istraživanja trebala obuhvatiti analize lokalizacije, modifikacije, interakcije, aktivnosti i funkcije određenih proteina.

Jedan od ciljeva ovog doktorata bio je definirati osjetljive i selektivne biomarkere toksičnosti AgNP-a koji bi se mogli koristiti u biomonitoringu okoliša. Iako su i u klijancima i u odraslim biljaka najveće promjene zabilježene u ekspresiji proteina uključenih u fotosintezu i metabolizam ugljikohidrata, na temelju dobivenih rezultata vrlo je teško definirati neke općenite biomarkere. Naime, istraživanja su pokazala da pri odgovoru duhana na stres izazvan nanočesticama srebra dolazi do aktivacije različitih mehanizama obrane, koji su ovisni o starosti i vrsti tkiva, stupnju razvitka te duljini izlaganja srebru. Stoga navedene parametre svakako treba uzeti u obzir pri korištenju proteina kao mogućih biomarkera u biomonitoringu okoliša.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih istraživanja mogu se izvesti slijedeći zaključci:

1. Niže vrijednosti sadržaja srebra izmjerene su nakon tretmana s AgNP i $AgNO_3$ u klijancima u odnosu na korijen odraslih biljaka, dok su najniže vrijednosti sadržaja srebra bile u listovima odraslih biljaka. To ukazuje da je za akumulaciju srebra u duhanu potreban razvijen i potpuno diferenciran korijenov sustav.

2. U klijancima je nakon tretmana s AgNP utvrđena pojava oksidacijskog stresa kao i promjene u aktivnosti i ekspresiji antioksidacijskih enzima, iako uglavnom pri višim koncentracijama, dok u odraslim biljkama uglavnom nije bilo izraženijih promjena. To ukazuje da AgNP imaju jači učinak na klijance te potvrđuje da odgovor na izlaganje AgNP ovisi o razvojnom stupnju i starosti biljke.

3. Za razliku od AgNP, tretman s $AgNO_3$ izazvao je pojavu oksidacijskog stresa i u klijancima i u korijenu odraslih biljaka pri gotovo svim ispitanim koncentracijama, iz čega se može zaključiti je srebro u ionskom obliku toksičnije za duhan od srebra u obliku nanočestica.

4. Općenito slabiji toksični učinak tretmana s AgNP u usporedbi s $AgNO_3$ zabilježen je i u klijanacima i u odraslim biljkama, uz podjednaki sadržaj srebra u klijancima i korijenu odraslih biljaka nakon oba tipa tretmana. To pokazuje da djelovanje AgNP nije rezultat otpuštanja Ag^+, već djelovanja samih nanočestica i upućuje na zaključak da se AgNP u stanice duhana unose direktno te da su nakon unosa stabilne.

5. U listovima biljaka tretiranih s AgNP i $AgNO_3$ uglavnom nisu zabilježeni izraženiji toksični učinci, što zajedno s niskom akumulacijom srebra ukazuje da je sprečavanje prijenosa srebra u izdanak obrambeni mehanizam kojim se štiti fotosintetsko tkivo lista.

6. Budući da sam citratni omotač nije imao toksični učinak na klijance, može se zaključiti da je toksičnost koju su pokazale AgNP stabilizirane s citratnim omotačem posljedica djelovanja samih nanočestica.

7. Proteom klijanaca pokazao je veće promjene u odgovoru na tretmane s AgNP i $AgNO_3$ u usporedbi s odraslim biljkama. Većina proteina klijanaca imala je pojačanu ekspresiju, dok je ekspresija proteina korijena i lista bila uglavnom smanjena i s malim preklapanjem identificiranih proteina između klijanaca i odraslih biljaka, što se može povezati s aktivacijom različitih mehanizama obrane u odgovoru duhana na stres ovisno o starosti i vrsti tkiva, stupnju razvitka te duljini izlaganja srebru.

8. Tretmani s AgNP i $AgNO_3$ izazvali su slične promjene u ekspresiji proteina klijanaca, što ukazuje da odgovor biljke na srebro nije povezan s njegovim oblikom, iako se ne može isključiti da je to posljedica djelovanja ionskog srebra. Proteini s povećanom ekspresijom uglavnom su pripadali procesima fotosinteze i metabolizma ugljikohidrata (kategorije Energija i Metabolizam), što pokazuje kako u klijancima proteom listića dominira nad proteomom korjenčića.

9. U proteomu korijena odraslih biljaka oba tipa tretmana izazvala su promjene u ekspresiji proteina, koji su u najvećem broju pripadali kategorijama Odgovor na stres, Oksidacija i detoksifikacija i Energija. Ekspresija većine proteina bila je snižena nakon oba tretmana, što pokazuje da su tretmani s AgNP ipak izazvali stres u korijenu, iako nije došlo do značajnijih toksičnih učinka kao nakon tretmana s $AgNO_3$.

10. Tretmani s AgNP i $AgNO_3$ izazvali su promjene u ekspresiji proteina lista odraslih biljaka, koji su većinom bili uključeni u fotosintezu i metabolizam ugljikohidrata (kategorije Energija i Metabolizam). Uočene su razlike u ekspresiji pojedinih proteina između tretmana s AgNP i $AgNO_3$, a tretman s AgNP je uglavnom smanjivao ekspresiju većine proteina. To pokazuje da unatoč niskom sadržaju srebra i izostanku oksidacijskog stresa, izloženost biljke nanočesticama srebra ipak može izazvati stresne učinke u listu.

7. POPIS LITERATURE

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

Aghaei K, Ehsanpour AA, Komatsu S (2008) Proteome analysis of potato under salt stress. Journal of Proteome Research 7: 4858-4868.

Ahmad P, Jaleel CA, Salem MA, Nabi G, Sharma S (2010) Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. Critical Reviews in Biotechnology 30(3): 161-175.

Ahamed M Posgai R, Gorey TJ, Nielsen M, Hussain SM, Rowe JJ (2010) Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. Toxicology and Applied Pharmacology 242: 263-269.

Ahsan N, Donnart T, Nouri MZ, Komatsu S (2010) Tissue-specific defense and thermo-adaptive mechanisms of soybean seedlings under heat stress revealed by proteomic approach. Journal of Proteome Ressearch 9: 4189-4204.

Aina R, Labra M, Fumagalli P, Vannini C, Marsoni M, Cucchi U, Bracale M, Sgorbati S, Citterio S (2007) Thiol-peptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. Environmental and Experimental Botany 59(3): 381-392.

Alexander L, Grierson D (2002) Ethylene biosinthesis and action in tomato: a model for climatcteric fruit ripening. Journal of Experimental Botany 53: 2039-2055.

Allahverdiyeva Y, Suorsa M, Tikkanen M, Aro EM (2015) Photoprotection of photosystems in fluctuating light intensities. Journal of Experimental Botany 66(9): 2427-2436.

Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL (1997) Reactive oxygen species in antioxidants: Relationships in green cells. Physiologia Plantarum 100: 224-233.

Alscher NE, Heath LS (2002) Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. Journal of Experimental Botany 53(372): 1331-1341.

Anderson MD, Prasad TK, Stewart CR (1995) Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. Plant Physiology 109: 1247-1257.

Anderson, NL, Anderson NG (1998) Proteome and proteomics: New technologies, new concepts, and new words. Electrophoresis 19(11): 1853-1861.

Anjum NA, Gill SS, Duarte AC, Pereira E, Ahmad I (2013) Silver nanoparticles in soil - plant systems. Journal of Nanoparticle Research 15: 1896.

Apel K, Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55: 373-399.

Aravind P, Prasad MNV (2005) Zinc mediated protection to the conformation of carbonic anhydrase in cadmium exposed *Ceratophyllum demersum* L. Plant Science 169: 245-254.

Arora A, Sairam RK, Srivastava GC (2002) Oxidative stress and antioxidative system in plants. Current Science India 82: 1227-1238.

Arora S, Jain, J, Rajwade JM, Paknikar KM (2009) Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. Toxicology and Applied Pharmacology 236: 310-318.

Bah AM, Sun H, Chen F, Zhou J, Dai H, Zhang G, Wu F (2010) Comparative proteomic analysis of *Typha angustifolia* leaf under chromium, cadmium and lead stress. Journal of Hazardous Materials 184(1-3): 191-203.

Balasubramanyam M, Adaikalakoteswari A, Sameermahmood Z, Mohan V (2010) Biomarkers of oxidative stress: methods and measures of oxidative DNA damage (COMET assay) and telomere shortening. Methods in Molecular Biology 610: 245-261.

Balen B, Pavoković D, Peharec Štefanić P, Krsnik-Rasol M (2011) Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. Sveučilišni priručnik, Zagreb: Hrvatska sveučilišna naknada.

Balen B, Tkalec M, Peharec Štefanić P, Vidaković-Cifrek Ž, Krsnik-Rasol M (2012) In vitro conditions affect photosynthetic performance and crassulacean acid metabolism in *Mammillaria gracilis* Pfeiff. tissues. Acta Physiologiae Plantarum 34: 1883-1893.

Balen B, Tkalec M, Rogić T, Šimac M, Peharec Štefanić P, Rončević S, Pitarević Svedružić, L, Krsnik-Rasol M (2013) Effects of iso-osmotic NaCl and mannitol on growth, proline content, and antioxidant defense in *Mammillaria gracilis* Pfeiff. in vitro-grown cultures. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant 49(4): 421-432.

Balen B (2016) Promjene u ekspresiji biljnih proteina izazvane nanočesticama srebra. Educatio biologiae 2: 115-130.

Banić E (2017) Promjene u ultrastrukturi, proteomu i fotosintetskoj učinkovitosti klijanaca duhana (*Nicotiana tabacum* L.) pod utjecajem nanočestica i iona srebra. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Barbasz A, Kreczmer B, Oćwieja M (2016) Effects of exposure of callus cells of two wheat varieties to silver nanoparticles and silver salt ($AgNO_3$). Acta Physiologiae Plantarum 38: 76.

Barber J, Nield J, Morris EP, Zheleva D, Hankamer B (1997) The structure, function and dynamics of photosystem two. Physiologia Plantarum 100: 817-827.

Baskar V, Venkatesh J, Park SW (2015) Impact of biologically synthesized silver nanoparticles on the growth and physiological responses in *Brassica rapa* ssp. pekinensis. Environmental Science and Pollution Research 2: 17672-17682.

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

Beáta P, Ildikó M (2011) Plant defense against heavy metals: the involvement of pathogenesis-related (PR) proteins. U: Awaad AS, Kaushik G, Govil JN (ur.) Recent progress in medicinal plants: Mechanism and action of phytoconstituents. Studium Press (India) Pvt. Ltd., 179-205.

Beer C, Foldbjerg R, Hayashi Y, Sutherland DS, Autrup H (2012) Toxicity of silver nanoparticles - nanoparticle or silver ion?. Toxicolology Letters 208: 286-292.

Bertolde FZ; Almeida AA; Pirovani CP (2014) Analysis of gene expression and proteomic profiles of clonal genotypes from *Theobroma cacao* subjected to soil flooding. PLoS ONE 7: e108705.

Bleeker EAJ, de Jong WH, Geertsma RE, Groenewold M, Heugens EHW (2013) Considerations on the EU definition of a nanomaterial: Science to support policy making. Regulatory Toxicology and Pharmacology 65: 119-125.

Bloghina O, Virolainen E, Fagersted KV, Hoikalla A, Wähälä K, Chirkova TL (2003) Antioxidant status of anoxia-tolerant and – intolerant plant species under anoxia and reaeration. Plant Physiology 109: 396-403.

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8: 93-99.

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

Braidot E, Petrussa E, Vianello A, Macri F (1999) Hydrogen peroxide generation by higher plant mitochondria oxidising complex I of complex II substrates. FEBS Letters 451: 347-350.

Breiman A (2014) Plant Hsp90 and its co-chaperones. Current Protein & Peptide Science 15: 232-244.

Bromberg Z, Weiss Y (2016) The role of the membrane-initiated heat shock response in cancer. Frontiers in Molecular Biosciences 3: 12.

Brune A, Urbach W, Diet KJ (1995) Differential toxicity of heavy metals is partly related to a loss of preferential extraplasmic compartmentation: A comparison of Cd-, Mo-, Ni- and Zn-stress. New Phytologist 129: 404-409.

Campbell PG, Errécalde O, Fortin C, Hiriart-Baer VP, Vigneault B (2002) Metal bioavailability to phytoplankton - applicability of the biotic ligand model. Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology 133: 189-206.

Cantero A, Barthakur S, Bushart T, Morgan RO, Fernandez P, Chou S, Morgan RO, Fernandez MP, Clark GB, Rouxc SJ (2006) Expression profiling of the Arabidopsis annexin gene family during abiotic stress, germination and de-etiolation. Plant Physiology and Biochemistry 44: 13-24.

Cao SS, Kaufman RJ (2012) Unfolded protein response. Current Biology 22(16): 622-626.

Caverzan A, Passaia G, Rosa SB, Ribeiro CW, Lazzarotto F, Margis-Pinheiro M (2012) Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. Genetics and Molecular Biology 35(4): 1011-1019.

Chance B, Maehly AC (1955) Assay of catalases and peroxidases. U: Kaplan NO, (ur.) Methods in Enzymology. Colowick SP,). Academic Press, New York, NY, 764-775.

Chen X, Wang Y, Lv B, Li J, Luo L, Lu S, Zhang X, Ma H, Ming F (2014) The NAC family transcription factor OsNAP confers abiotic stress response through the ABA pathway. Plant and Cell Physiology 55 (3): 604-619.

Chen Y, Wang XM, Zhou L, He Y, Wang D, Qi YH, Jiang DA (2015) Rubisco activase is also a multiple responder to abiotic stresses in rice. PLoS ONE 10(10): e0140934.

Cheng Y, Qi Y, Zhu Q, Chen X, Wang N, Zhao X, Chen F, Cui X, Xu L, Zhang Wei (2009). New changes in the plasma-membrane-associated proteome of rice roots under salt stress. Proteomics 9: 3100-3114.

Cheong YH, Kim CY, Chun HJ, Moon BC, Park HC, Kim JK, Lee S, Han C, Lee SY, Cho MJ. (2000) Molecular cloning of a soybean class III beta-1,3-glucanase gene that is regulated both developmentally and in response to pathogen infection. Plant Science 154: 71-81.

Chibbar RN i van Huystee RB (1984) Characterization of peroxidase in plant cells. Plant Physiology 75(4): 956-958.

Chudobova D, Dobes J, Nejdl L, Maskova D, Rodrigo MAM, Nedecky BR, Krystofova O, Kynicky J, Konecna M, Pohanka M, Hubalek J, Zehnalek J, Klejdus B, Kizek R, Adam V (2013) Oxidative stress in *Staphylococcus aureus* treated with silver (I) ions revealed by

spectrometric and voltammetric assays. International Journal of Electrochemical Science 8: 4422-4440.

Clark G, Konopka-Postupolska D, Hennig, J, Roux S (2010) Is annexin 1 a multifunctional protein during stress responses? Plant Signaling & Behavior 5(3): 303-307.

Clemens S (2006) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. Biochimie 88: 1707-1719.

Collins RM, Afzal M, Ward DA, Prescott MC, Sait SM, Rees HH, Tomsett AB (2010) Differential proteomic analysis of *Arabidopsis thaliana* genotypes exhibiting resistance or susceptibility to the insect herbivore, *Plutella xylostella*. PLoS ONE 8 (2): e57189.

Coutris C, Joner EJ, Oughton DH (2012) Aging and soil organic matter content affect the fate of silver nanoparticles in soil. Science of the Total Environment 420: 327-333.

Cvjetko P, Balen B, Peharec Štefanić P, Debogović L, Pavlica M Klobučar G, Vinko I (2014a) Dynamics of heat-shock induced DNA damage and repair in senescent tobacco plants. Biologia Plantarum 58(1): 71-79.

Cvjetko P, Zovko M, Balen B (2014b) Proteomics studies of heavy metal toxicity in plants. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology 65: 1-18.

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. Ecotoxicology and Environmental Safety 137: 18-28.

Cvjetko P, Zovko M, Peharec Štefanić P, Biba R, Tkalec, M, Domijan AM, Vinković Vrček I, Letofsky-Papst I, Šikić S, Balen B (2018) Phytotoxic effects of silver nanoparticles in tobacco plants. Environmental Science and Pollution Research 25: 5590- 5602.

Dat J, Vandenabeele S, Vranova E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F (2000) Dual action of the oxygen species during plant stress responses. Cellular and Molecular Life Sciences 57: 779-795.

Das P, Kamlesh KN, Sneh LSP, Pareek A (2015) Oxidative environment and redox homeostasis in plants: dissecting out significant contribution of major cellular organelles. Frontiers in Environmental Science. 2(70): 1-11.

De Hoffmann E, Stroobant V (2007) Mass Spectrometry: Principles and Applications. 2nd edn. John Wiley & Sons, Ltd, Brussels.

Dhawan A, Anderson D, de Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Clifford MN, Ioannides C (2002) Evaluation of the antigenotoxic potential of monomeric and dimeric flavanols, and black tea polyphenols against heterocyclic amine-induced DNA damage in human lymphocytes using the Comet assay. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 515 (1): 39-56.

Dimkpa CO, McLean JE, Martineau N, Britt DW, Haverkamp R, Anderson AJ (2013) Silver nanoparticles disrupt wheat (*Triticum aestivum* L.) growth in a sand matrix. Environmetal Science & Technology 47: 1082-1090.

Doganlar ZB, Atmaca M (2011) Influence of Airborne Pollution on Cd, Zn, Pb, Cu, and Al accumulation and physiological parameters of plant leaves in Antakya (Turkey). Water, Air, and Soil Pollution 214: 509-523.

Domijan AM, Abramov AY (2011) Fumonisin B1 inhibits mitochondrial respiration and deregulates calcium homeostasis-implication to mechanism of cell toxicity. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology 43(6): 897-904.

Dorion S, Clendenning A, Jeukens J, Salas JJ, Parveen N, Haner AA, Law RD, Force EM, Rivoal J (2012) A large decrease of cytosolic triosephosphate isomerase in transgenic potato roots affects the distribution of carbon in primary metabolism. Planta 236(4): 1177-1190.

Duressa D, Soliman K, Taylor R, Senwo Z (2011) Proteomic analysis of soybean roots under aluminum stress. International Journal of Plant Genomics 2011: 282531.

Edreva A (2005). Patogenesis - related proteins: Research. General and Applied Plant Physiology 31(1-2): 105-124.

EEA, European Environment Agency (2013) Late lessons from early warnings: science, precutiom, innovation. No1: 545.

El-Badawy D, Feldhake R, Venkatapathy R (2010) State of the science literature review: everything nanosilver and more. EPA/600/R-10/084.

Elstner EF (1991) Mechanisms of oxygen activation in different compartments of plant cells. In: Pell EJ, Steffen KL (ur.) Active oxygen/oxydative stress and plant metabolism. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, 13-25.

EPA, Environment Protection Agency (2007) Method 3051A: Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. Rev 1.

Erdmann N, Hagemann M (2001) Salt acclimation of algae and cyanobacteria: A comparison. U: Rai LC, Gaur JP (ur.) Algal Adaptation to Environmental Stresses. Springer, Berlin, Heidelberg.

EU, Europska Unija (2006) Uredba (EZ) br. 1907/2006 Europskoga parlamenta i Vijeća EZ o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija kojom se izmjenjuje i dopunjuje Direktiva 1999/45/EZ i ukida Uredba Vijeća (EEZ-a) br. 793/93 i Uredba Komisije (EZ-a) br. 1488/94 kao i Direktiva Vijeća 76/769/EEZ te Direktive Komisije 91/155/EEZ, 93/67/EEZ 93/105/EZ i 2000/21/EZ (Službeni list Europske unije br. 396 od 30. prosinca 2006. godine (REACH). br. 1907/2006: 1.

EU, Europska Unija (2011) Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial (2011/696/EU), Official Journal of the European Union, 275: 38-40.

Ewais EA (1997) Effect of cadmium, nickel and lead on growth, clorophyll content and proteins of weeds. Biologia Plantarum 39(3): 403-410.

Fabrega J, C. Renshaw JC, Lead JR (2009) Interactions of silver nanoparticles with *Pseudomonas putida* biofilms. Environmental Science & Technology 43: 9004-9009.

Farr SB, Kogoma T (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Microbiology Review 55: 561-585.

Faurobert M, Pelpoir E, Chaib J (2007) Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues. Methods in Molecular Biology 335: 9-14.

Feng K, Yu J, Cheng Y (2016) The SOD gene family in tomato: identification, phylogenetic relationships, and expression patterns. Frontiers in Plant Science 7: 1279.

Fisher NM, Marshal E, Lazova R (2003) Scar-localized argyria secondary to silver sulfadiazine cream. Journal of the American Academy Dermatology 49: 730-732.

Foldbjerg RC (2011) Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. Archives of Toxicology 85: 743-750.

Fortin C, Campbell PGC (2001) Thiosulfate enhances silver uptake by a green alga: role of anion transporters in metal uptake. Environmental Science & Technology 35: 2214-2218.

Foyer CH, Noctor G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. Plant Cell 17: 1866-1875.

Foyer CH, Neukermans J, Queval G, Noctor G, Harbinson J (2012) Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression. Journal of Experimental Botany 63: 1637-1661.

Fridovich I (1986) Superoxide dismutases. Advanced Enzimology and Related Areas of Molecular Biology 58: 61-97.

Fukayama H, Ueguchi C, Nishikawa K, Katoh N, Ishikawa C, Masumoto C, Hatanaka T, Misoo S (2012) Overexpression of rubisco activase decreases the photosynthetic CO_2 assimilation rate by reducing Rubisco content in rice leaves. Plant Cell Physiology 53: 976-986.

Furchner JE, Richmond CR, Drake GA (1968) Comparative metabolism of radionuclides in mammals-IV. Retention of silver-110 nm in mouse, rat, monkey and dog. Health Physiology 15: 505-514.

Gallagher S (2012) One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons Inc. 97: 10.2A.1-10.2A.44.

Galić N, Cindrić M (2008) Analiza proteina spektrometrijom masa. Kemija u industriji 57: 231-243.

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

Gancedo C, Flores C (2008) Moonlighting proteins in yeasts. Microbiology and Molecular Biology Reviewers 72: 197-210.

Gao F, Zhou Y, Zhu W, Li X, Fan L, Zhang G (2009) Proteomic analysis of cold stress-responsive proteins in *Thellungiella rosette* leaves. Planta 230: 1033-1046.

Gao J, Wang Y, Housepyan A, Bonzongo JCJ (2011) Effects of engineered nanomaterials on microbial catalyzed biogeochemical processes in sediments. Journal of Hazardous Materials 186(1): 940-5.

Gaspar TH, Penel CL, Thorpe T, Grappin H (1982) Chemistry and biochemistry of peroxidases. In: Peroxidasese, a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants U: Gaspar TH, Penel CL, Thorpe T, Grappin H, (ur.), University of Geneva Press, 10-60.

Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman JF, Dommes J (2002) Concepts in plant stress physiology: Application to plant tissue cultures. Plant Growth Regulation 37: 263.

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(3): 323-337.

Geisler-Lee J, Brooks M, Gerfen JR, Wang Q, Fotis C, Sparer A, Ma X, Berg RH, Geisler M (2014) Reproductive toxicity and life history study of silver nanoparticle effect, uptake and transport in *Arabidopsis thaliana*. Nanomaterials 4: 301-318.

Gerke V, Moss SE (2002) Annexins: from structure to function. Physiological Reviews 82: 331-371.

Ghosh M, Bandyopadhyay M, Mukherjee A (2010) Genotoxicity of titanium dioxide (TiO_2) nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes. Chemosphere 81(10): 1253-1262.

Gichner T, Ptacek O, Stavreva DA, Plewa MJ (1999) Comparison of DNA damage in plants as measured by single cell gel electrophoresis and somatic leaf mutations induced by monofunctional alkylating agents. Environmental and Molecular Mutagenesis 33: 279-286.

Gichner T, Patkova Z, Szakova J, Demnerova K (2004) A cadmium induced DNA damage, somatic mutatios or homologus recombination in tobacco leaves. Mutation Research 559: 49-57.

Gill SS, Tuteja N (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48: 909-930.

Gopinath P. Kumar SG, Pallab S, Anumita P, Arun C, Sankar SG (2010) Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis. Colloids and Surfaces B 77: 240-245.

Gorecka KM, Konopka-Postupolska D, Hennig J, Buchet R, Pikula S (2005) Peroxidase activity of annexin 1 from *Arabidopsis thaliana*. Biochemical and Biophysical Research Communications 336: 868-875.

Gouia H, Suzuki A, Brulfert J, Ghorbal MH (2003) Effects of cadmium on the co-ordination of nitrogen and carbon metabolism in bean seedlings. Journal of Plant Physiology 160(4): 367-376.

Gregor W, Schmidt GW, Delaney SK (2010) Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. Molecular Genetics and Genomics 283: 233.

Grene R (2002) Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants - The Arabidopsis book. American Society of Plant Biologists. 1:e0036.

Guan Z, Chai T, Zhang Y, Jin X, Wei W (2009) Enhancement of Cd tolerance in transgenic tobacco plants overexpressing a Cd-induced catalase cDNA. Chemosphere 76: 623-630.

Gupta DK, Nicoloso FT, Schetinger MRC, Rossato LV, Pereira LB, Castro GY, Srivastava S, Tripathi RD (2009) Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown *Zea mays* seedlings under moderate lead stress. Journal of Hazardous Materials 172: 479-484.

Gururani MA, Venkatesh J, Tran LSP (2015). Regulation of Photosynthesis during Abiotic Stress-Induced Photoinhibition. MOlecular Plant 8(9): 1304-1320.

Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. Journal of Experimental Botany 53(366): 1–11.

Halliwell B, Gutteridge JMC (1989) Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford.

Halliwell B, Gutteridge JM (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods in Enzymology 186: 1-85.

Hajheidari M, Abdollahian-Noghabi M, Askari H, Heidari M, Sadeghian SY, Ober ES, Salekdeh GH (2005) Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. Proteomics 5: 950-960.

Hajirezaei MR, Peisker M, Tschiersch H, Palatnik JF, Valle EM, Carrillo N, Sonnewald U. (2002) Small changes in the activity of chloroplastic $NADP^+$-dependent ferredoxin oxidoreductase lead to impaired plant growth and restrict photosynthetic activity of transgenic tobacco plants. The Plant Journal 29: 281-293.

Haldrup A, Simpson DJ, Schiller HV (2000) Down-regulation of the PSI-F Subunit of Photosystem I (PSI) in *Arabidopsis thaliana*. The Journal of Biological Chemistry 275: 31211-31218.

Han F, Chen H, Li XJ, Yang MF, Liu GS, Shen SH (2009) A comparative proteomic analysis of rice seedlings under various high-temperature stresses. Biochimica et Biophysica Acta 1794: 1625-1634.

Hancock JT, Henson D, Nyirenda M, Desikan R, Harrison J, Lewis M, Hughes J, Neill SJ (2005) Proteomic identification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in Arabidopsis. Plant Physiology and Biochemistry 43: 828-835.

Harada E, Kim JA, Meyer AJ, Hell R, Clemens S Choi YE (2010) Expression profiling of tobacco leaf trichomes identifies genes for biotic and abiotic stresses. Plant Cell Physiology 51, 1627-1637.

Hartl FU, Hayer-Hartl M (2009) Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. Nature Structural & Molecular Biology 16: 574-581.

Hatami M, Ghorbanpour M (2013) Effect of nanosilver on physiological performance of Pelargonium plants exposed to dark storage. Journal of Horticultural Research 21(1): 15-20.

Hayano-Kanashiro C, Calderon-Vazquez C, Ibarra-Laclette E, Herrera-Estrella L, Simpson J (2009) Analysis of gene expression and physiological responses in three Mexican maize landraces under drought stress and recovery irrigation. PLoS ONE 4(10): e7531.

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

Hernandez JA, Olmos E, Corpas FJ, Sevilla F, del Rio LA (1995) Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. Plant Science 1051(1): 151-167.

Hippler M, Klein J, Fink A, Allinger T, Hoerth P (2001) Towards functional proteomics of membrane protein complexes: Analysis of thylakoid membranes from *Chlamydomonas reinhardtii.* Plant Journal 28: 595-606.

Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohashi Y, Matsui H (2001) A large family of class III peroxidases. Plant Cell Physiology 42: 462-468.

Hirayama T, Shinozaki K (2010) Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. The Plant Journal 61: 1041–1052.

Hodge GA, Bowman DM, Maynard AD (2010) International handbook on regulating nanotechnologies. 1nd. Edn. Edward Elgar Publishing, Cheltenham.

Holmgren A (1995) Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide. Structure 3: 239-243.

Hossain MA, Piyatida P, Teixeirada Silva JA, Fujita M (2012) Molecular mechanism of heavy metal toxicity and tolerance in plants: central role of glutathione in detoxification of reactive oxygen species and methyl glyoxal and in heavy metal chelation. Journal of Botany 2012: 1-37.

Hossain Z, Komatsu S (2013) Contribution of proteomic studies towards understanding plant heavy metal stress response. Frontiers in Plant Science 3: 310.

Hossain Z, Mustafa G, Komatsu S (2015) Plant responses to nanoparticle stress. International Journal of Molecular Sciences 16(11): 26644-26653.

Hotze EM, Phenrat T, Lowry GV (2010) Nanoparticle aggregation: challenges to understanding transport and reactivity in the environment. Journal of Environmental Quality 39: 1909-1924.

Hsin YH, Chen CF, Huang S, Shih TS, Lai PS, Chueh PJ (2008) The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. Toxicology Letters 179: 130-139.

Huseynova IM, Aliyeva DR, Aliyev JA (2014) Subcellular localization and responses of superoxide dismutase isoforms in local wheat varieties subjected to continuous soil drought. Plant Physiology and Biochemistry 81: 54-60.

Huttner S, Strasser R (2012) Endoplasmatic reticulum-associated degradation of glycoproteins in plants. Frontiers in Plant Science 3: 67.

Hyun TK, Albacete A, van der Graaff E, Eom SH, Großkinsky DK, Böhm H, Janschek U, Rim Y, Ali WW, Kim SY, Roitsch (2015) The Arabidopsis PLAT domain protein1 promotes abiotic stress tolerance and growth in tobacco. Transgenic Research 24(4): 651-663.

Ifuku K (2014) The PsbP and PsbQ family proteins in the photosynthetic machinery of chloroplasts. Plant physiology and biochemistry 81: 108-114.

Iida K, Seki M, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Toyoda T, Konagaya A, Shinozaki K (2004) Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing in *Arabidopsis thaliana* based on full-length cDNA sequences. Nucleic Acids Ressearch 32: 5096-5103.

Ishige F, Mori H, Yamazaki K, Imaseki H (1993) Identification of a basic glycoprotein induced by ethylene in primary leaves of azuki bean as a cationic peroxidase. Plant Physiology 101(1): 193-199.

Ivanković M (2011) Nanomaterials and nanoproducts - possibilities and risks. Polimeri 32: 23-28.

Jeanjean R, Latifi A, Matthijs CP, Havaux M (2008) The PsaE subunit of photosystem I prevents light-induced formation of reduced oxygen species in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. Biochimica et Biophysica Acta 1777: 308-316.

Jiang HS, Li M, Chang FY, Li W, Yin LY (2012) Physiological analysis of silver nanoparticles and $AgNO_3$ toxicity to *Spirodela polyrhiza*. Environmental Toxicology and Chemistry 31: 1880-1886.

Jiang HS, Qiu XN, Li GB, Li W, Yin LY (2014) Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *Spirodela polyrhiza.* Environmenal Toxicology and Chemistry 33(6): 1398-1405.

Jiménez JA, Hernandez LA, del Rio FS (1997) Evidence for the presence of the acorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. Plant Physiology 114: 275-284.

Jones HG, Flowers TJ, Jones MB (1989) U: Plan under stress (1ur.). Jones HG, Jones MB (ur.). Chambridge University, Chambridge.

Kappachery S, Baniekal-Hiremath G, Woong YJ, Park AW (2017) Effect of over-and under-expression of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase on tolerance of plants to water-deficit stress. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 121(1): 97-107.

Karas M, Hillenkamp F (1988) Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. Analytical Chemistry 60: 2299-2301.

Karuppanapandian T, Moon JC, Kim C, Manohran K, Kim W (2011) Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. Australian Journal of Crop Science 5: 709-725.

Kazemi M, Ameri A (2012) Postharvest life of cut gerbera flowers as affected by nano - silver and acetylsalicylic acid. Asian Journal of Biochemistry 7: 106-111.

Kieffer P, Dommes J, Hoffmann L, Hausman JF, Renaut J (2008) Quantitative changes in protein expression of cadmium-exposed poplar plants. Proteomics 8: 2514-2530.

Kim JS, Park SJ, Kwak KJ, Kim YO, Song J, Jang B, Jung CH, Kang H (2007) Cold shock domain proteins and glycine-rich RNA-binding proteins from *Arabidopsis thaliana* can promote cold adaptation process in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Research 35: 506-516.

Kim YS, Kim JS, Cho HS, Rha DS, Kim JM, Park JD, Choi BS, Lim R, Chang HK, Chung YH, Kwon IH, Jayoung 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 Toxicology 20: 575-583.

Kim SR, Yang JI, An G (2013) OsCpn60α1, encoding the plastid chaperonin 60α subunit, is essential for folding of rbcL. Molecules and Cells 35: 402–409.

Kishor PBK, Sreenivasulu N (2014) Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? Plant Cell & Environment 37: 300-311.

Kissoudis C, van de Wiel C, Visser RGF, van der Linden G (2014) Enhancing crop resilience to combined abiotic and biotic stress through the dissection of physiological and molecular crosstalk. Frontiers in Plant Science 5: 207.

Kolattukudy PE (1980) Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. Science 208(4447): 990-1000.

Kong X, Ma L, Yang L, Chen Q, Xiang N, Yang Y, Hu X (2014) Quantitative proteomics analysis reveals that the nuclear cap-binding complex proteins Arabidopsis CBP20 and CBP80 modulate the salt stress response. Journal of Proteome Research 13(5): 2495-2510.

Kosová K, Prášil IT, Vítámvás P (2013) Protein contribution to plant salinity response and tolerance acquisition. International Journal of Molecular Sciences 14: 6757-6789.

Kotchoni SO, Kuhns C, Ditzer A, Kirch HH, Bartels D (2006) Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. Plant Cell & Environment, 29: 1033-1048.

Kraljević Pavelić S, Pavelić K (2009) Novo doba molekularne medicine: dometi proteomike. Medicina : glasilo Hrvatskoga liječničkoga zbora, Podružnica Rijeka 45: 208-210.

Kumar M, Kumari P, Reddy C, Jha B (2014) Salinity and desiccation induced oxidative stress acclimation in seaweeds. U: In Sea Plants Advances in Botany Research (1st ed.) Bourgougnon N. (ur.). San Diego, CA: Academic Press Publisher Elsevier Ltd, 91–123.

Kumar SA, Kumari PH, Kumar GS, Mohanalatha C, Kishor PBK (2015) Osmotin: a plant sentinel and a possible agonist of mammalian adiponectin. Frontiers in Plant Scences 6: 163.

Kumar M, Padula MP, Davey P, Pernice M, Jiang Z, Sablok G, Contreras-Porcia L, Ralph, Peter J (2017) Proteome analysis reveals extensive light stress-response reprogramming in the seagrass *Zostera muelleri* (Alismatales, Zosteraceae) Metabolism. Frontiers in Plant Science 7: 2023.

Kumari M, Mukherjee A, Chandrasekaran N (2009) Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. Science of the Total Environment 407: 5243-5246.

Kurien BT, Scofield RH (2012) Extraction of proteins from gels: a brief review. Methods of Molecular Biology 869: 403-405.

Labille J, Brant J (2010) Stability of nanoparticles in water. Nanomedicine (Lond) 5: 985-998.

Labudda M (2013) Lipid peroxidation as a biochemical marker for oxidative stress during drought. An effective tool for plant breeding. E-wydawnictwo, Poland.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Lagrimini LM, Rothstein S (1987) Tissue specificity of tobacco peroxidase isozymes and their induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. Plant Physiology 84: 438-442.

Lavid N, Schwartz A, Lewinsohn E, Tel-Or E (2001) Phenols and phenol oxidases are involved in cadmium accumulation in the water plants *Nymphoides peltata* (*Menyanthaceae*) and Nymphaceae (*Nymphaeaceae*). Planta 214: 189-195.

Lee H, Choi JS, Nino M, Cho YG, Kang KK, Jung YJ. (2015) Regulation of abiotic stress response through NtROS2a-mediated demethylation in tobacco. Plant Breeding and Biotechnology 3(2): 108-118.

Leubner-Metzger G, Meins FJ (1999) Functions and regulation of plant β-1,3-glucanases (PR-2).U: Pathogenesis-related proteins in plants. Datta SK, Muthukrishnan S (ur.) CRC Press, Boca Raton, FL, 49-76.

Levard C, Hotze EM, Lowry VG, Brown JEG (2012) Environmental transformations of silver nanoparticles: Impact on stability and toxicity. Environmental Science & Technology 46: 6900-6914.

Levine RL, Williams JA; Stadtman EP, Shacter E (1994) Carbonyl assay for determination of oxidatively modified proteins. Methods in Enzymology 233: 346-357.

Li XJ, Yang MF, Chen H, Qu LQ, Chen F, Shen SH (2010) Abscisic acid pretreatment enhances salt tolerance of rice seedlings: proteomic evidence. Biochimica et Biophysica Acta 1804: 929-940.

Li X, Schirmer K, Bernard L, Sigg L, Pillai S, Behra R (2015). Silver nanoparticle toxicity and association with the alga *Euglena gracilis*. Environmental Science: Nano 2: 594-602.

Liu W, Yu K, He T, Li F, Zhang D, Liu J (2013) The low temperature induced physiological responses of avena nuda L., a cold-tolerant plant species. The Scientific World Journal 658793.

Lorković ZJ (2009) Role of plant RNA-binding proteins in development, stress response and genome organization. Trends in Plant Science 14: 229-236.

Lok CN, Ho CM, Chen R, He QY, Yu WY, Sun H, Tam PK, Chiu JF, Che CM (2006) Proteomics analisys of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. Journal of the Proteome Research 5: 916-924.

Lopez JL (2007) Two-dimensional electrophoresis in proteome expression analysis. Journal of Chromatography B 849: 190-202.

Lowry GV, Kelvin B, Apte KB, Lead CB, Jamie R (2012) Transformations of nanomaterials in the environment. Environmental Science & Technology 46: 6893-6899.

Luo P, Shen Y, Jin S, Huang S, Cheng X, Wang Z, Lib P, Zhao J, Bao Ma, Ning G (2016) Overexpression of *Rosa rugosa* anthocyanidin reductase enhances tobacco tolerance to abiotic stress through increased ROS scavenging and modulation of ABA signaling. Plant Science 245: 35-49.

Luoma SN (2008) Silver nanotechnologies and the environment old problems or new challenges?. Tehnical report, project on emerging nanotechnologies. Health and Environmental Research Online, Woodrow Wilson International Center for Scholars, Washington, DC.

Lushchak V (2011) Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 153 (2): 153-190.

Ma X, Geisler-Le J, Deng Y, Kolmakov A (2010) Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. Science of the Total Environment 408: 3053-3061.

Ma C, White JC, Dhankher OP, Xing B (2015) Metal-based nanotoxicity and detoxification pathways in higher plants. Environmental Science & Technology 49(12): 7109-7122.

Maayan I, Shaya F, Ratner K, Mani Y, Lavee S, Avidan B, Shahak Y, Ostersetzer-Biran O (2008) Photosynthetic activity during olive (*Olea europaea*) leaf development correlates with plastid biogenesis and Rubisco levels. Physiologia Plantarum 134(3): 547-58.

Majsec K, Cvjetko P, Tolić S, Tkalec M, Balen B, Pavlica (2016) Integrative approach gives new insights into combined Cd/Cu exposure in tobacco. Acta Physiologiae Plantarum 38: 142.

Mallick N, Rai LC (2002) Physiological responses of non-vascular plants to hevy metals. U: Physiology an biochemistry of metal toxicity and tolerance in plants. Prasad MNV, Strzalka K (ur). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, Boston, London, 112-148.

Maslenkova LT, Zanev Y, Popova LP (1989) Effect of abscisic acid on the photosynthetic oxygen evolution in barley chloroplasts. Photosynthesis Research 21(1) 45-50.

Mazumdar H, Ahmed GU (2011) Phytotoxicity effect of silver nanoparticles on *Oryza sativa*. International Journal of Chemtech Research 3(3): 1494-1500.

Mazumdar H (2014) Toxicological effects of silver nanoparticles in selected crop plants. International Journal of Research in Chemistry and Environment 4(3): 101-106.

Manaa A, Ben Ahmed H, Valot B, Bouchet JP, Aschi-Smiti S, Causse M, Faurobert M (2011) Salt and genotype impact on plant physiology and root proteome variations in tomato. Journal of Experimental Botany 62:2797-2813.

Mauch F, Staehelin, LA (1989). Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and [beta]-1,3-glucanase in bean leaves. The Plant Cell 1(4): 447-457.

Meagher EA, FitzGerald GA (2000) Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. Free Radical Biology and Medicine 28: 1745-1750.

Medzihradszky, K.F., Campbell, J.M., Baldwin, M.A., Falick, A.M., Juhasz, P., Vestal, M.L., Burlingame, A.L. (2000) The characteristics of peptide collision-induced dissociation using a high-performance MALDI-TOF/TOF tandem mass spectrometer. Analytical Chemistry 72(3): 552-558.

Mirzajani F, Askari H, Hamzelou S, Schober Y, Römpp A, Ghassempour A, Spengler B (2014) Proteomics study of silver nanoparticles toxicity on *Bacillus thuringiensis.* Ecotoxicology and Environmental Safety 100: 122-130.

Mittler R, Zilinskas B (1993) Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. Analytical Biochemistry 212: 540-546.

Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network in plants. Trends in Plant Science 9: 490-498.

Mokhele B, Zhan X, Zhang YG (2012) Review: Nitrogen assimilation in crop plants and its affecting factors. Canadian Journal of Plant Science. 92: 399-405.

Mohammadi PP, Moieni A, Hiraga S, Komatsu S (2012a) Organ-specific proteomic analysis of drought-stressed soybean seedlings. Journal of Proteomics 75: 1906-1923.

Mohammadi PP, Moieni A, Komatsu S (2012b) Comparative proteome analysis of drought-sensitive and drought-tolerant rapeseed roots and their hybrid F1 line under drought stress. Amino Acids 43: 2137-2152.

Moller IM, Jensen PE, Hansson A (2007) Oxidative modifications to cellular components in plants. Annual Review of Plant Biology 58: 459-481.

Monastyrskaya K, Babiychuk EB, Draeger A (2009) The annexins: spatial and temporal coordination of signaling events during cellular stress Cellular and Molecular Life Sciences 66: 2623-2642.

Monnet F, Vaillant N, Vernay P, Coudret A, Sallanon H, Hitmi A (2001) Relationship between PSII activity, CO_2 fixation, and Zn, Mn and Mg contents of *Lolium perenne* under zinc stress. Journal of Plant Physiology 158, 1137-1144.

Moon H, Lee B, Choi G, Shin D, Prasad DT, Lee O, Kwak SS, Kim DH, Nam J, Bahk J, Hong JC, Lee SY, Cho MJ, Lim CO, Yun DJ (2003) NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. Proceedings of the National Acadademy of Science, USA 100(1): 358-363.

Mustafa G, Sakata K, Hossain Z, Komatsu S (2015) Proteomic study on the effects of silver nanoparticles on soybean under flooding stress. Journal of Proteomics 122: 100-118.

Mostafa I, Zhu N, Yoo MJ, Balmant KM, Misra BB, Dufresne C, Hashem MA, Chen S, El-Domiaty M (2016) New nodes and edges in the glucosinolate molecular network revealed by proteomics and metabolomics of Arabidopsis myb28/29 and cyp79B2/B3 glucosinolate mutants. Journal of Proteomics 138: 1-19.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Plant Physiology 15: 473-497.

Nair PM, Chung IM (2014a) Assessment of silver nanoparticle-induced physiological and molecular changes in *Arabidopsis thaliana*. Environmental Science and Pollution Research International 21(14): 8858-8869.

Nair PM, Chung IM (2014b) 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-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiology 22: 867-880.

Nath K, Kumar S, Poudyal RS, Yang YN, Timilsina R, Park YS, Nath J, Chauhan PS, Pant B, Lee CH (2014) Developmental stage-dependent differential gene expression of superoxide dismutase isoenzymes and their localization and physical interaction network in rice (*Oryza sativa* L.). Genes & Genomics 36: 45–55.

Navabpour S, Morris K, Allen R, Harrison E, Mackerness SAH, Buchanan-Wollaston V; (2003) Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. Journal of Experimental Botany 54(391): 2285-2292.

Navarro E, Baun A, Behra R, Hartmann NB, Filser J, Miao AJ, Quigg A, Santschi PH, Sigg L (2008) Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. Ecotoxicology 17: 372-386.

Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, Marconi F, Kaegi R, Odzak N, Sigg L, Behra R (2015) Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. Environmental Science & Technology 42: 8959-8964.

Naver H, Scott MP, Golbeck JH, Møller BL, Scheller HV (1996) Reconstitution of barley photosystem I with modified PSI-C allows identification of domains interacting with PSI-D and PSI-A/B. The Journal of Biological Chemistry 271(15): 8996-9001.

Nelson LN, Lehinger A, Cox MM (2008) Principles of biochemistry. 3th edn. W.H. Freeman, New York.

Nguyen CC, Nakaminami K, Matsui A, Kobayashi S, Kurihara Y, Toyooka K, Tanako M, Seki M (2016) Oligouridylate binding protein 1b plays an integral role in plant heat stress tolerance. Frontiers in Plant Science 7: 853.

Noctor G, Foyer CH (1998) Ascorbate and glutatione: keeping active oxygen under control. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 49: 249-279.

Nouri MZ, Moumeni A, Komatsu S (2015) Abiotic stresses: insight into gene regulation and protein expression in photosynthetic pathways of plants. International Journal of Molecular Sciences 16: 20392-20416.

Nugroho LH, Verpoorte R (2002) Secondary metabolism in tobacco. Plant Cell, Tisue and Organ Culture 68: 105-125.

Nyström T (2005) Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. EMBO Journal. 24: 1311-1317.

Oberdörster G., Ferin J, Finkelstein G, Wade P, Corson N (1990) Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles? Lung lavage studies. Journal of Aerosol Science 3: 384-387.

Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environmental Health Perspectives. 113(7): 823-839.

Ok SH, Yoo KS, Shin JS (2012) CBSXs are sensor relay proteins sensing adenosine-containing ligands in Arabidopsis. Plant Signaling & Behavior 7(6): 664-667.

Otero AS (2000) NM23/nucleoside diphosphate kinase and signal transduction. Journal of Bioenergetics and Biomembranes 32: 269-75.

Panda KK, Achary VM, Krishnaveni R, Padhi BK, Sarangi SN, Sahu SN, Panda BB (2011) In vitro biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. Toxicology In Vitro 25: 1097-1105.

Pavoković D, Križnik B, Krsnik-Rasol M (2012) Evaluation of protein extraction methods for proteomic analysis of non-model recalcitrant plant tissues. Croatica Chemica Acta 85: 177-183.

Paulo JA, Kadiyala V, Banks PA, Steen H, Conwell DL (2012) Mass spectrometry-based proteomics for translational research: A technical overview. Yale Journal of Biology and Medicine, 85: 59-73.

Peharec Štefanić P, Šikić S, Cvjetko P, Balen B (2012) Cadmium and zinc induced similar changes in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seedlings and plants. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology 63(3): 321-335.

PEN, The Project on Emerging Nanotechnologies (2011) Consumer Product Inventory. Woodrow Wilson International Center for Scholars. Accessed January 2017: http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/

Peng Z, Wang M, Li F, Lv H, Li C, Xia G (2009) A proteomic study of the response to salinity and drought stress in an lntrogression strain of bread wheat. Molecular & Cellular Proteomics 8: 2676-2686.

Perl-Trevers R, Perl A (2002) Oxidative stress: an introduction. Oxidative stress in plants - Current Science Association 82: 1227-1238.

Pevalek Kozlina B (2003) Fiziologija bilja, Profil International, Zagreb.

Phalen RF, Morrow PE (1973) Experimental inhalation of metalic silver. Health Physiology 24: 509-518.

Piljac I (2006) Elektroforeza. U Elektroforeza Piljac I (ur.). Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Media Print, Zagreb.

Pirela SV, Sotiriou GA, Bello D, Shafer M, Bunker KL, Castranova V, Thomas T, Demokritou P (2015) Consumer exposures to laser printer-emitted engineered nanoparticles: A case study of life-cycle implications from nano-enabled products. Nanotoxicology 9: 760-768.

Podgórska A., Burian M., Rychter AM, Rasmusson AG, Szal B (2017). Short-term ammonium supply induces cellular defence to prevent oxidative stress in Arabidopsis leaves. Physiologia Plantarum 160: 65–83.

Pokhrel LR, Dubey B (2013) Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles. Science of the Total Environment. 452–453: 321-332.

Portis AR (2003) Rubisco activase: Rubisco's catalytic chaperone, Photosynthesis Research. 75: 11-27.

Pozveh ZT, Razavizadeh R, Rostami F (2014) Changes occurring in canola (*Brassica napus* L.) in response silver nanoparticles treatment under in vitro conditions. Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences 4(3): 797-807.

Puntarić E (2014) Utjecaj nanočestica srebra na vodenu leću (*Lemna minor* L.). Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Qian H, Peng X, Han X, Ren J, Sun L, Fu Z (2013) Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. Journal of Environmental Science (China) 25(9): 1947-1955.

Qin Y, Zhang S, Zhang Lm Zhu D, Syed A (2005) Response of in vitro strawberry to silver nitrate ($AgNO_3$). Horticultural Science 40: 747-751.

Qureshi MI, Israr M, Abdin MZ, Iqbal M (2005) Responses of *Artemisia annua* L. to lead and salt - induced oxidative stress. Environmental and Experimental Botany 53: 185-193.

Rada B, Leto T L (2008) Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. Contributions to Microbiology 15: 164–187.

Rani PU, Yasur J, Loke Karthik S, Dutta D (2016) Effect of synthetic and biosynthesized silver nanoparticles on growth, physiology and oxidative stress of water hyacinth: *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms. Acta Physiologiae Plantarum 38(2): 58.

Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. Plant Cell 12: 707-720.

Ribeiro F, Gallego-Urrea JA, Jurkschat K, Crossley A, Hassellöv M, Taylor C, Coares AMVM, Loureiro S (2014) Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. Science of the Total Environment 466: 232-241.

Rico CM, Majumdar S, Duarte-Gardea M, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey JL (2011) Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59: 3485-3498.

Ritter A, Ubertini M, Romac S, Gaillard F, Delage L, Mann A (2010). Copper stress proteomics highlights local adaptation of two strains of the model brown alga *Ectocarpus siliculosus*. Proteomics 10: 2074-2088.

Rius SP, Casati P, Iglesias AA, Gomez-Casati DF (2008) Characterization of Arabidopsis lines deficient in GAPC-1, a cytosolic NAD-dependent glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. Plant Physiology 148: 1655-1667.

Rogić T, Horvatić A, Tkalec M, Cindrić M, Balen B (2015) Proteomic analysis of *Mammillaria gracilis* Pfeiff. *in vitro*-grown cultures exposed to iso-osmotic NaCl mannitol. Plant Cell Tissue and Organ Culture 122: 127-146.

Rollins JA, Habte E, Templer SE, Colby T, Schmidt J, von Korff M (2013) Leaf proteome alterations in the context of physiological and morphological responses to drought and heat stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). Journal of Experimental Botany 64(11): 3201-3212.

Romero-Puertas MC, Palma JM, Gómez M, del Río LA, Sandalio LM (2002) Cadmium causes the oxidative modifications of proteins in pea plants. Plant Cell and Environment 25: 677-686.

Rostami F, Ehsanpour AA (2009) Application of silver thiosulfate (STS) on silver accumulation and protein pattern of potato (*Solanum tuberosum* L.) under in vitro culture. Malaysian Applied Biology 38(2): 46-54.

Ruffini Castiglione M, Giorgetti L, Bellani L, Muccifora S, Bottega S, Span C (2016) Root responses to different types of TiO_2 nanoparticles and bulk counterpart in plant model system *Vicia faba* L. Environmental and Experimental Botany 130: 11-21.

Salekdeh GH, Siopongco J, Wade LJ, Ghareyazie B, Bennett J (2002). A proteomic approach to analyzing drought- and salt-responsiveness in rice. Field Crops Research 76: 199-219.

Samberg ME, Orndorff PE,and Monteiro-Riviere NA (2011) Antibacterial efficacy of silver nanoparticles of different sizes, surface conditions and synthesis methods. Nanotoxicology 5: 244-253.

Saint S, Veenestra DL, Sullivan SD, Chenoweth C, Fendrick AM (2000) The potential clinical and economic benefits of silver alloy urinary chateters in preventing uinary tract infection. Archives of Internal Medicine 160: 2670-2675.

Santos CLV, Pourrut B, Ferreira de Oliveira JMP (2015) The use of comet assay in plant toxicology: recent advances. Frontiers in Genetics 6: 216.

Sarkar S, Jana AD, Samanta SK, Mostafa G (2007) Facile synthesis of silver of silver nanoparticles with highly efficent anti-microbal property. Polyhedron 26: 4419-4426,

Sarvajeet SG, Narendra T (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiology and Biochemistry 48: 909-930.

Savolainen K, Alenius H, Norppa H, Pylkkänen L, Tuomi T, Kasper G (2010) Risk assessment of engineered nanomaterials and nanotechnologies. A Review Toxicololgy 269: 92-104.

Scandalios JG (1990) Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. Advances in Genetics 28: 1-41.

Schmidt GW, Delaney SK (2010) Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. Molecular Genetic and Genomics 283: 233-241.

Schmidt R, Schippers JH (2015) ROS-mediated redox signaling during cell differentiation in plants. Biochimica et Biophysica Acta 1850(8): 1497-508.

Schwarz DS, Blower MD (2016) The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. Cellular and Molecular Life Sciences 73: 79-94.

Scialabba A, Bellani LM, Dell'Aquila A (2002) Effects of ageing on peroxidase activity and localization in radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. European Journal of Histochemistry 46: 351-358.

Schat H, Llugani M, Bernhard R (2000) Metal-specific patterns of tolerance, uptake, and transport of heavy metals in hyperaccumulating and nonhyperaccumulating metallophytes In: Terry N, Banuelos G (Ur.) Phytoremediation of contaminated soil and water. CRC Press LLC 235-250.

Scheller HV, Naver H, Møller BL (1997) Molecular aspects of photosystem I. Physiologia Plantarum 100: 842-851.

Schützendübel A, Polle A (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal - induced oxidative stress and protection by mycorrhization. Journal of Experimental. Botany 53 (372): 1351-1365.

Sekhon BS (2014). Nanotechnology in agri-food production: An overview. Nanotechnology Science Applications 7: 31-53.

Seltenrich N (2013) Nanosilver: Weighing the risks and benefits. Environmental Health Perspective 121: 220-225.

Sétif P, Fischer N, Lagoutte B, Bottin H, Rochaix, JD (2002) The ferredoxin docking site of photosystem I. Biochimica et Biophysica Acta 1555: 204-209.

Sharma P, Dubey RS (2005) Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. Plant Growth Regulation 46(3): 209-221.

Sharma SS, Dietz KJ (2009) The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. Trends in Plant Science 14(1): 43-50.

Sharma P, Bhatt D, Zaidi MG, Saradhi PP, Khanna PK, Arora S (2012a) Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. Applied Biochemistry and Biotechnology 167: 2225-2233.

Sharma S, Mustafiz A, Singla-Pareek SL, Shankar Srivastava P, Sopory SK (2012b) Characterization of stress and methylglyoxal inducible triose phosphate isomerase (OscTPI) from rice. Plant Signaling & Behavior 7(10): 1337-1345.

Sharma VK, Siskova KM, Zboril R, Gardea-Torresdey JL (2014) Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: Fate, stability and toxicity. Advances in Colloid and Interface Science 204: 15-34.

Shtangeeva I, Venäläinen S, Hartikainen H, Surgik M, Timofeev S (2011) Silver-induced changes in the nutrient and trace element uptake by wheat and amount of the rhizosphere proteins. Journal of Plant Nutrition 34: 1497-1506.

Siddiqi KS, Husen A (2017) Plant response to engineered metal oxide nanoparticles. Nanoscale Research Letters 12: 92.

Siedlecka A, Krupa Z (1999) Cd/Fe interaction in higher plants-its consequences for the photosyntetic apparatus. Photosyntetica 36: 321-331.

Sierro N, Battey JN, Ouadi S, Bakaher N, Bovet L, Willig A, Goepfert S, Peitsch MC, Ivanov NV (2014) The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. Nature Communications 5: 3833.

Sies H (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Experimental Physiology 82: 291-295.

Silva T, Pokhrel LR, Dubey B, Tolaymat TM, Maier KJ, Liu X (2014) Particle size, surface charge and concentration dependent ecotoxicity of three organo-coated silver nanoparticles: Comparison between general linear model-predicted and observed toxicity. Science of the Total Environment 469: 968-976.

Sirover MA (2011) On the functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemical mechanisms and regulatory control. Biochimica et Biophysica Acta 1810: 741-751.

Siu GM, Draper HH (1982) Metabolism of malondialdehyde in vivo and in vitro. Lipids. 17: 349-55.

Skopelitis DS, Paranychianakis NV, Paschalidis KA, Pliakonis ED, Delis ID, Yakoumakis DI, Kouvarakis A, Papadakis AK, Stephanou EG, Roubelakis-Angelakis KA (2006): Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. Plant Cell 18: 2767-2781.

Sobhanian H, Razavizadeh R, Nanjo Y, Ehsanpour AA, Jazii FR, Motamed N (2010) Proteome analysis of soybean leaves, hypocotyls and roots under salt stress. Proteome Science 8: 19-25.

Soitamo AJ, Piippo M, Allahverdiyeva Y, Battchikova N, Aro EM (2008) Light has a specific role in modulating Arabidopsis gene expression at low temperature. BMC Plant Biology 8: 13.

Sofo A, Dichio B, Xiloyannis C, Masia A (2004) Lipoxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive trees in response to drought stress. Physiologia Plantarum 121: 58-65.

Son JA, Narayanankutty DP, Roh KS (2013) Influence of exogenous application of glutathione on rubisco and rubisco activase in heavy metal-stressed tobacco plant grown in vitro. Saudi Journal of Biological Sciences 21(1): 89-97.

Song G, Gao Y, Wu H, Hou W, Zhang C, Ma H (2012) Physiological effect of anatase TiO_2 nanoparticles on *Lemna minor*. Environmental Toxicology and Chemistry, 31(9): 2147-2152.

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 TiO_2 and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). Ecotoxicology and Environmental Safety 93: 60-67.

Stampoulis D, Sinha SK, White JC (2009) Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. Environmental Science & Technology 43: 9473-9479.

Suresh AK, Pelletier DA, Wang W, Moon JW, Gu BH, Mortensen NP, Allison DP, Joy DC, Phelps TJ, Doktycz MJ (2010) Silver nanocrystallites: biofabrication using *Shewanella oneidensis*, and an evaluation of their comparative toxicity on gram-negative and gram-positive bacteria. Environmental Science & Technology 44: 5210-5215.

Sosan A, Svistunenko D, Straltsova D, Tsiurkina K, Smolich I, Lawson T, Subramaniam S, Golovko V, Anderson D, Sokolik A, Colbeck I, Demidchik V (2016) Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify the physiology of *Arabidopsis thaliana* plants. Plant Journal 85: 245-257.

Stadtman ER (1986) Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems: implication in protein turnover, aging and neutrophil function. Trends in Biochemical Sciences 11: 11-12.

Syu Y, Hung JH, Chen JC, Chuang HW (2014) Impacts of size and shape of silver nanoparticles on Arabidopsis plant growth and gene expression Plant Physiology and Biochemistry 83: 57-64.

Štefan L, Tepešić T, Zavidić T, Urukalo M, Tota D., Domitrović R (2007) Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. Medicina 10: 84-93.

Uberegui E, Hall M, Lorenzo Ó, Schröder WP, Balsera M (2015) An Arabidopsis soluble chloroplast proteomic analysis reveals the participation of the Executer pathway in response to increased light conditions. Journal of Experimental Botany 66(7): 2067-2077.

Takahashi MA, Asada K (1983) Superokside anion permeability of phopholipis membranes and chloroplast thylakoids. Archives of Biochemistry and Biophysics 226: 558-566.

Tang L, Kim MD, Yang KS, Kwon SY, Kim SH, Kim JS, Yun DJ, Kwak SS, Lee HS (2008) Enhanced tolerance of transgenic potato plants overexpressing nucleoside diphosphate kinase 2 against multiple environmental stresses. Transgenic Resesarch 17: 705.

Tamburino R, Vitale M, Ruggiero A, Sassi M, Sannino L, Arena S, Costa A, Batelli G, Zambrano N, Scaloni A, Grillo S, Scotti N (2017) Chloroplast proteome response to drought stress and recovery in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) BMC Plant Biology 17: 40-54.

Tate S, Larsen B, Bonner R, Gingras AC (2013) Label-free quantitative proteomics trends for protein–protein interactions. Journal of Proteomics 81: 91-101.

Taylor C, Matzke M, Kroll A, Read DS, Svendsen C, Crossley A (2016). Toxic interactions of different silver forms with freshwater green algae and cyanobacteria and their effects on mechanistic endpoints and the production of extracellular polymeric substances. Environmental Science: Nano 3: 396-408.

Thimm O, Essigmann B, Kloska S, Altmann T, Buckhout TJ (2001) Response of arabidopsis to iron deficiency stress as revealed by microarray analysis. Plant Physiology 127(3): 1030-1043.

Thuesombat P, Hannongbua S, Akasit S, Chadchawan S (2014) Effect of silver nanoparticles on rice (*Oryza sativa* L. cv. KDML 105) seed germination and seedling growth. Ecotoxicology and Environmental Safety 104: 302-309.

Tiwari DC, Dipak P, Dwivedi SK, Shami TC, Dwivedi P (2017) PPy/TiO_2(np)/CNT polymer nanocomposite material for microwave absorption. Journal of Materials Science: Materials in Electronics 29: 1643.

Tkalec M, Peharec Štefanić P, Cvjetko P, Šikić S, Pavlca M, Balen B (2014) The effects of cadmium-zinc interactions on biochemical responses in tobacco seedlings and adult plants. PLoS ONE 9, 1; e87582.

Toorchi M, Yukawa K, Nouri MZ Komatsu S (2009) Proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in soybean roots. Peptides 30: 2108-2117.

Tripathi DK, Tripathi A, Shweta S, Singh S, 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. Frontiers in Microbiology 8: 7.

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

Upadhyaya SK, Singh DP (2014) Effect of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria on wheat plants and soil health in a saline environment. Plant Biology 17(1): 288-283.

Valastyan JS, Lindquist S (2014) Mechanisms of protein-folding diseases at a glance. Disease Models and Mechanisms 7: 9-14.

Van der Lubben IM, Kersten G, Fretz MM, Beuvery C, Coos Verhoef J, Junginger HE (2003) Chitosan microparticles for mucosal vaccination against diphtheria: oral and nasal efficacy studies in mice. Vaccine 28: 1400-1408.

Van Huystee RB, Carnis WL (1982) Progress and prospects in the use of peroxidase to study cell development. Photochemistry 21: 1843-1847.

Vannini C, Guido 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(7): e68752.

Vannini C, Domingo G, Onelli E, De Mattia F, Bruni I, Marsoni M., Bracale M (2014) Phytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles exposure on germinating wheat seedlings. Journal of Plant Physiology 171: 1142-1148.

Vicuna D, Malone RP, Dix PJ (2011) Increased tolerance to abiotic stress in tobaccpo plants expressing a barley cell wall peroxidase. Journal od Plant Sciences 6 (1): 1-13.

Vinocur B, Altman A (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. Current Opinion in Biotechnology 6: 123-132.

Virdi AS, Singh S, Singh P (2015) Abiotic stress responses in plants: roles of calmodulin-regulated proteins. Frontiers in Plant Science 6: 809.

Vishwakarma K, Shweta, Upadhyay N, Singh J, Liu S, Singh VP, Prasad SM, Chauhan DK, Tripathi DK, Sharma S (2017) Differential phytotoxic impact of plant mediated silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate ($AgNO_3$) on *Brassica* sp. Frontiers in Plant Science 8: 1501.

Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A (2004) Role of plant heat- shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. Trends in Plant Science 9: 244-252.

Wang P, Heitman J (2005) The cyclophilins. Genome Biology 6(7): 226.

Wang GF, Wei X, Fan R, Zhou H, Wang X, Yu C, Dong L, Dong Z, Wang X, Kang Z, Ling H, Shen QH, Wang D, Zhang X (2011) Molecular analysis of common wheat genes encoding three types of cytosolic heat shock protein 90 (Hsp90): functional involvement of cytosolic Hsp90s in the control of wheat seedling growth and disease resistance. New Phytologist, 191(2): 418-431.

Wang L, Xu C, Wang C, Wang Y (2012) Characterization of a eukaryotic translation initiation factor 5A homolog from *Tamarix androssowii* involved in plant abiotic stress tolerance. BMC Plant Biology 12: 118-24.

Wang QJ, Sun H, Dong Q, Sun TY, Jin ZX, Hao YJ, Yao YX (2016) The enhancement of tolerance to salt and cold stresses by modifying the redox state and salicylic acid content via

the cytosolic malate dehydrogenase gene in transgenic apple plants. Plant Biotechnology Journal l14(10): 1986-97.

Welinder KG (1985) Plant peroxidases. Their primary, secondary and tertiary structures, and relation to cytochrome c peroxidase. European Journal of Biochemistry 151: 497-504.

Whitley D, Goldberg SP, Jordan WD (1999) Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. Journal of Vascular Surgery, 29: 748-751.

Wilkins KA, Matthus E, Swarbreck SM, Davies JM (2016) Calcium-mediated abiotic stress signaling in roots. Frontiers in Plant Science 7: 1296.

Wojtala A, Bonora M, Malinska D, Pinton P, Duszynski J, Wieckowsk MR (2014) Chapter Thirteen - Methods in Enzymology. 542: 243-262.

Woodbury W, Spencer AK, Stahmann M (1971) An improved procedure using ferrycyanide for detecting catalase isozyms. Analytical Biochemistry 44: 301-305.

Xiu ZM, Alvarez PJJ (2011) Differential effect of common ligands and molecular oxygen on antimicrobial activity of silver nanoparticles versus silver ions. Environmental Science & Technology 45: 9003-9008.

Xu QS, Hu JZ, Xie KB, Yang HY, Du KH, Shi GX (2010) Accumulation and acute toxicity of silver in *Potamogeton crispus* L. Journal of Hazardous Materials 173: 186-193.

Xu YH, Liu R, Yan L, Liu ZQ, Jiang SC, Shen YY, Wang XF, Zhang DP (2012) Light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins are required for stomatal response to abscisic acid in Arabidopsis. Journal of Experimental Botany 63(3): 1095-1106.

Xu T, Gu L, Choi MJ, Kim RJ, Suh MC, Kang H (2014) Comparative functional analysis of wheat (*Triticum aestivum*) zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding proteins in response to abiotic stresses. PLoS ONE. 9: e96877.

Xue GP, McIntyre CL, Glassop D, Shorter D (2008) Use of expression analysis to dissect alterations in carbohydrate metabolism in wheat leaves during drought stress. Plant Molecular Biology 67: 197.

Yan S, Tang Z, Su W, Sun W (2005) Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. Proteomics 5: 235-244.

Yasur J, Rani PU (2013) Environmental effects of nanosilver: impact on castor seed germination, seedling growth, and plant physiology. Environmental Science and Pollution Research 20: 8636-8648.

Yin L, Cheng Y, Espinass B, Colman BP, Auffan M, Wiesner M, Rose J, Liu J, Bernhardt ES (2011) More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. Environmental Science & Technology 45: 2360-2367.

Yin L, Colman BP, McGill BM, Wright JP, Bernhardt ES (2012) Effects of silver nanoparticle exposure on germination and early growth of eleven wetland plants. PLoS ONE 7(10): e47674.

Yoshida K, Kaothien P, Matsui T, Kawaoka A, Shinmyo A (2003) Molecular biologicy application of peroxidase genes. Applied Microbiology and Biotechnology 60: 665-670.

Yuan Y, Zhong M, Shu S, Du N, Sun J, Guo S (2016) Proteomic and Physiological Analyses Reveal Putrescine Responses in Roots of Cucumber Stressed by NaCl. Frontiers in Plant Science 7: 1035.

Zeng X, Ma LQ, Qiu R, Tang Y (2009) Responses of non-protein thiols to Cd exposure in Cd hyperaccumulator *Arabis paniculata* Franch. Environmental and Experimental Botany 66: 242-248.

Zeng XW, Qiu RL, Ying RR, Tang YT, Tang L, Fang XH (2011) The differentially-expressed proteome in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabis paniculata* Franch. in response to Zn and Cd. Chemosphere 82(3): 321-328.

Zhang HY, Jiang YN, He ZY, Ma M (2005) Cadmium accumulation and oxidative burst in garlic (*Allium sativum*). Journal of Plant Physiology 162: 977-984.

Zhang Z, Kong F, Vardhanabhuti B, Mustapha A, Lin M (2012) Detection of engineered silver nanoparticle contamination in pears. Journal of Agricultural and Food Chemistry 60(43): 10762-10767.

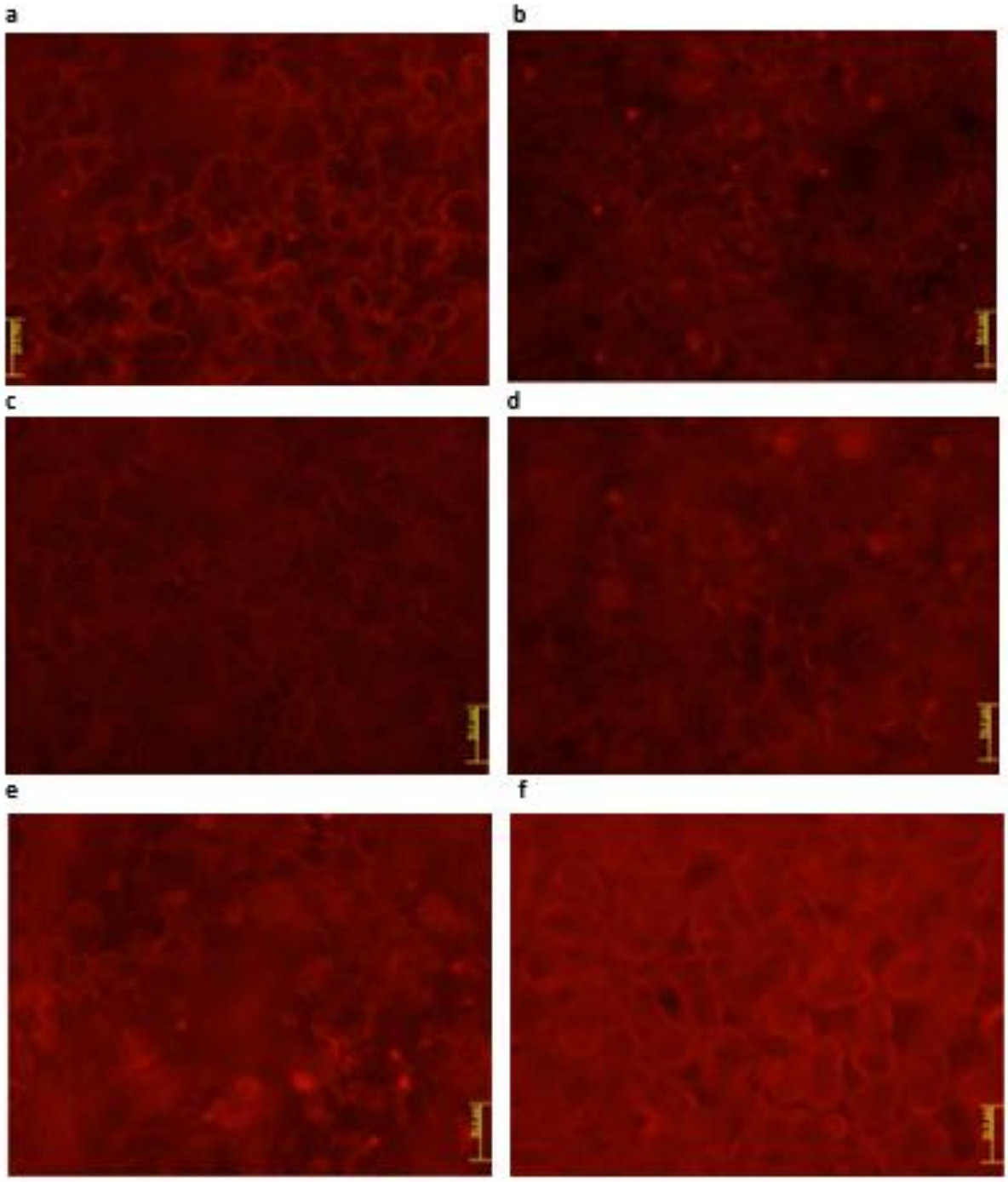
Zhang Q, Wang M, Hu J, Wang W, Fu X, Liu JH (2015) PtrABF of *Poncirus trifoliata* functions in dehydration tolerance by reducing stomatal density and maintaining reactive oxygen species homeostasis. Journal of Experimental Botany 66(19): 5911-5927.

Zhao L, Peng B, Hernandez-Viezcas JA, Rico C, Sun Y, Peralta-Videa JR, Tang X, Niu G, Jin L, Varela-Ramirez A, Zhang J, Gardea-Torresdey JL (2012) Stress response and tolerance of *Zea mays* to CeO_2 nanoparticles: cross talk among H_2O_2, heat shock protein, and lipid peroxidation. American Chemical Society Nano 6: 9615-9622.

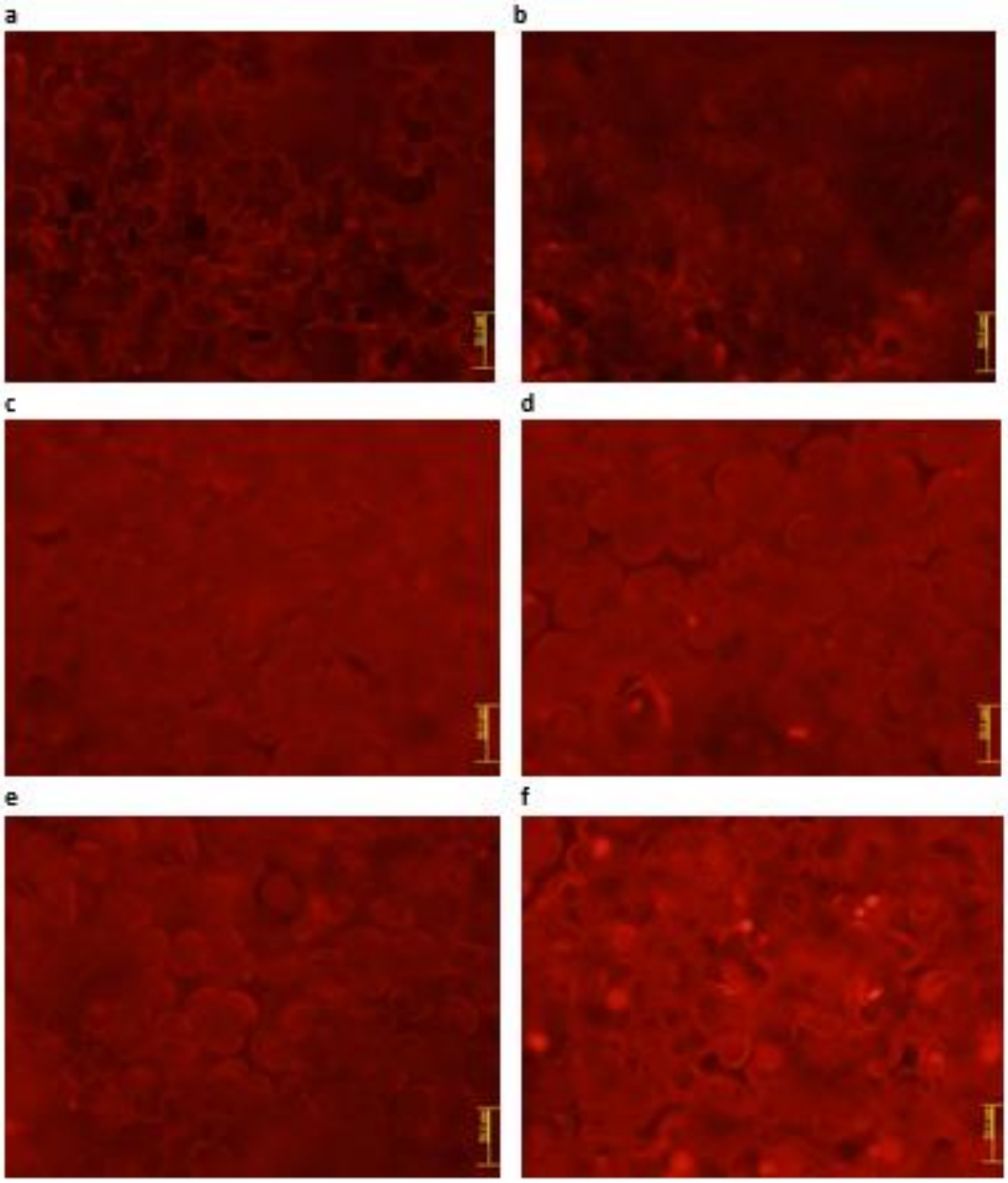
Zheng T, Zang L, Dai L, Yang C, Qu G (2017). Two novel eukaryotic translation initiation factor 5A genes from *Populus simonii* × *P. nigra* confer tolerance to abiotic stresses in Saccharomyces cerevisiae. Journal of Forest Research 28(3): 453-463.

Zivy M, de Vienne C (2000) Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology. Plant Molecular Biology 44(5): 575-580.

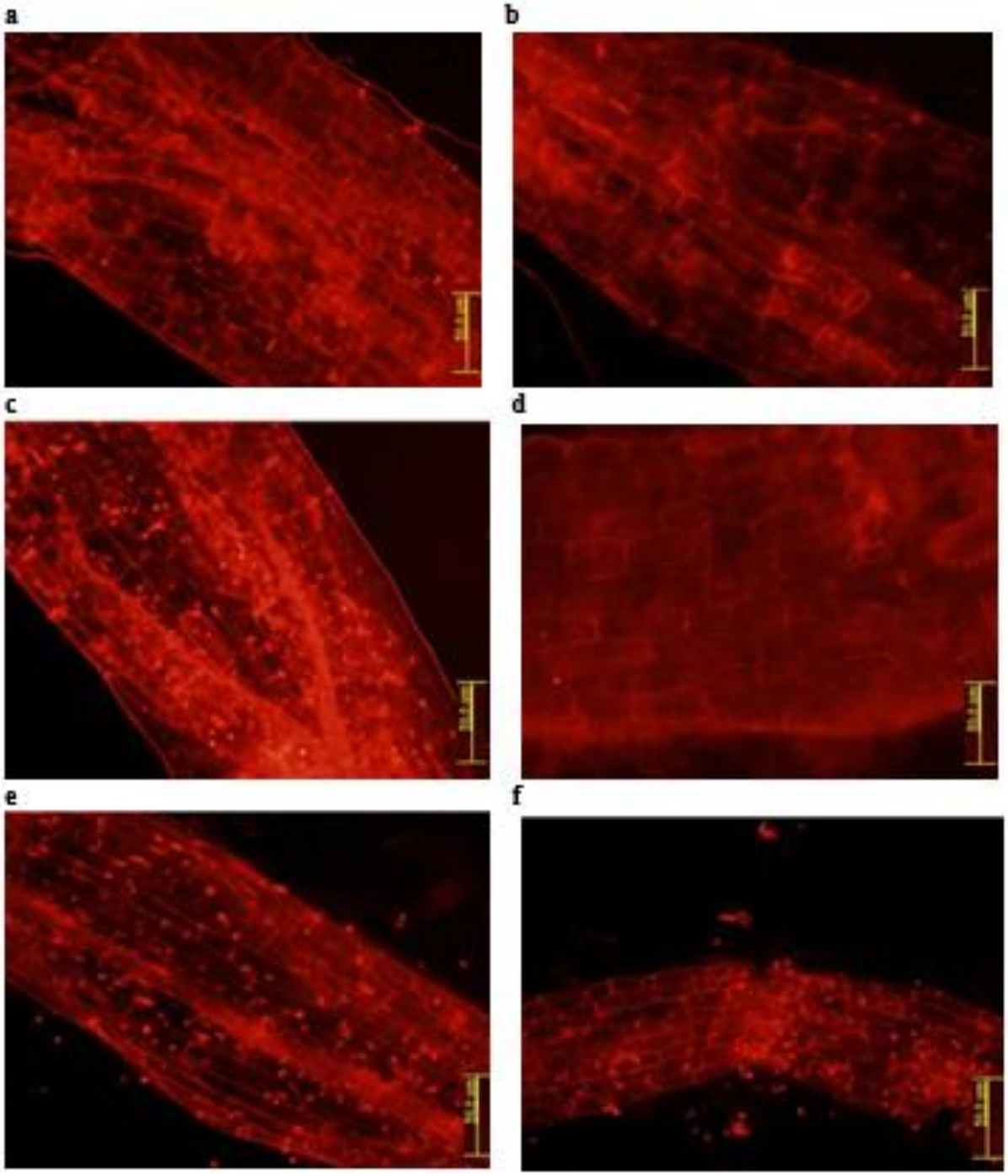
8. PRILOZI



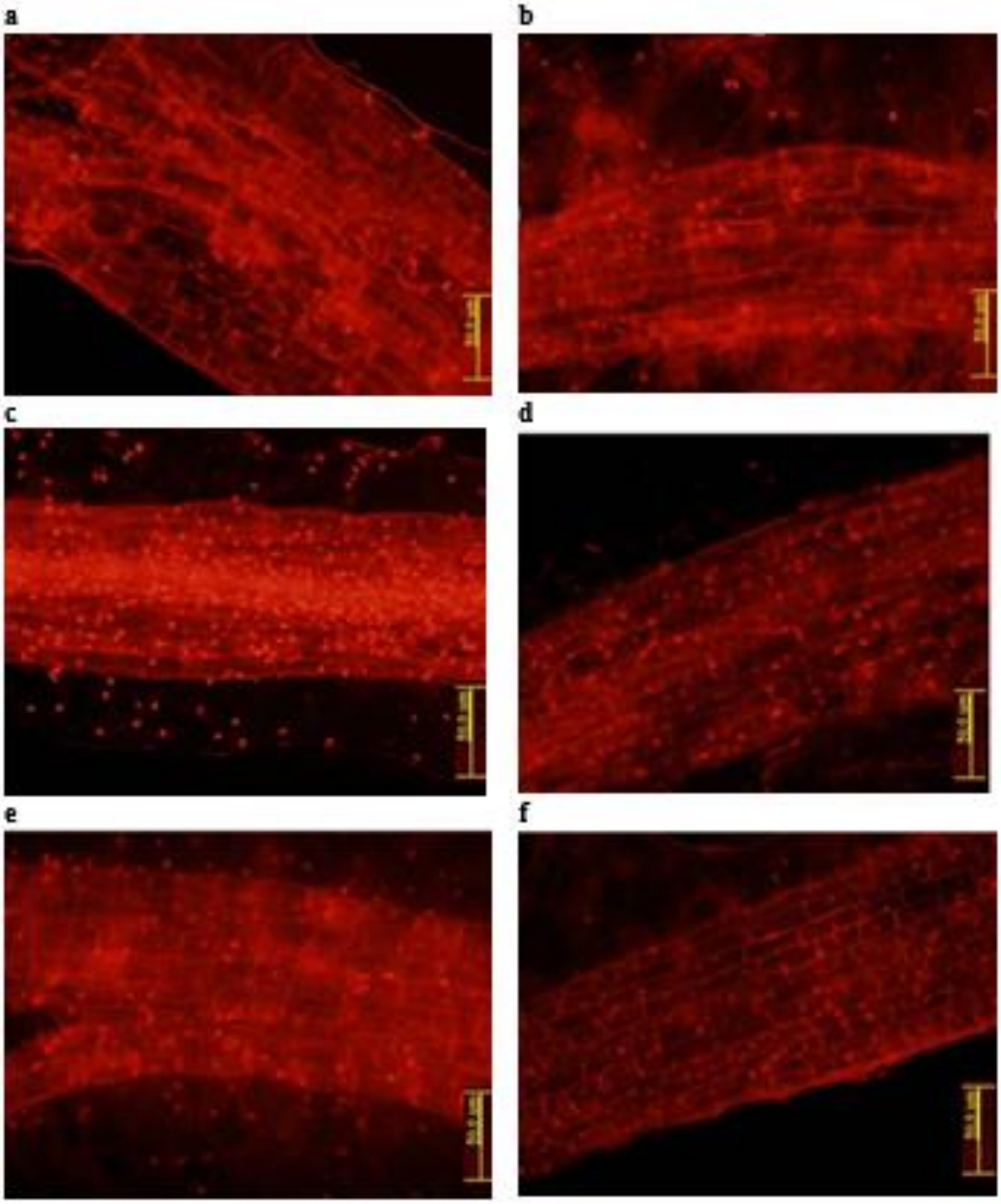
Prilog 1. Primjeri analiziranih fotografija pri određivanju sadržaja ROS u stanicama klijanaca duhana koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale AgNP**.** Fotografije su snimljene pri povećanju od 400 ×; a) kontrola, b) 25 µM, c) 50 µM, d) 75 µM, e) 100 µM, f) 500 µM. Bar = 50 µm.



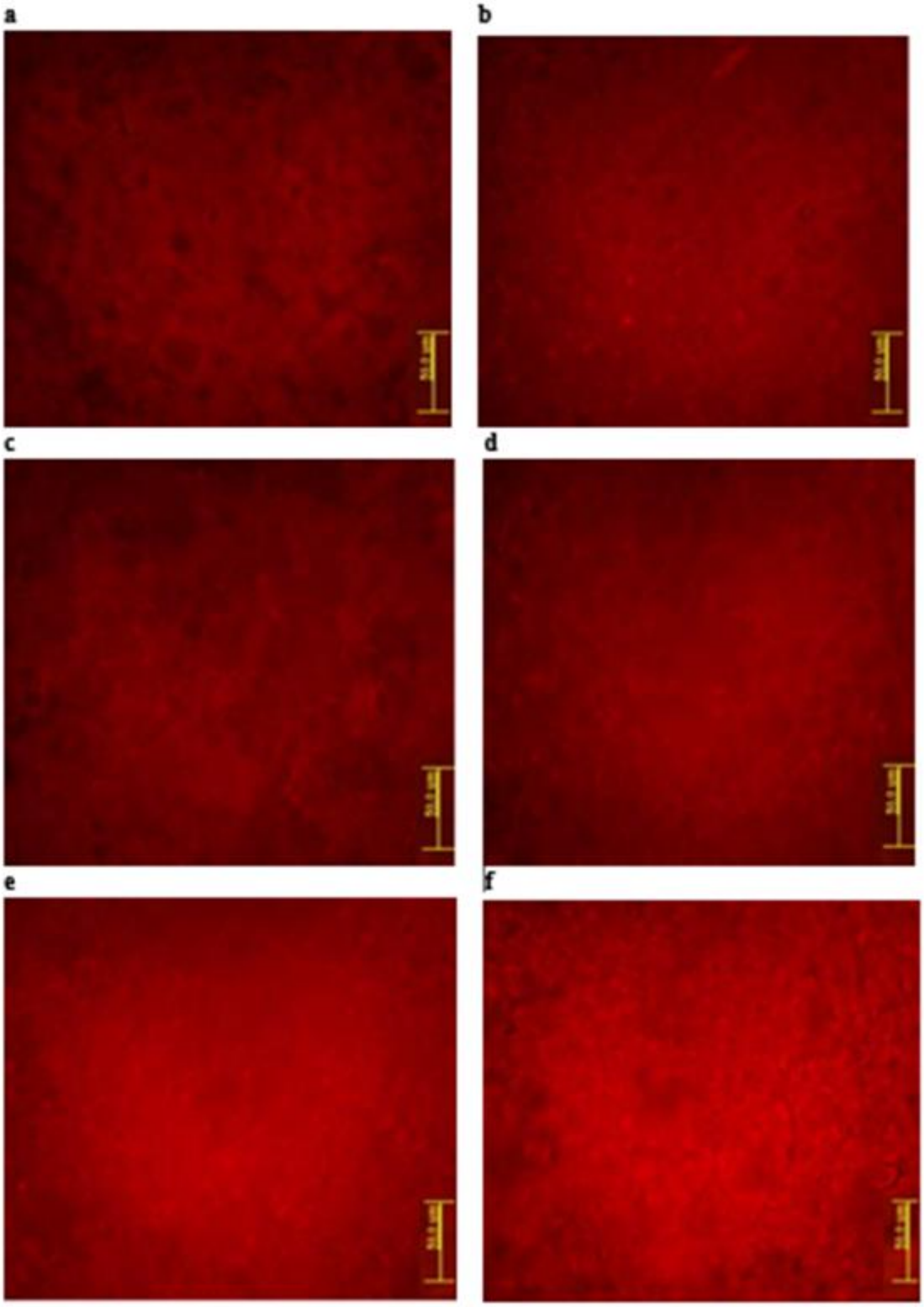
Prilog 2. Primjeri analiziranih fotografija pri određivanju sadržaja ROS u stanicama klijanaca duhana koji su 30 dana rasli na podlogama koje su sadržavale $AgNO_3$**.** Fotografije su snimljene pri povećanju od 400 ×; a) kontrola, b) 25 µM, c) 50 µM, d) 75 µM, e) 100 µM, f) 500 µM. Bar = 50 µm.



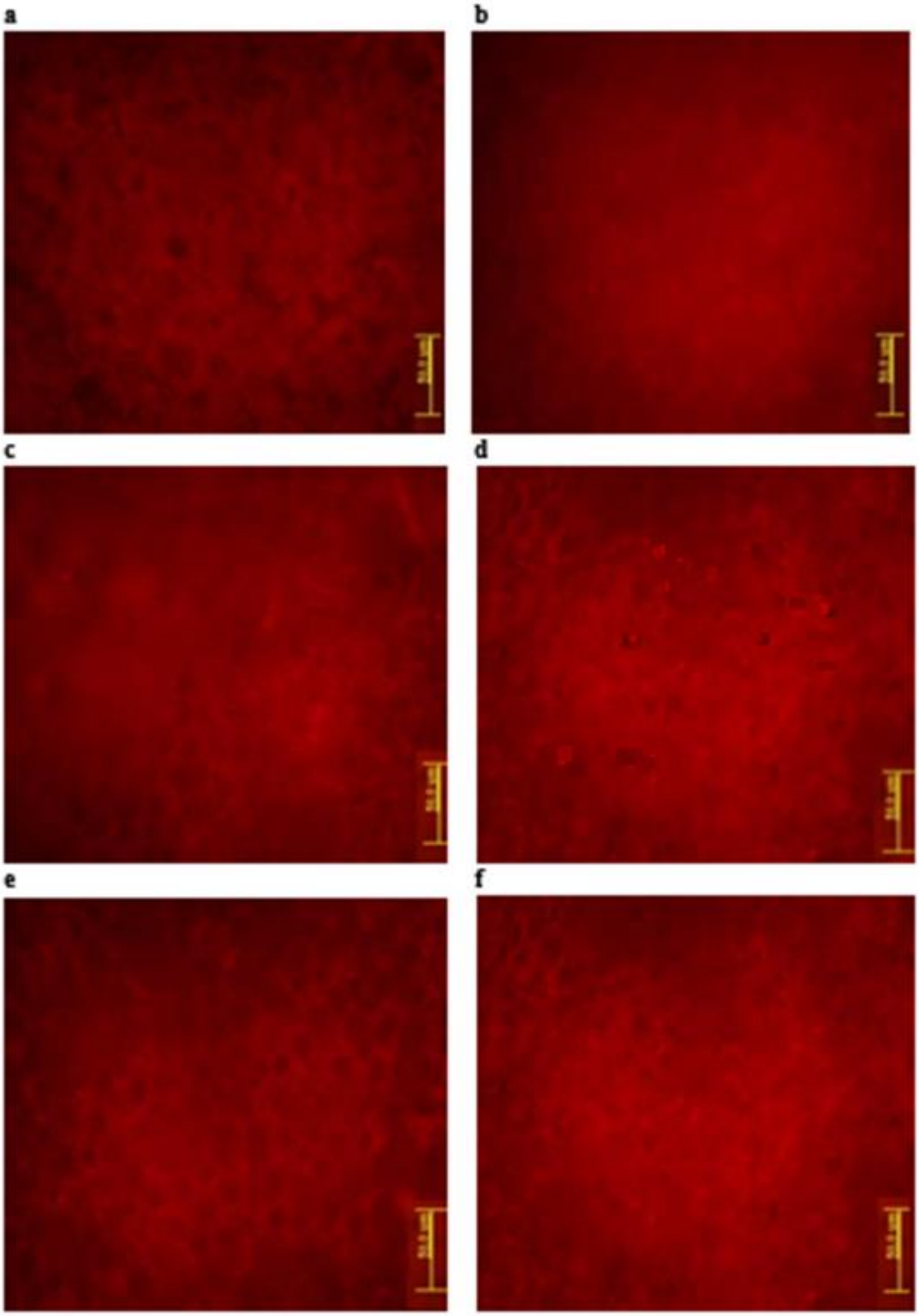
Prilog 3. Primjeri analiziranih fotografija pri određivanju sadržaja ROS u stanicama korijena odraslih biljaka duhana koje su sedam dana bile izložene tretmanima sa AgNP**.** Fotografije su snimljene pri povećanju od 400 ×; a) kontrola, b) 25 μM, c) 50 μM, d) 75 μM, e) 100 μM, f) 500 μM AgNP. Bar = 50 μm.



Prilog 4. Primjeri analiziranih fotografija pri određivanju sadržaja ROS u stanicama korijena odraslih biljaka duhana koje su sedam dana bile izložene tretmanima sa $AgNO_3$**.** Fotografije su snimljene pri povećanju od 400 ×; a) kontrola, b) 25 μM, c) 50 μM, d) 75 μM, e) 100 μM, f) 500 μM $AgNO_3$. Bar = 50 μm.



Prilog 5. Primjeri analiziranih fotografija pri određivanju sadržaja ROS u stanicama listova odraslih biljaka duhana koje su sedam dana bile izložene tretmanima sa AgNP**.** Fotografije su snimljene pri povećanju od 400 ×; a) kontrola, b) 25 μM, c) 50 μM, d) 75 μM, e) 100 μM, f) 500 μM AgNP. Bar = 50 μm.



Prilog 6. Primjeri analiziranih fotografija pri određivanju razine ROS u stanicama listova odraslih biljaka duhana koje su sedam dana bile izložene tretmanima sa $AgNO_3$**.** Fotografije su snimljene pri povećanju od 400 ×; a) kontrola, b) 25 µM, c) 50 µM, d) 75 µM, e) 100 µM, f) 500 µM $AgNO_3$. Bar = 50 µm.

Prilog 7. Proteini klijanaca duhana identificirani spektrometrijom masa MALDI TOF/TOF MS/MS**.** Navedeni su nazivi i pristupni brojevi proteina prema bazi *NCBIprot* koji su identificirani uz najveći *score*, biljna vrsta iz koje potječu te molekularna masa i pI navedeni u bazi podataka *UniProt*. U slučaju kada nije identificiran protein iz vrste *Nicotiana tabacum*, naveden je homologni protein iz ove vrste, pronađen pomoću alata BLASTp. Biološki procesi i stanični odjeljci u kojima protein sudjeluje navedeni su prema bazi podataka *UniProt*, a proteini su svrstani u odgovarajuće funkcionalne kategorije. Razlikovna ekspresija izražena je u usporedbi s kontrolom, ukoliko je postotak volumena mrlje barem 1,5 × veći (↑) ili manji (↓) nego u kontroli te ako je podjednak (=). Kratica: n.p. - nije pronađen.

BROJ NA GELU	**NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)**	**VRSTA**	**SCORE**	**MASA PROTEINA (Da)**	**pI**	**BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)**	**BIOLOŠKI PROCESI**	**STANIČNI ODJELJAK**	**FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA**	**RAZLIKOVNA EKSPRESIJA**
5	CF1 epsilon podjedinica ATP sintaze (plastid), GI:11465963, NP_054505.1	*Nicotiana tabacum*	78	14607	5,18	-	Sinteza ATP-a	Plastid	Energija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
6	CF1 epsilon podjedinica ATP sintaze (plastid), GI:11465963, NP_054505.1	*Nicotiana tabacum*	273	14607	5,18	-	Sinteza ATP-a	Plastid	Energija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum,* NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
9	Ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/ oksigenaza velika podjedinica (kloroplast), GI:429345898, AFZ84631.1	*Nervilia plicata*	102	18528	6,80	Ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/ oksigenaza velika podjedinica, ADT92065,1	Fotosinteza Fotorespiracija	Plastid	Energija	AgNP = $AgNO_3$ ↑
14	Ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/ oksigenaza velika podjedinica, parcijalna (kloroplast), GI:379647169, AFD04556.1	*Jatropha capensis*	203	29760	6,35	Ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/ oksigenaza velika podjedinica, NP_054507.1	Fotosinteza Fotorespiracija	Plastid	Energija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum,* NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
15	PSI-E1=14.4 kDa psaE produkt fotosustava I (N-terminalno, parcijalni kloroplastni peptid), GI:544741, AAB29519	*Nicotiana tabacum*	124	n. p.	n.p.	-	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP = $AgNO_3$ ↓
16	PSI-E podjedinica fotosustava I, GI:1217601, BAA07667.1	*Nicotiana sylvestris*	373	15224	9,74	*Predviđen:* IV B Kloroplastna podjedinica reakcijskog centra fotosustava I, XP_016496470.1	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP = $AgNO_3$ ↓

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum,* NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
17	PsbQ, GI:62898519, BAD97359.1	*Nicotiana tabacum*	438	24157	9,50	-	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP ↑ $AgNO_3$ =
18	PsbQ, GI:62898519, BAD97359.1	*Nicotiana tabacum*	438	24157	9,50	-	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↑
19	PsbQ, GI:62898519, BAD97359.1	*Nicotiana tabacum*	438	24157	9,50	-	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum,* NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
20	PSI-D1 prekursor, GI:407769, BAA02871.1	*Nicotiana sylvestris*	145	23456	9,84	*Predviđen:* Podjedinica II reakcijskog centra fotosustava I, slična kloroplastnoj, XP_016455922.1	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
21	23-kDa polipeptid OEC kompleksa fotosustava II, GI:1345550, CAA44292.1	*Nicotiana tabacum*	108	28378	7,63	-	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP = $AgNO_3$ ↑
22	23 kDa polipeptid WOC kompleksa fotosustava II, GI:1345550, CAA44292.1	*Nicotiana tabacum*	244	28378	7,63	-	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum,* NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
23	23 kDa polipeptid WOC kompleksa fotosustava II, GI:19898, CAA41712	*Nicotiana tabacum*	302	28652	6,84	-	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP = $AgNO_3$ ↑
24	23 kDa polipeptid WOC kompleksa fotosustava II, GI:396261, CAA45700	*Nicotiana tabacum*	124	21971	5,28	-	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
29	33 kDa polipeptid kompleksa OEC fotosustava II, GI:30013657, AAP03871.1	*Nicotiana tabacum*	244	35199	5,60	-	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum,* NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
34	Izoforma slična citosolnoj trioza fosfat izomerazi, GI:77745458, ABB02628.1	*Solanum tuberosum*	221	27012	5,73	Trioza fosfat izomeraza, slična citosolnoj, NP_001312678.1	Metabolizam ugljikohidrata (glikoliza)	Citoplazma	Energija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
35	Predviđeni protein, parcijalni, GI:224124194, XP_002330128.1	*Populus trichocarpa*	87	30546	8,31	*Predviđen:* Kloroplastna ribuloza-fosfat 3-epimeraza, XP_016514719.1	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
45	Ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/ oksigenaza velika podjedinica, GI:11465965, NP_054507.1	*Nicotiana tabacum*	421	52898	6,41	-	Fotosinteza Fotorespiracija	Plastid	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum,* NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
46	CF1 beta podjedinica ATP sintaze, GI:81238327, NP_054506.2	*Nicotiana tabacum*	603	53554	5,00	-	Sinteza ATP-a	Plastid	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↑
47	CF1 beta podjedinica ATP sintaze, GI:108773137	*Solanum tuberosum*	426	53508	5,35	CF1 beta podjedinica ATP sintaze, GI:81238327, NP_054506.2	Sinteza ATP-a	Plastid	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↑
57	Kloroplastni prekursor feredoksin-$NADP^+$ reduktaze, GI:6899972, CAB71293.1	*Capsicum annuum*	318	40407	8,55	*Predviđen*: Kloroplastna feredoksin-$NADP^+$ reduktaza, izoenzim lista, XP_016433650.1	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
58	Kloroplastni prekursor feredoksin-$NADP^+$ reduktaze, GI:6899972, CAB71293.1	*Capsicum annuum*	121	40407	8,55	*Predviđen*: Kloroplastna feredoksin-$NADP^+$ reduktaza, izoenzim lista, XP_016433650.1	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
59	Ribuloza bifosfat karboksilaza/ oksigenaza aktivaza 2 (kloroplast), GI:377648386, AFB70996.1	*Nicotiana attenuata*	369	48283	7,58	Kloroplastna ribuloza bifosfat karboksilaza/ oksigenaza aktivaza 2, NP_001312578.1	Aktivacija enzima Rubisco	Plastid	Energija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
64	Ribuloza bifosfat karboksilaza/ oksigenaza aktivaza 2 (kloroplast), GI:377648386, AFB70996.1	*Nicotiana attenuata*	189	48283	7,58	Kloroplastna ribuloza bifosfat karboksilaza/ oksigenaza aktivaza 2, NP_001312578.1	Aktivacija enzima Rubisco	Plastid	Energija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum,* NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
60	*Predviđen:* Feredoksin-$NADP^+$ reduktaza, izoenzim lista, slična kloroplastnoj, GI:565347451, XP_006340740.1	*Solanum tuberosum*	315	40457	8,37	*Predviđen:* Kloroplastna feredoksin-$NADP^+$ reduktaza, izoenzim lista, XP_016433650.1	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP = $AgNO_3$ ↑
61	*Vjerojatan:* Mitohondrijska NAD-ovisna malat dehidrogenaza, GI:21388544, CAD33240.1	*Solanum tuberosum*	313	36195	8,87	*Predviđen:* Mitohondrijska malat dehidrogenaza, XP_016468597.1	Metabolizam ugljikohidrata (Krebsov ciklus)	Mitohondrij	Energija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
7	Eukariotski elongacijski faktor 5A-1 izoforma 1, GI:590699637, XP_007045975.1	*Theobroma cacao*	106	17470	5,60	*Predviđen:* Eukariotski translacijski elongacijski inicijacijski faktor 5A-2, XP_016504267.1	Regulacija sinteze proteina	Citoplazma	Sinteza i procesiranje proteina	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
8	Eukariotski elongacijski faktor 5A-3, GI:568214900 NP_001275165.1	*Solanum tuberosum*	75	17537	5,78	*Predviđen:* Eukariotski elongacijski faktor 5A-3, XP_016465249.1	Regulacija sinteze proteina	Citoplazma	Sinteza i procesiranje proteina	AgNP = $AgNO_3$ ↑
10	Hipotetski protein PHAVU_008G08 2900g, GI:561013217, ESW12078.1	*Phaseolus vulgaris*	76	25840	8,53	*Predviđen*: Sličan elongacijskom faktoru P, XP_016510296,1	Regulacija sinteze proteina	Citoplazma	Sinteza i procesiranje proteina	AgNP = $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum,* NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
11	Ciklofilin, GI:583830761, AHI54562.1	*Camellia japonica*	142	28057	9,45	*Predviđen:* Peptidil-prolil cis-trans isomeraza, XP_016481087.1	Smatanje proteina	Citoplazma	Sinteza i procesiranje proteina	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
13	Ciklofilin, GI:583830761, AHI54562.1	*Camellia japonica*	175	28057	9,45	*Predviđen:* Peptidil-prolil cis-trans isomeraza, XP_016481087.1	Smatanje proteina	Citoplazma	Sinteza i procesiranje proteina	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
28	Prekursor šaperonina 21, GI:350534934, NP_001234423	*Solanum lycopersicum*	156	26562	6,85	20 kDa šaperonin, kloroplastni, NP_001313184.1	Smatanje proteina	Plastid	Sinteza i procesiranje proteina	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum,* NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
48	Beta šaperonin 60, GI:110349923, CAJ19275.1	*Solanum commersonii*	245	63086	6,89	*Predviđen:* Kloroplastna beta 2 podjedinica šaperona 60, XP_016490465.1	Smatanje proteina	Plastid	Sinteza i procesiranje proteina	AgNP = $AgNO_3$ ↑
51	Alfa podjedinica šaperonina 60, GI:163311868, ABY26947.1	*Capsicum annum*	145	61898	5,37	Podjedinica beta 2 šaperonina 60, nalik kloroplastnoj, XP_016476096.1	Smatanje proteina	Plastid	Sinteza i procesiranje proteina	AgNP = $AgNO_3$ ↑
54	Kalretikulin, GI:197717740, ACH72686.1	*Nicotiana tabacum*	112	47442	4,44	-	Smatanje proteina	Endoplaz-matski retikulum	Sinteza i procesiranje proteina	AgNP = $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum,* NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
56	*Vjerojatan:* Peptidil-prolil cis-trans izomeraza, GI:255552604, XP_002517345.1	*Ricinus communis*	91	51180	4,97	*Predviđen:* Kloroplastna peptidil-prolil cis-trans izomeraza CYP38, XP_016463793.1	Smatanje proteina	Plastid	Sinteza i procesiranje proteina	AgNP = $AgNO_3$ ↑
1	Nukleozidna difosfat kinaza 1 GI:297809115, XP_002872441.1	*Arabidopsis lyrata subsp. lyrata*	121	16434	6,30	*Predviđen*: Nukleozidna difosfat kinaza 1 XP_016467992.1	Metabolizam nukleotida	Citoplazma	Metabolizam	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
36	Beta ugljična anhidraza, GI:22550386, AAL51055.2	*Nicotiana tabacum*	137	34452	6,19	-	Metabolizam ugljikohidrata (iskorištenje ugljika)	Plastid	Metabolizam	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum,* NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
37	Beta ugljična anhidraza, GI:22550386, AAL51055.2	*Nicotiana tabacum*	141	34452	6,19	-	Metabolizam ugljikohidrata (iskorištenje ugljika)	Plastid	Metabolizam	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
38	Beta ugljična anhidraza, GI:22550386, AAL51055.2	*Nicotiana tabacum*	194	34452	6,19	-	Metabolizam ugljikohidrata (iskorištenje ugljika)	Plastid	Metabolizam	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
39	Beta ugljična anhidraza, GI:22550386, AAL51055.2	*Nicotiana tabacum*	122	34452	6,19	-	Metabolizam ugljikohidrata (iskorištenje ugljika)	Plastid	Metabolizam	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum,* NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
43	*Predviđen*: Aminometil transferaza, slična mitohondrijskoj, GI:460373793, XP_004232698.1	*Solanum lycopersicum*	234	44294	8,65	*Predviđen:* Mitohondrijska aminometiltransfe-raza, XP_016485574.1	Metabolizam ugljikohidrata (katabolički procesi glicina)	Mitohondrij	Metabolizam	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
44	Mitohondrijska aminometiltrans-feraza, GI:568214427, NP_001275291.1	*Solanum tuberosum*	289	44277	8,77	*Predviđen:* Mitohondrijska aminometiltransfe-raza, XP_016485574.1	Metabolizam ugljikohidrata (katabolički procesi glicina)	Mitohondrij	Metabolizam	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
25	Kisela hitinaza PR-P, GI:19771, CAA35790.1	*Nicotiana tabacum*	102	27469	4,89	-	Metabolizam ugljikohidrata (katabolički procesi polisaharida)	Stanična stijenka	Odgovor na abiotički i biotički stres	AgNP = $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
40	Bazična beta-1,3-glukanaza, GI:194719371, ACF93731.1	*Nicotiana tabacum*	313	40391	7,10	-	Metabolizam ugljikohidrata (katabolički procesi polisaharida)	Stanična stijenka Plazmodez-mijia	Odgovor na abiotički i biotički stres	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
41	Bazična beta-1,3-glukanaza, GI:194719371, ACF93731.1	*Nicotiana tabacum*	313	40391	7,10	-	Metabolizam ugljikohidrata (katabolički procesi polisaharida)	Stanična stijenka Plazmodez-mijia	Odgovor na abiotički i biotički stres	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
42	Endohitinaza A, GI:256133, AAB23374.1	*Nicotiana tabacum*	167	35156	8,40	-	Metabolizam ugljikohidrata (katabolički procesi polisaharida)	Stanična stijenka	Odgovor na abiotički i biotički stres	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum,* NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
49	70 kDa protein toplinskog šoka, GI:2654208, AAB91471.1	*Spinacia oleracea*	786	76141	5,19	*Predviđen:* Kloroplastni stromalni 70 kDa protein toplinskog šoka, XP_016498345.1	Smatanje proteina Odgovor na stres	Plastid	Odgovor na abiotički i biotički stres	AgNP = $AgNO_3$ ↑
50	70 kDa protein toplinskog šoka, GI:30025966, AAP04522.1	*Nicotiana tabacum*	489	70876	5,17	-	Smatanje proteina Odgovor na stres	Citoplazma	Odgovor na abiotički i biotički stres	AgNP = $AgNO_3$ ↑
55	Ankirin ponavljajući protein HBP1, GI:13310811, AAK18619.1	*Nicotiana tabacum*	431	37317	4,45	-	Metabolizam ugljikohidrata (katabolički procesi polisaharida)	Stanična stijenka Plazmodez-mijia	Odgovor na abiotički i biotički stres	AgNP = $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum,* NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
12	*Predviđen:* protein CBSX3 domene CBS, sličan mitohondrijskom GI:565354933, XP_006344361.1	*Solanum tuberosum*	148	23018	9,46	*Predviđen:* Protein CBSX3 domene CBS, sličan mitohondrijskom, XP_016442049.1	Homeostaza staničnih redoks-reakcija	Mitohondrij	Oksidacija i detoksifikacija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
27	Željezo superoksid dismutaza, GI:573885915, AHG12637.1	*Nicotiana tabacum*	241	28338	8,60	-	Oksidacijsko-redukcijski procesi	Plastid	Oksidacija i detoksifikacija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
30	Citosolna askorbat peroksidaza, GI:1389654, BAA12918.1 Askorbat peroksidaza, GI:559005, AAA86689.1	*Nicotiana tabacum*		27450 27388	5,43 5,43	-	Oksidacijsko-redukcijski procesi	Citoplazma	Oksidacija i detoksifikacija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
31	Askorbat peroksidaza, GI:559005, AAA86689.1 Citosolna askorbat peroksidaza, GI:1389654, BAA12918.1	*Nicotiana tabacum*	429 409	27388 27450	5,43 5,43	-	Oksidacijsko-redukcijski procesi	Citoplazma	Oksidacija i detoksifikacija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum,* NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
32	Askorbat peroksidaza, GI:559005, AAA86689.1	*Nicotiana tabacum*	409	27388	5,43	-	Oksidacijsko-redukcijski procesi	Citoplazma	Oksidacija i detoksifikacija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
52	*Predviđen:* Protein sličan disulfid izomerazi, GI:565354274, XP_006344041.1	*Solanum tuberosum*	127	54897	4,81	*Predviđen:* Protein sličan disulfid izomerazi, XP_016515375.1	Homeostaza staničnih redoks-reakcija	Endoplaz-matski retukulum	Oksidacija i detoksifikacija	AgNP = $AgNO_3$ ↑
3	Glicinom bogat RNA-vezujući protein, GI:187373099, ACD03270.1	*Nicotiana tabacum*	571	15626	5,23	-	Vezanje nukleinskih kiselina i alternativni splicing molekule RNA	Citoplazma	Procesiranje molekule RNA	AgNP = $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum,* NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
4	Glicinom bogat RNA-vezujući protein, GI:187373099, ACD03270.1	*Nicotiana sylvestris*	142	15652	5,23	-	Vezanje nukleinskih kiselina i alternativni splicing molekule RNA	Citoplazma	Procesiranje molekule RNA	AgNP = $AgNO_3$ ↑
62	Parcijalni prekursor mRNA-vezujućeg proteina, GI:32746733, AAP87140.1	*Nicotiana tabacum*	184	44245	6,51	-	Vezanje molekule mRNA	Plastid	Procesiranje molekule RNA	AgNP = $AgNO_3$ ↑
63	Prekursor mRNA-vezujućeg proteina, parcijalan, GI:32746733, AAP87140.1	*Nicotiana tabacum*	75	44245	6,51	-	Vezanje molekule mRNA	Plastid	Procesiranje molekule RNA	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum,* NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
2	Kalmodulin-2, GI:297822305, XP_002879035	*Arabidopsis lyrata subsp. lyrata*	230	20680	4,69	*Predviđen:* Izoforma X1 protein sličnog kalmodulinu-7, XP_016455012.1 *Predviđen:* Izoforma X2, protein sličan kalmodulinu-7, XP_016455013.1	Regulacija aktivnosti proteina vezanjem iona Ca^{2+}	Stanična membrana Tonoplast	Stanične signalne kaskade	AgNP = $AgNO_3$ ↑
26	Kompleks polipetida u nastajanju alfa lanca, GI:1658271, AAB18266.1	*Nicotiana tabacum*	84	4241	5,0	-	n. p.	n. p.	n.p.	AgNP = $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
33	Hipotetski protein CICLE_v10012166mg, GI:567873045, XP_006429112.1	*Citrus clementina*	155	36007	9,43	*Predviđen:* Neidentificirani protein sličan At5g02240, XP_016434705.1	n.p.	n.p.	n.p.	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
53	*Predviđen:* Neidentificirani protein sličan At5g39570, GI:565342585, XP_006338424.1	*Solanum tuberosum*	172	40988	4,66	*Predviđen:* Neidentificirani protein sličan At5g39570, XP_016449031.1	n. p.	n. p.	n. p.	AgNP = $AgNO_3$ ↑
n.i.-1	Nije identificiran	-	-	-	-	-	-	-	-	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum,* NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
n.i.-2	Nije identificiran	-	-	-	-	-	-	-	-	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓

Prilog 8. Proteini korijena duhana identificirani spektrometrijom masa MALDI TOF/TOF MS/MS**.** Navedeni su nazivi i pristupni brojevi proteina prema bazi *NCBIprot* koji su identificirani uz najveći *score*, biljna vrsta iz koje potječu te molekularna masa i pI navedeni u bazi podataka *UniProt*. U slučaju kad nije identificiran protein iz vrste *Nicotiana tabacum*, naveden je homologni protein iz ove vrste, pronađen pomoću alata BLASTp. Biološki procesi i stanični odjeljci u kojima protein sudjeluje navedeni su prema bazi podataka *UniProt*, a proteini su svrstani u odgovarajuće funkcionalne kategorije. Razlikovna ekspresija izražena je u usporedbi s kontrolom, ukoliko je postotak volumena mrlje barem 1,5 × veći (↑) ili manji (↓) nego u kontroli te ako je podjednak (=). Kratica: n.p. – nije pronađen.

BROJ NA GELU	**NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)**	**VRSTA**	**SCORE**	**MASA PROTEINA (Da)**	**pI**	**BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)**	**BIOLOŠKI PROCESI**	**STANIČNI ODJELJAK**	**FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA**	**RAZLIKOVNA EKSPRESIJA**
1	Prekursor protugljivičnog proteina CBP20 induciranog patogenima i ranjavanjem, GI:7547630, AAB29959.2	*Nicotiana tabacum*	75	22168	8,39	-	Obrana od gljivica i bakterija	Citoplazma	Odgovor na biotički i abiotički stres	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
2	Osmotin, GI:256135, AAB23375.1	*Nicotiana tabacum*	111	26681	8,13	-	Odgovor na stres	Vakuola	Odgovor na biotički i abiotički stres	AgNP ↓ $AgNO_3$ =

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
9	Aneksin povezan s vakuolom (VCaB42), GI:4580920, AAD24540.1	*Nicotiana tabacum*	81	35938	5,34	-	Odgovor na stres	Stanična membrana Tonoplast	Odgovor na biotički i abiotički stres	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
10	Aneksin, GI:2467255, CAA75214.1	*Nicotiana tabacum*	201	35950	5,38	-	Odgovor na stres	Stanična membrana	Odgovor na biotički i abiotički stres	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
15	Mogući prekursor receptora *Rhicadhesin*, GI:255582405, XP_002531991.1	*Ricinus communis*	129	21177	8,74	Potporodica 1 proteina *germin-like*, XP_016470784.1	Rast i razvoj biljaka Odgovor na stres	Izvanstanični prostor	Odgovor na biotički i abiotički stres	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
18	Mogući prekursor receptora *Rhicadhesin*, GI:255582405, XP_002531991.1	*Ricinus communis*	129	21177	8,74	Potporodica 1 proteina *germin-like*, XP_016470784.1	Rast i razvoj biljaka Odgovor na stres	Izvanstanični prostor	Odgovor na biotički i abiotički stres	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
24	Bazična beta-1,3-glukanaza, GI:194719371, ACF93731.1	*Nicotiana tabacum*	103	40391	7,10	-	Metabolizam ugljikohidrata (katabolički procesi polisaharida)	Stanična stijenka Plazmodez-mija	Odgovor na biotički i abiotički stres	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
31	Protein 1B povezan sa patogenezom, GI:357446179, XP_003593367.1	*Medicago truncatula*	80	Nema podataka	Nema podataka	Protein 1B povezan sa patogenezom, XP_016442988.1	Obrana od gljivica i bakterija	Izvanstanični prostor	Odgovor na biotički i abiotički stres	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
32	Prekursor protugljivičnog proteina CBP20 koji je induciran patogenima i ranjavanjem, GI:7547630, AAB29959.2	*Nicotiana tabacum*	80	22168	8,39	-	Obrana od gljivica i bakterija	Citoplazma	Odgovor na biotički i abiotički	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
8	Željezo superoksid dismutaza, GI:573885915, AHG12637.1	*Nicotiana tabacum*	85	28338	8,60	-	Oksidacijsko-redukcijski procesi	Plastid	Oksidacija i detoksifikacija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
12	*Predviđen:* Sličan anionskoj peroksidazi 2 povezanoj sa suberinizacijom, GI:565352690, XP_006343273.1	*Solanum tuberosum*	89	36319	6,32	*Predviđen:* Peroksidaza, XP_016472675.1	Oksidacijsko-redukcijski procesi	Izvanstanični prostor	Oksidacija i detoksifikacija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
16	Mangan superoksid dismutaza, GI:17227134, AAL38023.1	*Nicotiana tabacum*	78	10723	6,76	-	Odgovor na stres	Mitohondrij Peroksisomi	Oksidacija i detoksifikacija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
25	Monodehidro-askorbat reduktaza, GI:113472842, ABI35909.1	*Rheum australe*	87	47325	5,63	*Predviđen*: Monodehidro-askorbat reduktaza, XP_016455903.1	Oksidacijsko-redukcijski proces	Mitohondrij Citoplazma Plastid Peroksisom	Oksidacija i detoksifikacija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
28	Katalaza koja veže salicilnu kiselinu, parcijalna GI:436478, AAC48918.1	*Nicotiana tabacum*	198	56824	6,60	-	Odgovor na stres	Peroksisom	Oksidacija i detoksifikacija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
29	Monodehidro-askorbat reduktaza, GI:548578462, AGX01486.1	*Nicotiana tabacum*	326	52056	8,09	-	Odgovor na stres	Mitohondrij Citoplazma Plastid Peroksisom	Oksidacija i detoksifikacija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
11	*Vjerojatan:* Mitohondrijska malat dehidrogenaza, GI:48375044, AAT42189.1	*Nicotiana tabacum*	199	22037	7,64	-	Metabolizam ugljikohidrata (Krebsov ciklus)	Mitohondrij	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
13	*Predviđen:* Moguća 24 kDa podjedinica ATP sintaze, mitohondrijska, GI:460415839, XP_004253261.1	*Solanum lycopersicum*	136	27713	8,69	*Predviđen:* Moguća 24 kDa podjedinica ATP sintaze, mitohondrijska, XP_016487066.1	Sinteza ATP-a	Mitohondrij	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
17	Izoforma slična citosolnoj trioza fosfat izomerazi, GI:77745458, ABB02628.1	*Solanum tuberosum*	199	27012	5,73	Trioza fosfat izomeraza, slična citosolnoj, NP_001312678.1	Metabolizam ugljikohidrata (glikoliza)	Citoplazma	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
20	Gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, GI:157042763, ABV02033.1	*Nicotiana langsdorffii x Nicotiana sanderae*	171	37021	6,62	*Predviđen:* Gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, citosolna, XP_016498743.1	Metabolizam ugljikohidrata (glikoliza)	Citoplazma	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
21	*Vjerojatan:* Mitohondrijska malat dehidrogenaza, GI:48375044, AAT42189.1	*Nicotiana tabacum*	180	22037	7,64	-	Metabolizam ugljikohidrata (Krebsov ciklus)	Mitohondrij	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
19	Glutamat dehidrogenaza, GI:20873461, CAD12373.1	*Nicotiana tabacum*	122	44588	6,57	-	Metabolizam aminokiselina	Mitohondrij	Metabolizam	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
27	*Predviđen:* Sličan lizosomalnoj alfa-manozidazi, GI:565399766, XP_006365417.1	Solanum tuberosum	179	116406	6,43	*Predviđen*: Slična alfa-manozidazi, XP_016465882.1	Glikozilacija proteina Metabolizam ugljikohidrata (metabolizam manoze)	Vakuola	Metabolizam	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
14	*Vjerojatan:* Prekursor receptora *Rhicadhesin*, GI:255582405, XP_002531991.1	*Ricinus communis*	129	21177	8,74	Potporodica 1 proteina *germin-like*, XP_016470784.1	Odgovor na stres	Izvanstanični prostor	Skladištenje hranjivih tvari	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
6	Nukleozidna difosfat kinaza, GI:350535074, NP_001234174.1	*Solanum lycopersicum*	201	16252	6,30	*Predviđen:* Nukleozidna difosfat kinaza, XP_016467992.1	Metabolizam nukleotida	Mitohondrij	Sinteza i procesiranje proteina	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↑
30	Protein CHUP1, GI:357488243, XP_003614409.1	*Medicago truncatula*	75	111254	5,34	Protein CHUP1, sličan kloroplastnom, XP_016454270.1	Organizacija kloroplasta	Plastid	Stanične signalne kaskade	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
3	Nije identificiran	-	-	-	-	-	-	-	-	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
4	Nije identificiran	-	'	'	'	-	-	-	-	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
5	Nije identificiran	-	'	'	'	-	-	-	-	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
7	Nije identificiran	-	'	'	'	-	-	-	-	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
26	Nije identificiran	-	'	'	'	-	-	-	-	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
33	Nije identificiran	-	-	-	-	-	-	-	-	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
22	*Predviđen:* Sličan proteinu A vanjske membrane, GI:449470698, XP_004153053.1	*Cucumis sativus*	247	Nema jasnih podataka	Nema jasnih podataka	-	n.p.	n.p.	n.p.	AgNP ↑ $AgNO_3$ =
23	*Predviđen:* Sličan proteinu A vanjske membrane, GI:449470698, XP_004153053.1	*Cucumis sativus*	131	Nema jasnih podataka	Nema jasnih podataka	-	n.p.	n.p.	n.p.	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑

Prilog 9. Proteini lista duhana identificirani spektrometrijom masa MALDI TOF/TOF MS/MS**.** Navedeni su nazivi i pristupni brojevi proteina prema bazi *NCBIprot* koji su identificirani uz najveći *score*, biljna vrsta iz koje potječu te molekularna masa i pI navedeni u bazi podataka *UniProt*. U slučaju kada nije identificiran protein iz vrste *Nicotiana tabacum*, naveden je homologni protein iz ove vrste, pronađen pomoću alata BLASTp. Biološki procesi i stanični odjeljci u kojima protein sudjeluje navedeni su prema bazi podataka *UniProt*, a proteini su svrstani u odgovarajuće funkcionalne kategorije. Razlikovna ekspresija izražena je u usporedbi s kontrolom, ukoliko je postotak volumena mrlje barem 1,5 × veći (↑) ili manji (↓) nego u kontroli te ako je podjednak (=). Kratica: n.p. – nije pronađen.

BROJ NA GELU	**NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)**	**VRSTA**	**SCORE**	**MASA PROTEINA (Da)**	**pI**	**BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)**	**BIOLOŠKI PROCESI**	**STANIČNI ODJELJAK**	**FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA**	**RAZLIKOVNA EKSPRESIJA**
1	11 kDa protein fotosustava II, GI:226491700, NP_001147626.1	*Zea mays*	114	17359	9,98	*Predviđen:* Protein za popravak fotosustava II, PSB27-H1, XP_016514812.1	Sklapanje fotosustava II	Plastid	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
3	CF1 epsilon podjedinica ATP sintaze, GI:11465963, NP_054505.1	*Nicotiana tabacum*	103	14607	5,18	-	Sinteza ATP-a	Plastid	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
6	Ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/ oksigenaza velika podjedinica, parcijalna (kloroplast), GI:145568107, ABP82410.1	*Ulva pertusa*	75	43780	6,18	Ribuloza-1,5-bifosfat karboksilaza/ oksigenaza velika podjedinica, NP_054507.1	Fotosinteza Fotorespiracija	Plastid	Energija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
7	PSI-E1=14.4 kDa psaE produkt fotosustava I (N-terminalni, parcijalni kloroplastni peptid), GI:544741, AAB29519	*Nicotiana tabacum*	124	n.p.	n.p.	-	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
8	PSI-E podjedinica fotosustava I, GI:1217601, BAA07667.1	*Nicotiana sylvestris*	130	15224	9,74	*Predviđen:* IV B podjedinica IVB reakcijskog centra fotosustava I, kloroplastna, XP_016496470.1	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
9	Podjedinica II reakcijskog centra fotosustava I, kloroplastna, GI: 474150013, EMS56878.1	*Triticum urartu*	130	17704	9,77	*Predviđen:* podjedinica II reakcijskog centra fotosustava I, slična kloroplastnoj, XP_016505719.1	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
10	PSI-D1 prekursor, GI:407769, BAA02871.1	*Nicotiana sylvestris*	145	23456	9,84	*Predviđen:* Podjedinica II reakcijskog centra fotosustava I, slična kloroplastnoj, XP_016455922.1	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ =

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
13	23-kDa polipeptid kompleksa OEC fotosustava II, GI:1345550, CAA44292.1	*Nicotiana tabacum*	325	28378	7,63	-	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
14	23-kDa polipeptid kompleksa OEC fotosustava II, GI:1345550, CAA44292.1	*Nicotiana tabacum*	306	28378	7,63	-	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
16	*Predviđen:* Klorofil a-b vezujući protein 8, sličan kloroplastnom, GI:460412884, XP_004251826.1	*Solanum lycopersicum*	75	29278	8,61	*Predviđen:* Klorofil a-b vezujući protein 8, kloroplastni, XP_016457506.1	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
17	*Predviđen:* Ribuloza-fosfat 3-epimeraza, kloroplastna, GI:565398028, XP_006364582.1	*Solanum tuberosum*	84	30343	7,72	*Predviđen:* Ribuloza-fosfat 3-epimeraza, kloroplastna, XP_016514719.1	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
18	Trioza fosfat izomeraza slična citosolnoj izoformi, GI:77745458, ABB02628.1	*Solanum tuberosum*	225	27012	5,73	Trioza fosfat izomeraza, NP_001312678.1	Metabolizam ugljikohidrata (glikoliza)	Citoplazma	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
25	*Predviđen:* Feredoksin-$NADP^+$ reduktaza, izoenzim lista, slična kloroplastnoj, GI:565347451, XP_006340740.1	*Solanum tuberosum*	247	40457	8,37	*Predviđen:* Kloroplastna feredoksin-$NADP^+$ reduktaza, izoenzim lista, XP_016433650.1	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
27	*Predviđen:* Feredoksin-NADP$^+$ reduktaza, izoenzim lista, slična kloroplastnoj, GI:565347451, XP_006340740.1	*Solanum tuberosum*	174	40457	8,37	*Predviđen:* Kloroplastna feredoksin-NADP$^+$ reduktaza, izoenzim lista, XP_016433650.1	Fotosinteza	Plastid	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
32	*Vjerojatan:* Mitohondrijska malat dehidrogenaza, djelomična GI:48375044, AAT42189.1	*Nicotiana tabacum*	199	22037	7,64	-	Metabolizam ugljikohidrata (Krebsov ciklus)	Mitohondrij	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ =

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
35	Ribuloza bisfosfat karboksilaza/ oksigenaza aktivaza 2 (kloroplast), GI:377648386, AFB70996.1	*Nicotiana attenuata*	104	48283	7,58	*Predviđen:* Ribuloza bisfosfat karboksilaza/ oksigenaza aktivaza 2 sličan kloroplastnom, NP_001312578.1	Aktivacija enzima Rubisco	Plastid	Energija	AgNP = $AgNO_3$ ↑
38	Produkt gena rbcL (kloroplast), GI:351653887, YP_004891612.1	*Nicotiana undulata*	369	52912	6,29	Ribuloza 1-5-bisfosfat karboksilaza/ oksigenaza velika podjedinica, NP_054507.1	Metabolizam ugljikohidrata (Calvinov ciklus) Fotorespiracija	Plastid	Energija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
4	Nukleozidna difosfat kinaza 1, GI:297809115, XP_002872441.1	*Arabidopsis lyrata subsp. lyrata*	121	16434	6,30	*Predviđen*: Nukleozidna difosfat kinaza 1, XP_016467992.1	Metabolizam nukleotida	Citoplazma	Metabolizam	AgNP ↓ $AgNO_3$ =

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
19	Beta ugljična anhidraza, GI:22550386, AAL51055.2	*Nicotiana tabacum*	82	34452	6,19	-	Metabolizam ugljikohidrata (iskorištavanje ugljika)	Plastid	Metabolizam	AgNP = $AgNO_3$ ↑
20	*Predviđen*: Aminometiltrans-feraza, mitohondrijska, GI:460373793, XP_004232698.1	*Solanum lycopersicum*	227	44294	8,65	*Predviđen:* Mitohondrijska aminometiltrans-feraza, XP_016485574.1	Metabolizam aminokiselina (katabolički proces glicina)	Mitohondrij	Metabolizam	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↑
23	Fruktoza-bifosfat aldolaza, GI:294440432, ADE74633.1	*Nicotiana tabacum*	276	42806	6,38	-	Metabolizam ugljikohidrata (glikoliza)	Citoplazma	Metabolizam	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
24	Fruktoza-bifosfat aldolaza, GI:4827251, BAA77604.1	*Nicotiana paniculata*	331	42574	6,92	*Predviđen:* Fruktoza-bisfosfat aldolaza 1, XP_016505617.1	Metabolizam ugljikohidrata (glikoliza)	Citoplazma	Metabolizam	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
26	Fruktoza-bifosfat aldolaza, GI:4827251, BAA77604.1	*Nicotiana paniculata*	410	42574	6,92	*Predviđen:* Fruktoza-bisfosfat aldolaza 1, XP_016505617.1	Metabolizam ugljikohidrata (glikoliza)	Citoplazma	Metabolizam	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
29	Gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, GI:157042763, ABV02033.1	*Nicotiana langsdorffii x Nicotiana sanderae*	146	37021	6,62	*Predviđen:* Gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, citosolna, XP_016498743.1	Metabolizam ugljikohidrata (glikoliza)	Citoplazma	Metabolizam	AgNP ↓ $AgNO_3$ =

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
30	Gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, GI:157042763, ABV02033.1	*Nicotiana langsdorffii x Nicotiana sanderae*	139	37021	6,62	*Predviđen:* Gliceraldehid 3-fosfat dehidrogenaza, citosolna XP_016498743.1	Metabolizam ugljikohidrata (glikoliza)	Citoplazma	Metabolizam	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
11	Prekursor protugljivičnog proteina CBP20 koji je induciran patogenima i ranjavanjem, GI:7547630, AAB29959.2	*Nicotiana tabacum*	131	22168	8,39	-	Obrana od gljivica i bakterija	Citoplazma	Odgovor na biotički i abiotički stres	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
12	Osmotin, GI:256135, AAB23375.1	*Nicotiana tabacum*	75	26681	8,13	-	Odgovor na stres	Vakuola	Odgovor na biotički i abiotički stres	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↓

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
22	Bazična beta-1,3-glukanaza, GI:194719371, ACF93731.1	*Nicotiana tabacum*	308	40391	7,10	-	Metabolizam ugljikohidrata (katabolički procesi polisaharida	Stanična stijenka Plazmodez-mijia	Odgovor na biotički i abiotički stres	AgNP = $AgNO_3$ ↑
36	Ankirin-ponavljajući protein HBP1, GI:13310811, AAK18619.1	*Nicotiana tabacum*	201	37317	4,45	-	Metabolizam ugljikohidrata (katabolički procesi polisaharida)	Stanična stijenka Plazmodez-mijia	Odgovor na biotički i abiotički stres	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↑
2	Glicinom bogat RNA-vezujući protein, GI:187373099, ACD03270.1	*Nicotiana tabacum*	155	15652	5,23	-	Vezanje nukleinskih kiselina i alternativni splicing molekule RNA	Citoplazma	Procesiranje molekule RNA	AgNP ↓ $AgNO_3$ =

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
28	*Predviđen:* 30S ribosomalni protein S5, kloroplastni, GI:460374193, XP_004232896.1	*Solanum lycopersicum*	142	33372	8,87	*Predviđen:* 30S ribosomalni protein S5, kloroplastni, XP_016507755.1	Regulacija sinteze proteina	Ribosom	Procesiranje molekule RNA	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↓
31	*Parcijalni*: Prekursor mRNA-vezujućeg proteina, GI:32746733, AAP87140.1	*Nicotiana tabacum*	92	44245	6,51	-	Vezanje molekule RNA	Plastid	Procesiranje molekule RNA	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
33	*Parcijalni*: Prekursor mRNA-veznog proteina GI:32746733, AAP87140.1	*Nicotiana tabacum*	107	44245	6,51	-	Vezanje molekule RNA	Plastid	Procesiranje molekule RNA	AgNP ↓ $AgNO_3$ =

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
15	Željezo superoksid dismutaza, GI:573885915, AHG12637.1	*Nicotiana tabacum*	175	28338	8,60	-	Oksidacijsko-redukcijski procesi	Plastid	Oksidacija i detoksifikacija	AgNP ↓ $AgNO_3$ ↑
21	*Predviđen:* Sličan glutation S-transferazi, GI: 565351224, JAP20994.1	*Solanum tuberosum*	82	26661	6,19	*Predviđen:* Sličan glutation S-transferazi, XP_016455705.1	Odgovor na stres	Citoplazma	Oksidacija i detoksifikacija	AgNP ↓ $AgNO_3$ =
5	Peptidil-prolil cis-trans isomeraza, ciklofilin tip proteina, GI:224072532, XP_002303772.1	*Populus trichocarpa*	96	28565	9,51	*Predviđen:* Peptidil-prolil cis-trans isomeraza, XP_016481087.1	Smatanje proteina	Plastid	Sinteza i procesiranje proteina	AgNP ↓ $AgNO_3$ =

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
34	*Predviđen:* Sličan proteazi Do 1, kloroplastni GI:565342861, XP_006338559.1	*Solanum tuberosum*	335	45671	6,45	*Predviđen:* Proteaza Do 1, kloroplastna XP_016443403.1	Proteoliza	Citoplazma	Sinteza i procesiranje proteina	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
37	*Predviđen:* Sličan nekarakteriziranom proteinu At5g39570, GI:565342585, XP_006338424.1	*Solanum tuberosum*	102	40988	4,66	*Predviđen:* Sličan nekarakteriziranom proteinu At5g39570, XP_016449031.1	n.p.	n.p.	n.p.	AgNP ↑ $AgNO_3$ ↑
39	Nije identificiran	-	-	-	-	-	-	-	-	AgNP = $AgNO_3$ ↑

BROJ NA GELU	NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	VRSTA	SCORE	MASA PROTEINA (Da)	pI	BLASTp *N. tabacum*, NAZIV PROTEINA, ID. BROJ (NCBI/UniProt)	BIOLOŠKI PROCESI	STANIČNI ODJELJAK	FUNKCIO-NALNA KATEGORIJA	RAZLIKOVNA EKSPRESIJA
40	Nije identificiran	-	'	'	'	-	-	-	-	AgNP ↑ $AgNO_3$ =
41	Nije identificiran	-	'	'	'	-	-	-	-	AgNP ↓ AgNO3 ↓

9. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 1. travnja 1971. u Splitu. Po završetku srednjoškolskog obrazovanja u Zadru, upisala sam Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, gdje sam diplomirala 1996. diplomskim radom pod naslovom "Uklanjanje nitrata iz vode procesima ionske izmjene", kojeg sam izradila pod vodstvom red. prof. dr. sc. Ivana Mijatovića u Laboratoriju za tehnološke i otpadne vode. U razdoblju od 1998. do 2007. godine radila sam u Nastavnom zavodu za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar" u Zagrebu u Službi za zdravstvenu ekologiju. Na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu radila sam od 2000. do 2007. kao stručni suradnik na kolegiju „Analiza kemijskih faktora okoliša". Magistrirala sam 2009. godine na poslijediplomskom studiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu s temom „Količina akrilamida u pitkoj vodi i odabranim namirnicama te procjena njegove toksičnosti biotestovima na slatkovodnim organizmima" pod voditeljstvom izv. prof. dr.sc. Jasne Bošnir. Od 2007. do danas sam zaposlena u Hrvatskoj agenciji za okoliš i prirodu kao voditeljica Odjela za dokumente zaštite okoliša. Članica sam nekoliko stručnih radnih skupina za izradu strateških i planskih dokumenata te propisa u području zaštite okoliša. Također sam članica „Informacijske promatračke mreže Europske unije" (EIONET) u svojstvu nacionalne točke za područje izvješćivanja o stanju okoliša, okoliša i zdravlja te turizma i okoliša, a pri Europskoj komisiji sam predstavnica Hrvatske u Odboru za sustav upravljanja okolišem EMAS. Urednica sam „Izvješća o stanju okoliša u Republici Hrvatskoj" te suradnica u izradi europskog izvješća o stanju okoliša pri Europskoj agenciji za okoliš (SOER) te globalnog izvješća o stanju okoliša Ujedinjenih Naroda (GEO). Od 2007. aktivna sam u radu HZN "TO Upravljanje okolišem", a članica sam i nekoliko udruženja i projektnih timova iz područja javnog zdravstva, biomonitoringa, biologije i zaštite okoliša te autorica pedesetak znanstvenih i stručnih radova.

Popis radova

Izvoran znanstveni rad (indeksiran u CC i SCI Expanded):

Cvjetko P, Zovko M, Balen B (2014) Proteomics studies of heavy metal toxicity in plants. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology, 65: 1-18.

Zovko M; Vidaković-Cifrek Ž; Cvetković Ž, Bošnir J, Šikić S (2015) Assessment of acrylamide toxicity using a battery of standardised bioassays. Archives of Industrial Hygiene and Toxicology 66: 315-321.

Cvjetko P, Zovko M, Peharec Štefanić P, Biba R, Tkalec, M, Domijan AM, Vinković Vrček I, Letofsky-Papst I, Šikić S, Balen B (2018) Phytotoxic effects of silver nanoparticles in tobacco plants. Environmental Science and Pollution Research 25: 5590.

Znanstveni radovi u zbornicima s međunarodnom recenzijom i pregledni radovi:

Bošnir J, Puntarić D, Šmit Z, Čulig J, Vladović M, Galić A. The quality of diet in the Zagreb day-care centers at the turn of the milenium. U: The 4th Croatian Congress of Food Technologists, Biotechnologists and Nutricionists, Central European Meeting, Book of Abstracts Opatija: Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Zagreb, 2001, str. 12.

Bošnir J, Puntarić D, Zovko M, Šmit Z. Acrylamide as a food contaminant. International Congress of Toxicology (2004) Living in a Safe Chemical World: Toxicology and Applied Pharmacology. Amsterdam: Elsevier 197: 246-248.

Bošnir J, Hegedus M, Puntarić D, Zovko M, Baričević K, Perko G, Mihok D (2005) Nužnost stalne kontrole i nadzora prehrane u domovima za starije osobe u Hrvatskoj. Medicus 14(2): 305-312.

Zovko M, Zovko V, Šimović V. Decision tree modeling - Teleworking exsample. The 1st International Conference on Advances and System Research. Book of Abstract. ICSKS: Information and Communication Sciences in the Knowledge Society, Zagreb 2007, 2: 25-25.

Zovko M, Butuči J (2009) Croatian Environment Information System – How to reach the public? World Scientific and Engineering Academy and Society Journal: Energy, Environment, Ecosystems, Development and Landscape Arhitecture 3: 68-72.

Zovko M, Katić I, Pofuk D, Gudelj I. Importance of efficient water management for the human health. Book of Abstracts "Water for all". U: Habuda-Stanić M (ur.). Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek, 2017. str. 13-13.

Zovko M, Cvjetko, Petra; Vinković Vrček, I, Balen B. The effect of silver nanoparticles on oxidative stress in tobacco seedlings (*Nicotiana tabacum)*. Book Of Abstracts of the 12th Croatian Biological Congress. U: Klobučar G, Kopjar N (ur.) Hrvatsko biološko društvo, Zagreb, 2015. str. 224-224.

Stručni radovi (odabrani):

Bošnir J, Zovko M, Puntarić D, Kovaček I. The quality and health validity of nutrition in kindergartens and homes for the elderly. Book of Abstracts, 1. Hrvatski kongres preventivne medicine i unapređenja zdravlja, U: Lang S. (ur.). Hrvatsko društvo za javno zdravstvo, Zagreb, 2003. str. 26-29.

Bošnir, Jasna; Puntarić, Dinko; Šmit, Zdenko; Hegedus, Mirjana; Zovko, Mira (2005) Neki novi kontaminanti hrane. Gospodarstvo i okoliš: stručni časopis za tehniku zaštite okoliša. 75: 483-487.

Bošnir J, Hegedus M, Puntarić D, Zovko M, Baričević K, Perko G, Mihok (2006) Nužnost kontinuirane kontrole prehrane u domovima za starije osobe. Liječnički vjesnik 128(1): 59-60.

Zovko M, Katić I, Kufrin J, Pofuk D, Gudelj I (2017) Sinergija kružnoga gospodarstva i procjene utjecaja na okoliš. Third Regional Conference on Environmental Impact Assessment, Book of Abstract. Marta Brkić (ur.). Zagreb: Hrvatska udruga stručnjaka u zaštiti prirode i okoliša 1: 77-78.