

**Katarina Drobac**

**Parametri oksidacijskog stresa u klijancima  
duhana (*Nicotiana tabacum*) nakon tretmana  
nanočesticama srebra u kombinaciji s cisteinom**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2019.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Stanična biologija s genetikom Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju pri Biološkom odsijeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ana-Marije Domijan s Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i suvoditeljstvom prof. dr. sc. Biljane Balen s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, voditeljice projekta NanoPhytoTox.

Ovaj rad izrađen je uz financijsku potporu Hrvatske zaklade za znanost u sklopu istraživačkog projekta NanoPhytoTox [IP-2014-09-6488].

*Zahvaljujem profesorici Ana-Mariji na mentorstvu, iznimnoj dostupnosti i velikoj potpori tijekom izrađivanja rada. Veliko hvala i Renati i cijeloj ekipi s PMF-a na suradnji i pomoći, dostupnosti te ugodnoj radnoj atmosferi.*

*Hvala mom Fakultetu i njegovom osoblju, u razdoblju cijelog studija, za ostvarivanje i širenje mogućnosti, unutar i van radnog vremena. ☺*

*Prijatelji, hvala vam što ste me mijenjali i prihvaćali, bili dio nezaboravnog iskustva studiranja i najljepšeg perioda u životu.*

*U konačnici hvala i mojoj obitelji. Ovoj u Zagrebu i doma, a nadalje mojim roditeljima, braći i Luci, hvala za sve što se riječima ne može opisati. Sav moj rad je vaš koliko je i moj.*

*Zahvalna sam na vama, vašoj ljubavi, podršci i pozitivni koju iz vas crpim.*

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Nanotehnologija.....	1
1.1.1. Nanočestice srebra (AgNP).....	2
1.1.2. Proizvodnja AgNP.....	3
1.1.3. Cistein kao kelator iona srebra.....	4
1.1.4. Utjecaj nanomaterijala na organizme i okoliš.....	5
1.2. Oksidacijski stres.....	6
1.2.1. Reaktivni kisikovi spojevi (ROS).....	6
1.2.2. Zaštita od oksidacijskog stresa.....	8
1.2.3. Vrste oksidacijskih oštećenja.....	9
1.2.3.1. Lipidna peroksidacija.....	9
1.2.3.2. Oksidacija proteina.....	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME.....	12
3. MATERIJALI I METODE.....	13
3.1. Materijali.....	13
3.1.1. Kemikalije.....	13
3.1.2. Oprema.....	14
3.1.3. Modelni organizam – duhan ( <i>Nicotiana tabacum</i> ).....	14
3.2. Metode.....	15
3.2.1. Biološki pokus.....	15
3.2.1.1. Priprema otopina (za presađivanje i uzgoj biljaka).....	15
3.2.1.2. Postupak provođenja biološkog pokusa.....	16
3.2.2. Ekstrakcije ukupnih topljivih proteina.....	17
3.2.2.1. Priprema otopina.....	17
3.2.2.2. Postupak.....	17
3.2.3. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu.....	18
3.2.3.1. Princip metode.....	18
3.2.3.2. Priprema otopina.....	18
3.2.3.3. Postupak.....	19
3.2.4. Određivanje koncentracije MDA.....	20
3.2.4.1. Princip metode.....	20
3.2.4.2. Priprema otopina.....	20
3.2.4.3. Postupak.....	20
3.2.5. Određivanje koncentracije proteinskih karbonila.....	21
3.2.5.1. Princip metode.....	21

3.2.5.2.	Priprema otopina .....	22
3.2.5.3.	Postupak.....	22
3.3.	Statistička obrada podataka .....	23
4.	REZULTATI.....	24
4.1.	Ukupni proteini .....	24
4.2.	MDA.....	26
4.3.	Proteinski karbonili .....	27
5.	RASPRAVA.....	28
6.	ZAKLJUČCI.....	33
7.	LITERATURA .....	34
8.	SAŽETAK.....	40

#### PRILOG

#### TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD

# 1. UVOD

## 1.1. Nanotehnologija

Nanotehnologija je suvremeno područje istraživanja i proizvodnje koje se, pored nanoalata i nanouređaja, bavi nanomaterijalima (Ivanković, 2011). Sastavni dio nanomaterijala su nanočestice. To su strukture nastale nakupljanjem atoma do dimenzija u nanometarskim veličinama stoga su znatno manje od onih nakupina koje se vide golim okom i percipiraju kao jedno od tri agregatna stanja s poznatim nam svojstvima. Da bi neki materijal bio nanomaterijal, nakupine atoma moraju biti veličine od 1 do 100 nm u barem jednoj od tri dimenzije (<https://echa.europa.eu/hr/regulations/nanomaterials>). Jedan nm je jedna milijuntina metra ili  $1 \times 10^{-9}$  m. Za vizualizaciju nanočestica, moglo bi se prikazati sljedeće: uzme li se da je jedna pikula veličine 1 nm, onda je u usporedbi s njom 1 m kao promjer Zemlje. Standardna debljina lista papira ili vlasi kose je 100 000 nm, odnosno, duž njihovog promjera stalo bi 100 000 nanočestica promjera 1 nm. To znači da su takve čestice manje od brojnih bioloških makromolekula kao što je primjerice krvni hemoglobin.

Nanočestice karakterizira to da imaju veću specifičnu površinu po volumenu što daje nanomaterijalima fizikalno-kemijska svojstva koja se razlikuju od svojstava većih tvari, primjerice mikro čestica, ali i od individualnih ionskih oblika iste tvari (najčešće otopine). Manipuliranjem razmještaja atoma u nakupinama nanočestičnih dimenzija nanomaterijalima se mijenjaju svojstva. Od individualnih atoma na nanoskalama je moguće primjerice dizajnirati tanke plohe, žice, uviti ih u tube, kugle ili različite druge strukture koje se potom različito ponašaju (Ivanković, 2011; Kesser, 2011).

Danas znanstvenici i inženjeri na različite načine pokušavaju osmisliti način pripreve materijala u nano-veličinama kako bi pri tom iskoristili nove mogućnosti koje im takav materijal pruža: veću snagu i izdržljivosti, manju masu, posebna optička svojstva, veću kemijsku reaktivnost te jedinstvena električna i fotoelektrokemijska svojstava od svojih kemijskih ekvivalenata u makro-varijanti (<https://www.nano.gov/nanotech-101/what/definition>; Lanje i sur., 2010).

Globalno tržište proizvodima koji koriste nanomaterijale je veliko i neprestano raste. Prema izvještajima Zajedničkog istraživanja tržišta (engl. *Allied Market Research*) 2014. godine tržište nanomaterijala procijenjeno je na 3,4 bilijuna američkih dolara s konstantnim rastom i procjenom na 55 bilijuna američkih dolara do kraja 2022. godine (Inshakova i

Inshakov, 2017). Nanomaterijali imaju mnogostruke primjene te smo njima okruženi više nego što mislimo. Koriste se u kozmetici, primjerice u kremama za sunčanje nanočestice ZnO i TiO<sub>2</sub> reflektiraju i apsorbiraju štetne UVA i UVB zrake, dok nanočestice bakra u šamponima promoviraju rast kose. U medicini se ispituje upotreba nanočestica raznih metalnih oksida, a najveću primjenu imaju one metala zlata i srebra te se koriste u terapiji bakterijskih oboljenja i malignih oštećenja. Nanočestice sintetizirane od raznih polimera upotrebljavaju se za ciljanu isporuku lijekova ili u dijagnostičke svrhe. Također, nanočestice srebra, zlata i željeza koriste se za pročišćavanje otpadnih voda. Zlato u obliku nanočestica izvrstan je i često korišten katalizator, dok su kvantne točke većinski pripravljene od poluvodičkih materijala (CdSe, CdTe ili ZnS) interesantne u informatičkoj tehnologiji i u molekularnoj biologiji za „označavanje“ proteina. Ugljikove nanočestice koje se, osim prirodnim putem, sintetiziraju i umjetno u paleti raznolikih nanočestičnih oblika, između ostaloga se kao fuleren-polimerni nanomaterijal koriste u električko-optičkim uređajima, a nanotube se ispituju u biološkoj i medicinskoj primjeni (Kessler, 2011; Kesić i Horozić, 2016; Zhang i sur., 2008; Nowack i Bucheli, 2007).

### **1.1.1. Nanočestice srebra (AgNP)**

Otopina srebrovog nitrata, s ionima srebra (Ag<sup>+</sup>) kao nositeljima aktivnosti, od davnina je poznata kao izvrstan baktericid, virucid i fungicid (Rai i sur., 2009). Do pred kraj prošlog stoljeća naveliko je bila upotrebljavana za liječenje različitih stanja uzrokovanih mikrobiološkim infekcijama, kao što su spolno prenosive bolesti, infekcije kože, rane, akne, prehlada, čak i kod problema oka ili epilepsije. Krajem prošlog stoljeća prestala je upotreba otopine srebrovog nitrata. Danas se još upotrebljava u sprečavanju komplikacija površinskih rana. Iako se smatra da općenito ima nisku toksičnost, najčešća nuspojava dugotrajne upotrebe otopina srebra je tzv. argirija – stanje u kojem koža i sluznice mijenjaju boju u plavo-sivu uslijed njegove akumulacije u dermisu (Lansdown, 2002).

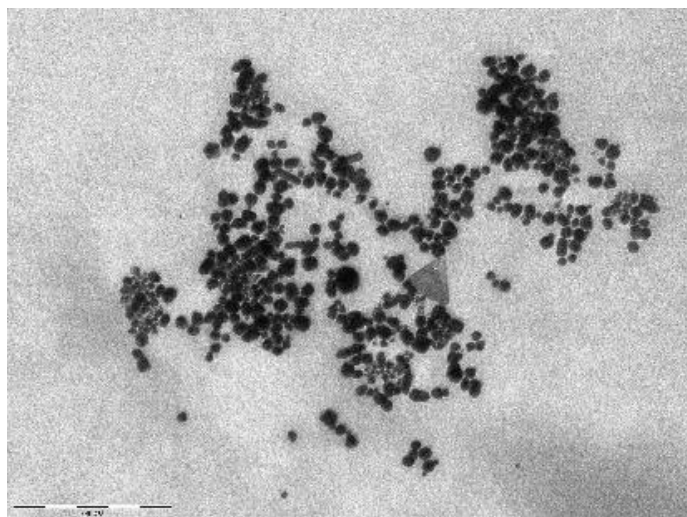
Bakterijska rezistencija na antibiotike predstavlja sve veći problem današnjice širom svijeta. Tvari koje imaju širokospektralno antibakterijsko djelovanje bez pojave rezistencije tako danas dobivaju sve više pažnje. Kao elegantnija antimikrobna tvar, a koja se odupire rezistenciji, nametnulo se nanočestično srebro (AgNP). Globalna potreba za reduciranjem mikroorganizama u svrhu maksimalizacije resursa, ali i specifična fizikalno-kemijska svojstva AgNP-a omogućila su da se ono nađe u velikom broju raznolikih proizvoda na tržištu. Danas se AgNP dodaje mnogim tkaninama, pogotovo sportskoj odjeći kako bi reduciralo nakupljanje mikroorganizama, smanjio neugodan miris i povećala otpornost na mrlje. Nalazi se u kozmetičkim proizvodima poput dezodoransa, šampona, krema i zubnih pasti, kao i u

spremnima za hranu kako bi pomogao održati životni vijek hrane što duljim. Pored toga AgNP se nalazi i u tehnici: u premazima unutar hladnjaka i perilica, filterima za zrak ili kao katalizator u brojnim kemijskim reakcijama, za produljenje vijeka trajanja i efikasnosti baterija te u medicini kao elegantan način dezinfekcije medicinskih instrumenata (Kessler, 2011; Kesić i Horozić, 2016).

Mehanizam antibakterijskog djelovanja AgNP Morones i suradnici (2005) opisali su kao kombinaciju tri različita mehanizma, što vjerojatno i jest razlog visokoj antimikrobnoj efikasnosti i niskom razvoju rezistencije mikroorganizama na taj materijal. Najprije, AgNP manje od 10 nm su sposobne vezati se na sulfidne i fosforne nemetalne dijelove proteina membrane mikroorganizma i omesti njenu pravilnu funkciju propusnosti i reapsorpcije, što može dovesti do „curenja“ i smrti bakterije. Potom, AgNP može penetrirati u bakteriju i interferirati s drugim makromolekulama unutar bakterijske stanice koji također sadrže navedene nemetale, poput DNA, ali i producirati reaktivne kisikove spojeve (ROS, engl. *Reactive Oxygen Species*) i oksidacijskim stresom naštetiti bakteriji (Xu i sur., 2012). Zadnji navedeni mehanizam baktericidnosti je rezultat otpuštanja iona srebra iz nanočestica, koji sami, kako je već navedeno, imaju izvrstan antimikrobni učinak, također putem koaguliranja i oštećenja proteina s tiolnim skupinama te izazivanjem kondenzacije molekule DNA bakterijske stanice (Feng i sur., 2000).

### **1.1.2. Proizvodnja AgNP**

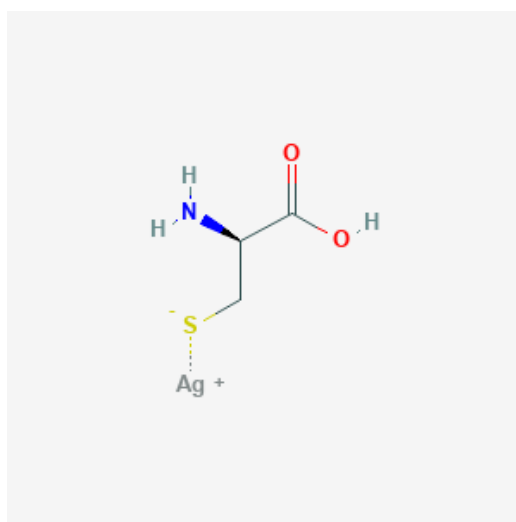
Osim važnosti veličine nanočestica i njihovog oblika (Morones i sur., 2005), za antimikrobnu funkciju važna je i tvar kojom se nanočestice oblažu. Pri sintezi nanočestica ovojnice se dodaju kako bi ih stabilizirale, spriječile međusobnu agregaciju te im kontrolirale veličinu i oblik. Korištenje specifičnog materijala za oblaganje rezultira drugačijim karakteristikama nanočestica (Silva, 2011). Omotači koji nose naboj, poput citrata, pokazali su se manje stabilnim za AgNP od onih koji stvaraju sterički štiti oko nanočestica poput polimera polivinilpirolidona (PVP) ili polietilenglikola (PEG) (Tejamaya i sur., 2012). Na Slici 1 prikazane su AgNP stabilizirane PVP-om.



**Slika 1.** Nanočestice srebra stabilizirane omotačem od polivinilpirolidona (AgNP-PVP). Fotografija je snimljena transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM) pri povećanju od 44000 $\times$ . Snimila P. Peharec Štefanić

### 1.1.3. Cistein kao kelator iona srebra

Aminokiselina cistein je poznata zbog svojstva keliranja iona srebra čineći ga time nedostupnim za daljnje djelovanje. Kao što je već opisano, ion srebra sposoban je vezati se na sulfidne krajeve sadržane u proteinu ionskim vezama (Leung i sur., 2013). Iste interakcije Ag<sup>+</sup> stvara i sa samim cisteinom, samo što je u tom slučaju sulfidni anion mnogo pokretniji i dostupniji jer nije vezan za veliki protein (Slika 2).



**Slika 2.** Kompleks nastao cisteinskim keliranjem iona srebra (preuzeto s <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/469104#section=Structures>).



Cistein se stoga koristi u brojnim istraživanjima za distinkciju posljedica djelovanja AgNP s otpuštenim ionima u okolinu (bez cisteina) i djelovanja samih AgNP s uklonjenim utjecajem iona srebra (tretman s cisteinom) (Navarro i sur., 2008b).

#### **1.1.4. Utjecaj nanomaterijala na organizme i okoliš**

Zbog sve veće upotrebe nanočestica, sve je veća i njihova prisutnost u okolišu. Nanočestice ulaze u ekosistem iz različitih proizvoda u kojima se koriste te u velikoj mjeri i iz proizvodnih pogona (Silva, 2011). Još je uvijek upitan utjecaj različitih nanočestica na okoliš te posljedično ljude.

Toksikokinetički parametri nanočestičnih materijala su nepredvidljivi u usporedbi s onima materijala makro-dimenzija ili pojedinačnih iona. U nekim biljnim i životinjskim organizmima umjesto eliminacije potvrđena je sposobnost akumulacije nanočestica (Tang i sur., 2009; Ma i sur., 2010; Nowack i Bucheli, 2007). Uz takvu toksikokinetiku, iznimno važan aspekt njihove potencijalne toksičnosti jest i poticanje produkcije ROS-ova u stanicama. Na staničnoj razini produkcija ROS-ova se može manifestirati pojavom oksidacijskog stresa i citotoksičnosti, a na razini organizma u obliku upala (Nowack i Bucheli, 2007). Kronične upale mahom završavaju fibroznim promjenama i gubitkom funkcije različitih tkiva (Navarro i sur., 2008a; Navarro i sur., 2008b; Nowack i Bucheli, 2007).

Iz zdravstvenog aspekta ljudi nanočestice su tradicionalno povezane s pulmonalnom toksičnošću za izložene radnike u njihovoj proizvodnji i korištenju. No, takva apsorpcija je kompromitirana uslijed povremene aglomeracije nanočestica pri nedostatku disperzne faze te izostanku nanočestičnih svojstava dostatnih za apsorpciju putem pluća. Koža, iako nas štiti od apsorpcije većine tvari uopće pa tako i nanočestica, svejedno je relevantni organ apsorpcije pogotovo sitnijih (<5-10 nm) nanočestica. Apsorpcija je moguća i putem gastro-intestinalnog trakta, iz prehrambenih proizvoda kontaminiranih nanočesticama, dodataka prehrani ili sprejeva za grlo (Kesić i Horozić, 2016; Colvin, 2003).

U zadnjih nekoliko godina Europska unija napravila je velike pomake u zakonskoj regulaciji tržišta nanomaterijalima. Nanomaterijali su do unatrag nekoliko godina bili obuhvaćeni isključivo „starim“ uredbama o svim kemijskim tvarima (Uredbe REACH, CLP), ali ti zahtjevi nisu sa sigurnošću primjenjivi s uobičajenih kemijskih tvari na nanomaterijale radi već navedenih drugačijih svojstava nanočestičnih materijala (<https://echa.europa.eu/hr/regulations/nanomaterials>). Europska komisija je od 2011. godine naglašavala potrebu o distinkciji nanomaterijala od „običnih“ kemijskih tvari pri njihovoj definiciji. Strategija Europske agencije za kemikalije (ECHA, engl. *European chemical agency*)

donesena 2015. godine za naredne dvije godine uključivala je, između ostalog, promoviranje istraživanja i upotpunjavanje poznatih činjenica o nanomaterijalima da bi se ostvarilo njihovo sigurnije korištenje, zatim identificiranje opasnih nanomaterijala te zahtijevanje za transparentnost o korištenju istih na tržištu, čemu se sve do tada nije pridavala tolika važnost ([https://echa.europa.eu/documents/10162/21844190/mb\\_41\\_2015\\_workplan\\_nanomaterials\\_incl\\_annexes\\_en.pdf/20da85dc-6ca0-46f1-bfd5-50b92d015c2a](https://echa.europa.eu/documents/10162/21844190/mb_41_2015_workplan_nanomaterials_incl_annexes_en.pdf/20da85dc-6ca0-46f1-bfd5-50b92d015c2a)).

Danas je u zakonima Europske unije zastupljeno više propisa koji se tiču isključivo nanomaterijala. Osim toga određeni su i zakoni za specifične proizvode na tržištu u kojima se nanomaterijali nalaze, poput kozmetičkih produkata, hrane, biocidnih ili medicinskih proizvoda te su određeni zahtjevi za informativnim oznakama na pakiranju takvih produkata i zahtjevi za procjenom njihove sigurnosti (<https://ec.europa.eu/jrc/en/science-update/how-are-nanomaterials-regulated-eu>). Europska komisija još uvijek ističe potrebu za novim ispitivanjima i upotpunjavanjima zakona u tom području.

## 1.2. Oksidacijski stres

U podlozi života i fiziologiji metabolizma svake stanice konstantno je i uravnoteženo odvijanje oksido-redukcijskih reakcija. Ključni koraci u dobivanju energije za sve aerobne organizme odvijaju se uz pomoć oksidacije atmosferskim kisikom koji nas okružuje, a koja je uparena s višestrukim koracima redukcije. Oksidacijski stres je poremećaj nastao pomicanjem ravnoteže oksido-redukcijskih reakcija prema oksidaciji, usprkos višestrukim regulacijskim mehanizmima. Također se definira i kao disbalans u koncentraciji između oksidansa i antioksidansa u korist oksidansa (Sies, 1997; Valko i sur., 2006). To stanje oksidacijskog stresa potencijalno vodi do daljnjih oštećenja u stanici.

### 1.2.1. Reaktivni kisikovi spojevi (ROS)

Snažni oksidansi koji se produciraju u stanicama su ROS-ovi, reaktivni dušikovi spojevi (RNS, engl. *Reactive nitrogen species*) i reaktivni ugljikovi spojevi (RCS, engl. *Reactive carbonyl species*). Najčešće spominjani ROS-ovi uključuju molekulske vrste poput vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ), ozona ( $O_3$ ), hipokloritne kiseline ( $HOCl$ ) i singlet kisika ( $^1O_2$ ). U ROS-ove spadaju i slobodni kisikovi radikali u koje ubrajamo hidroksilni radikal ( $OH^\bullet$ ), superoksid anion radikal ( $O_2^{\bullet-}$ ) i hidroperoksilni radikal ( $HO_2^\bullet$ ), a koji su opasniji od ostalih ROS-ova jer u svojoj vanjskoj ljusci imaju nesporeni elektron. To ih čini neselektivnima i vrlo reaktivnima, jer im je

u cilju postići stabilnu elektronsku konfiguraciju. Zato „napadaju“ sve stanične makromolekule kojima su okruženi: lipide, proteine ili molekule DNA te im uzimaju po jedan elektron (Reuben, 1998).

Nastajanje ROS-ova posljedica je normalnih fizioloških procesa u određenim mikrolokacijama organizma ili dijelovima stanice. Ali sukladno njihovim osobinama i funkciji, produkcija i djelovanje ROS-ova strogo su kontrolirani. Patofiziološki, kod stanja oksidacijskog stresa, oni nastaju na mjestima, u vrijeme ili u količinama u kojima ne bi trebali što postaje potencijalno štetno za organizam (Sies, 1997).

Fiziološki neophodan proces većine aerobnih organizama iz kojeg stanice generiraju energiju u obliku ATP-a, oksidativna fosforilacija, je proces u kojem se kisik, dospio u stanice iz atmosfere, reducira u vodu. Najčešća je to situacija u kojima uobičajeno nastaju ROS-ovi i slobodni radikali kisika. Da bi u tom procesu iz molekularnog kisika ( $O_2$ ) nastala voda, kisik mora primiti 4 elektrona ( $e^-$ ). No, po primanju svakog od njih, redom nastaju superoksidni anion radikal ( $O_2^{\cdot-}$ ) uz jedan elektron, vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) uz dva te hidroksilni radikal ( $OH^{\cdot}$ ) uz primanje tri elektrona. To se zove parcijalna redukcija kisika. Primanjem četvrtog nastaje nereaktivna molekula vode ( $H_2O$ ), što dovodi do potpune redukcije kisika (Slika 3).



**Slika 3.** Osnovna shema reakcija nastajanja ROS-ova (crvenom bojom) redukcijom molekularnog kisika u oksidativnoj fosforilaciji.

ROS-ovi također nastaju i prilikom upale, koje u kroničnom obliku poprimaju patofiziološke osobine. Na mjesto upale skupljaju se neutrofilni spremni za borbu protiv uzročnika upale, najčešće nekog mikroorganizma, a jedan od načina na koji to rade je tzv. oksidativni prasak. U njemu iz molekula kisika ( $O_2$ ) uz enzim NADPH oksidazu nastaju superoksidni anion radikali ( $O_2^{\cdot-}$ ), a potom i hipokloritna kiselina ( $HOCl$ ). Reaktivnost tih ROS-ova u ovom je slučaju usmjerena na borbu protiv patogena.

Osim oksidativne fosforilacije i obrane od patogena (upale), ROS-ovi se fiziološki produciraju kao signalne molekule za kontrolu stanične proliferacije, apoptoze i sistemske signalizacije poput fosforilacije proteina i aktivacije pojedinih transkripcijskih faktora ili pak kao odgovor na abiotički stres (Mittler, 2002; Simon i sur., 2000; Valko i sur., 2006; Rhee, 2006).

Slobodni metali poput željeza, bakra, kobalta, kroma i mnogih drugih (Valko i sur.,

2006) također uzrokuju proizvodnju slobodnih radikala i to katalizirajući proces nastanka hidroksil radikala ( $\text{OH}^\bullet$ ) iz vodikovog peroksida ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) Fentonovom reakcijom (Slika 4). Hidroksil radikal ( $\text{OH}^\bullet$ ) je najreaktivniji, a time i najštetniji kisikov spoj, stoga su nevezani, slobodni ioni metala iznimno štetni faktori koji doprinose oksidacijskom stresu u organizmu.



**Slika 4.** Fentonova reakcija.

Još jedan od načina patofiziološke proizvodnje slobodnih radikala je metabolizacijom saturirajuće količine ksenobiotika, lijekova i kemikalija kao što su primjerice paracetamol, tetraklorometan ili mnogi drugi. Njihovim metabolizmom s ciljem detoksifikacije u jetri mogu nastati različiti radikali kisika, ponekad dušika, ali češće i ugljika, ovisno o molekuli koja se metabolizira (Mason i Chignell, 1981).

### **1.2.2. Zaštita od oksidacijskog stresa**

Organizmi su evoluirali u visoko oksidativnoj atmosferi punoj kisika i iz procesa oksidacije crpe energiju. Ti procesi visokih reakcijskih potencijala višestruko su kontrolirani. Osim uparivanja s redukcijskim reakcijama za održavanje sustava funkcionalnim i živućim, stanice su razvile i više mehanizama obrane od hiperprodukcije ROS-ova i njihovih posljedica.

Jedna od strategija organizma za prevenciju oksidacijskog stresa je sinteza proteina koji djeluju kao nosači te vežu metale: albumin, feritin, transferin, mioglobin, metalotionin te ceruloplazmin. Manja koncentracija slobodnih metala u stanici znači i manju produkciju ROS-ova, poglavito opasnog hidroksil radikala.

U slučaju da su reaktivni oksidansi već producirani, kao prva linija obrane tada služe antioksidansi. To su molekule koje organizam sam sintetizira ili unosi hranom te su rasprostranjeni po stanici i po samom organizmu. Koenzim Q10 (ubikvinon) te vitamin A i E (retinol, tokoferol) i njihovi derivati (karoten, likopen) vodonetopljivi su antioksidansi važni za obranu lipidnih dijelova stanica. Vitamin C (askorbinska kiselina), glutation te različiti polifenoli, flavonoidi, lipoična kiselina (Valko i sur., 2006) su vodotopljivi, smješteni stoga u vodenim dijelovima stanice, citosolu i izvanstaničnoj tekućini (Sies, 1997). Svi oni djeluju kao donori elektrona te tako neutraliziraju nastale slobodne radikale, a djelovanje jednih zavisi o drugima (Vertuani i sur., 2004).

Drugi način sanacije već stvorenih ROS-ova je putem enzima koji su zaduženi za dekompoziciju ROS-ova na spojeve koji nisu štetni. Tako je enzim superoksid dismutaza

(SOD) zadužena za eliminaciju superoksid anion radikala ( $O_2^{\cdot-}$ ), a enzimi katalaza (CAT) i peroksidaze (PX) za eliminaciju vodikovog peroksida ( $H_2O_2$ ) i organskih peroksida (R-OO-R) (Sies, 1997). Među najvažnije peroksidaze za ljude spada glutathion peroksidaza (GPX), a za biljne stanice izrazito su bitne askorbat peroksidaza (APX) i pirogalol peroksidaza (PPX) (Biba, 2016).

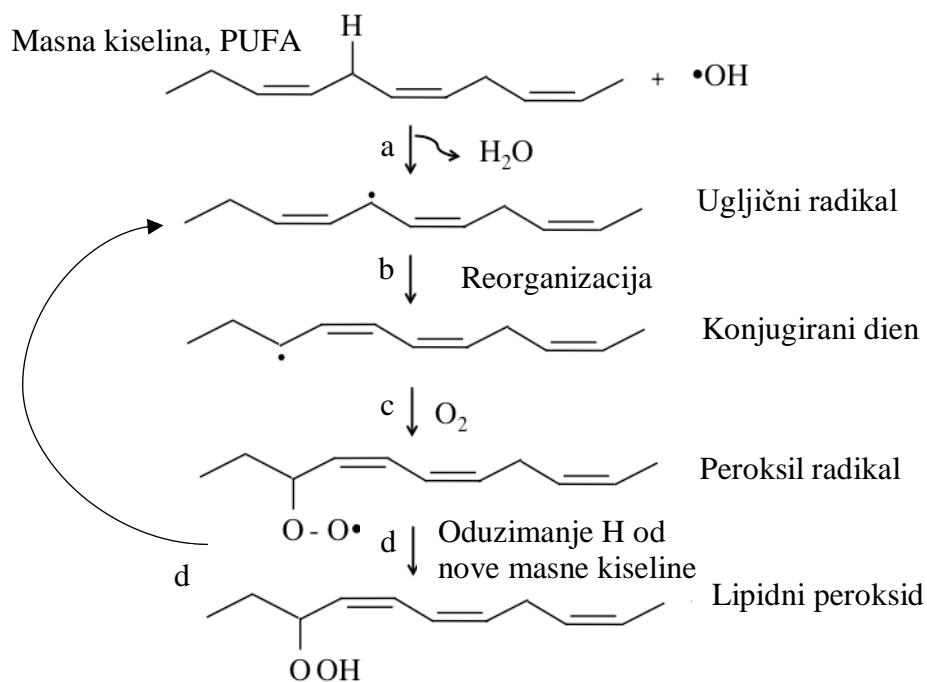
U slučaju da su oštećenja makromolekula stanice usljed oksidacijskog djelovanja ROS-ova već nastala, stanica posjeduje enzime zadužene za popravak, poput metionin sulfoksid reduktaze koja popravlja oksidirane proteine (Moskovitz i Oien, 2010) ili DNA ligazu i DNA polimerazu za popravak oštećene molekule DNA. Ako to nije moguće, inducira se apoptoza stanice.

### **1.2.3. Vrste oksidacijskih oštećenja**

#### **1.2.3.1. Lipidna peroksidacija**

Lipidna peroksidacija podrazumjeva oksidaciju lipida, prvenstveno lipida stanične membrane, što rezultira njihovom degradacijom.

Inicijacija ili prvi korak lipidne peroksidacije odvija se u prisutnosti slobodnih radikala, najčešće hidroksilnog radikala ( $OH^{\cdot}$ ) ili hidroperoksilnog radikala ( $HO_2^{\cdot}$ ). Jedne od najdostupnijih molekula za oduzimanje elektrona su im fosfolipidi staničnih membrana, i to najčešće njihove polinezasićene masne kiseline (PUFA, engl. *Polyunsaturated fatty acids*). Slobodni kisikov radikal oduzima ugljiku susjednu dvostruke veze radikal vodika ( $H^{\cdot}$ ) kako bi upario svoje elektrone. Od masne kiseline tako nastaje ugljični radikal (R- $HC^{\cdot}$ -R) (Slika 5a). Takvi radikali se nastoje stabilizirati reorganizacijom molekula, oblikujući konjugirane diene (Slika 5b). Sljedeći korak nazvan je propagacija. Ugljični radikal masne kiseline (R- $HC^{\cdot}$ -R) reagira s kisikom ( $O_2$ ), koji se nanj veže i stvara lipidni peroksil radikal (R- $HCOO^{\cdot}$ -R) (Slika 5c) po kojem je oksidacija lipida i dobila ime. On, kao i drugi radikali, opet napada drugu masnu kiselinu da bi sebe stabilizirao u lipidni peroksid (R- $HCOOH$ -R) (Slika 5d), a od napadnute masne kiseline opet nastaje ugljični radikal (R- $HC^{\cdot}$ -R). Reakcija je lančana jer svaki put kad radikal napadne susjednu lipidnu molekulu nastaje novi radikal pa se oksidacija širi po staničnoj membrani.



**Slika 5.** Lipidna peroksidacija PUFA-e u fazama inicijacije i propagacije (preuzeto s <https://www.intechopen.com/books/lipoproteins-role-in-health-and-diseases/pathophysiology-of-lipoprotein-oxidation> i prilagođeno).

Taj se ciklus produkcije lipidnih peroksil radikala ( $\text{R}_1\text{-HCOO}^\bullet\text{-R}_2$ ) nastavlja sve dok se ne akumulira dovoljna količina da dva reagiraju međusobno sparivanjem svojih nesparenih elektrona, stvarajući pritom ne toliko štetan organski peroksid ( $\text{R}_1\text{R}_2\text{HC-OO-CHR}_3\text{R}_4$ ) i molekulu kisika ( $\text{O}_2$ ). Ta se reakcija zove terminacija.

Neki od krajnjih produkata procesa lipidne peroksidacije različiti su srednjelančani i kratkolančani karbonili i aldehidi, među kojima i malondialdehid (MDA). Ti finalni produkti su stabilniji od ROS-ova, ali aldehidna skupina ih opet čini reaktivnima. Stoga se mogu širiti po stanici te je oštećuju na mjestima udaljenim od mjesta inicijalnog oštećenja membrane i izvora radikala. Kratkolančani produkt MDA dovoljno je stabilan te se može detektirati u stanici i stoga služi kao biomarker oksidacijskog stresa.

Lipidna peroksidacija i nastanak kratkolančanih aldehida i ketona uzrokuju smanjenje fluidnosti stanične membrane, remete transport iona i izmjenu fosfolipida između dvosloja te, u konačnici, povećavaju propusnost membrane za neke tvari, primjerice kalcij koji pri povećanim koncentracijama aktivira nukleaze i degradira molekulu DNA. Kroz fragmentiranu membranu stanične sastavnice izlaze u međuprostor i aktiviraju imunski odgovor i upalu. Stanica nekrotički umire uz oštećenje okolnog tkiva (Gill i Tuteja, 2010; Križanac, 2003). Antioksidansi poput vitamina E i C te glutation i antioksidacijski enzimi igraju vrlo važnu ulogu

u hvatanju lipidnih radikala u fazama inicijacije i propagacije prije negoli oni u većoj mjeri naštete stanici. U stanju oksidacijskog stresa antioksidansi su često kompromitirani, a razina MDA raste i može se izmjeriti.

#### ***1.2.3.2. Oksidacija proteina***

Proteini su također podložni oksidaciji ROS-ovima, pri tom često gubeći konformaciju pa mijenjaju ili gube funkciju. Oksidacija se manifestira stvaranjem proteinskih karbonila – ketona i aldehida na mjestima gdje prethodno nisu bili (Dalle-Donne i sur., 2003). To se događa direktnom oksidacijom nekih aminokiselina (prolina, treonina, glutaminske kiseline, lizina, arginina i histidina) (Suzuki i sur., 2010), oksidacijskim fragmentacijom polipeptidnog lanca, potom križnim povezivanjem produkata nastalih iz tih reakcija ili vezanjem aldehida nastalih u lipidnoj peroksidaciji kao i promjenom električkog naboja i povećanom podložnosti takvih proteina ka proteolizi (Sharma i sur., 2012).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

U suvremenoj industriji sve je veća upotreba različitih nanomaterijala, poglavito AgNP zbog njihovih jedinstvenih fizikalno-kemijskih svojstava. Iako na današnjem tržištu nalaze brojnu primjenu, istraživanja pokazuju da AgNP imaju neželjeni učinak na žive organizme, odnosno da su toksične, a kao mehanizam toksičnosti navodi se pojava oksidacijskog stresa (Navarro i sur., 2008b; Tkalec i sur., 2019). Oksidacijski stres nastaje kao posljedica nepovoljnih uvjeta za stanicu, a definira se kao smanjenje količine antioksidansa nauštrb oksidansa što ima za posljedicu hiperprodukciju ROS-ova (Sies, 1997; Valko i sur., 2006). ROS-ovi su iznimno reaktivni spojevi koji u stanjima oksidacijskog stresa oštećuju stanične makromolekule poput lipida, proteina ili DNA. Postoji niz zaštitnih mehanizama kojima se stanice nose s hiperprodukcijom ROS-ova, a među najbitnijima su molekule antioksidansa koje reagiraju s njima te antioksidacijski enzimi koji kataliziraju reakcije njihove razgradnje na manje štetne spojeve.

Trenutno se provode istraživanja koja ispituju toksičnost i mehanizme toksičnosti AgNP, no učinak AgNP na okoliš i zdravlje ljudi nedovoljno je istražen, a svi mehanizmi toksičnosti nisu razjašnjeni. Stoga je cilj ovog istraživanja bio ispitati uzrokuju li AgNP-PVP promjene u parametrima oksidacijskog stresa, a kao modelni organizam korišteni su klijanci duhana (*Nicotiana tabacum*). Pored toga ispitano je može li se potencijalno toksični učinak AgNP-PVP na klijance duhana spriječiti dodatkom cisteina, kelatora slobodnih iona srebra.

U tu je svrhu nakon isključivanja duhan podijeljen u četiri skupine. Prva je skupina tretirana česticama AgNP-PVP, druga česticama AgNP-PVP u kombinaciji s cisteinom, a treća samim cisteinom. Zadnja skupina klijanaca nije bila tretirana te je služila kao kontrola. Tretman je trajao tjedan dana. Nakon tretmana u sakupljenim uzorcima određena je ukupna koncentracija eksprimiranih proteina kao općeniti pokazatelj promjena u stanici te parametri oksidacijskog stresa: koncentracija MDA kao pokazatelj lipidne peroksidacije i koncentracija proteinskih karbonila, pokazatelja oksidacijskog oštećenja proteina.



# 3. MATERIJALI I METODE

## 3.1. Materijali

### 3.1.1. Kemikalije

- NaOCl, natrijev hipoklorit, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- saharoza, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- kalijeva sol 2-(N-Morfolino)etansulfonske kiseline (MES, engl. *2-(N-Morpholino)-ethanesulfonic acid potassium salt*), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Myo-inositol, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Vitamin B<sub>1</sub>, tiamin, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- FeSO<sub>4</sub>, željezov (II) sulfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O, kalcijev klorid dihidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Na<sub>2</sub>EDTA, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, magnezijev sulfat heptahidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, amonijev nitrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- KNO<sub>3</sub>, kalijev nitrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, borna kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- MnSO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O, manganov (II) sulfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, cinkov sulfat heptahidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- KI, kalijev jodid, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O, natrijev molibdat dihidrat Kemika, Zagreb, Hrvatska
- CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O, bakrov sulfat pentahidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- CoCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O, kobaltov klorid heksahidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- AgNP-PVP, nanočestice srebra s polivinilpirolidonskom ovojnicom, Centar za istraživanje mora, IRB, Rovinj, pripravo Daniel Lyons
- Cistein, L-cysteine, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka
- PVP-40, polivinilpirolidon, Merck, Darmstadt, Njemačka
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, kalijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- *Coomassie Brilliant Blue G-25 (CBB)*, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- Etanol, 96% (V/V), Kuna, Oroslavje, Hrvatska

- $H_3PO_{4(aq)}$ , fosforna kiselina, 88% otopina, T.t.t. d.o.o., Novaki, Sveta Nedelja, Hrvatska
- albumin goveđeg seruma (BSA, engl. *Bovine Serum Albumin*), Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- HCl, klorovodična kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- DNPH, 2,4-dinitrofenilhidrazin, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- TCA, trokloroctena kiselina, Scharlab, Barcelona, Španjolska
- TBA, tiobarbituratna kiselina, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- Etilacetat, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD
- Urea, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD

### 3.1.2. Oprema

- mikropipete, Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- magnetska miješalica, MM-540, Tehtnica, Železniki, Slovenija
- analitička vaga, Sartorius, Göttingen, Njemačka
- elektronička vaga, Sartorius, Göttingen, Njemačka
- pH-metar, PB-11, Sartorius, Göttingen, Njemačka
- lamelar-flow uređaj, Heraeus, Hanau, Njemačka
- autoklav, Bari, Italija
- centrifuga, Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- vorteks, IKA MS3 basic, Straufen, Njemačka
- termomikser, Eppendorf Thermomixer Comfort, Hamburg, Njemačka
- UV-Vis spektrofotometar, Unicam UV4, Thermo Spectronic, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo
- tresilica za uzgoj biljaka – Edmund Bühler SM-30, Bodelshausen, Njemačka

### 3.1.3. Modelni organizam – duhan (*Nicotiana tabacum*)

Duhan, *Nicotiana tabacum*, jednogodišnja je zeljasta biljka iz porodice *Solanaceae*. Cijela porodica poznata je po alkaloidima, raznolikoj skupini bazičnih, nerijetko i opasnih sekundarnih metabolita. Duhan je poznat i naveliko korišten u duhanskoj industriji u svrhu pušenja ili kao prirodni pesticid. Sadrži alkaloid nikotin, u medicini najviše korišten kod apstinencije duhanskih ovisnika. Poznat je i korišten od davnina pa je o njemu prikupljeno dosta znanja. Biljka ima kratko generacijsko vrijeme, lagano se transformira, lako je dobavljiva i nije skupa. Stoga danas znanstvenici duhan često upotrebljavaju za istraživanja u biljnoj staničnoj

biologiji, kulturi tkiva te molekularnoj biologiji i genetičkom inženjerstvu (Brar i sur., 1994; Flick i sur., 1984). Tako je i u ovom istraživanju kao modelni organizam izabran duhan.

Sjemenke duhana korištene u ovom istraživanju nabavljene su iz Duhanskog instituta u Zagrebu.



**Slika 6.** Klijanci duhana (*Nicotiana tabacum*) korišteni u ovome istraživanju. Snimila R. Biba.

## 3.2. Metode

### 3.2.1. Biološki pokus

Biljke se u laboratorijskim uvjetima moraju uzgajati u potpuno sterilnoj okolini. Stoga je rukovanje njima, sterilizacija i nasađivanje sjemenki na podloge, zahtijevalo rad u laminar-flow uređaju za održavanje sterilne atmosfere. Tijekom rada s kulturom tkiva duhana, Murashige i Skoog (1962) su razvili specifičan sastav hranjivog medija za uzgoj u uvjetima *in vitro* i proučavanje duhana, tzv. MS medij, s točno određenom količinom mikro i makro nutrijenata, minerala, vitamina i organskih tvari. Taj hranjivi medij je kasnije omogućio primjenjivost u uzgoju stotina drugih biljnih organizama.

Za isključavanje i uzgoj u ovome pokusu se koristio MS $\frac{1}{2}$  medij – podloga prema Murashigeu i Skoogu s pola količine makroelemenata.

#### 3.2.1.1. Priprema otopina (za presađivanje i uzgoj biljaka)

Za pripremu 50 % NaOCl natrijev hipoklorit je u omjeru 1:1 razrijeđen redestiliranom vodom.

Za izradu 500 mL MS<sup>1/2</sup> medija pomiješane su tvari u količinama prikazanim u Tablici 1 te je uz pH-metar namješten pH na 5,6 pomoću 1 M HCl, a smjesa je potom autoklavirana.

**Tablica 1.** Sastav za pripremu 500 mL MS<sup>1/2</sup> medija

Tvar	Količina
Saharoza	7,5 g
MES	0,250 g
Myo-inositol	0,05 g
Vitamin B <sub>1</sub>	50 ml
Makroelement FeSO <sub>4</sub>	1,25 mL
Ostali makroelementi (CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O, Na <sub>2</sub> EDTA, MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> , KNO <sub>3</sub> )	po 2,5 mL svaki
Mikroelementi (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O, KI, Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O, CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O, CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O)	po 500 µL svaki

### 3.2.1.2. *Postupak provođenja biološkog pokusa*

Sjemenke duhana sterilizirane su inkubacijom na miješalici 15 minuta u 50 % (V/V) otopini NaOCl. Potom su nekoliko puta isprane u autoklaviranoj destiliranoj vodi te mikropipetom prebačene u tikvicu u kojoj se nalazilo 5 mL sterilnog MS<sup>1/2</sup> medija. Nakon 9 dana u tikvice sa sjemenkama je dodano još po 3 mL svježeg MS<sup>1/2</sup> medija, a nakon 3 tjedna klijanci su podijeljeni u 4 skupine. Prva skupina tretirana je česticama AgNP-PVP u koncentracijama od 25, 50 i 100 µM (Tablica 2 red a). Druga je skupina tretirana česticama AgNP-PVP u kombinaciji s 5× većom količinom cisteina, odnosno 25 + 125 µM, 50 + 250 µM i 100 + 500 µM AgNP-PVP-a i cisteina (Tablica 2 red b). Treća skupina klijanaca tretirana je isključivo cisteinom, u koncentracijama od 125, 250 i 500 µM te je služila kao kontrola tretmanu AgNP-PVP u kombinaciji s cisteinom (Tablica 2 red c). Četvrta, zadnja skupina klijanaca je služila kao kontrola svih pokusa (Tablica 2 red d) te je u nju dodan čisti MS<sup>1/2</sup> medij, bez dodatka AgNP-PVP-a ili cisteina.

**Tablica 2.** Prikaz tretmana klijanaca duhana

<b>a)</b>	<b>AgNP-PVP</b> ( $\mu\text{M}$ )	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>100</b>
<b>b)</b>	<b>AgNP-PVP</b> ( $\mu\text{M}$ ) + <b>cistein</b> ( $\mu\text{M}$ )	<b>25 + 125</b>	<b>50 + 250</b>	<b>100 + 500</b>
<b>c)</b>	<b>cistein</b> ( $\mu\text{M}$ )	<b>150</b>	<b>250</b>	<b>500</b>
<b>d)</b>	<b>Kontrola</b>	<b>0</b>	<b>-</b>	<b>-</b>

Klijanci su tretirani tjedan dana nakon čega je biljno tkivo bilo uzorkovano te smrznuto na  $-80^{\circ}\text{C}$  i potom liofilizirano te pohranjeno u laboratoriju za daljnju pripremu ekstrakta.

### **3.2.2. Ekstrakcije ukupnih topljivih proteina**

#### **3.2.2.1. Priprema otopina**

Za pripremu ekstrakcijskog kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 najprije je potrebno pripremiti 1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  otapanjem 6,804 g krutog  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i nadopunjavanjem u odmjernoj tikvici do 50 mL redestiliranom vodom. Potom se priprema 1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  otapanjem 8,709 g krutog  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  i nadopunjava u odmjernoj tikvici do 50 mL redestiliranom vodom. Za pripremu 50 mL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 potrebno je pomiješati 1,925 mL 1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  i 3,075 mL 1 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pa nadopuniti s redestiliranom vodom do 50 mL.

#### **3.2.2.2. Postupak**

Izvaganih 500 mg liofiliziranog tkiva stavljeno je u tarionik držan na ledu kako bi se spriječila degradacija proteina. Nakon dodatka malo PVP-40 (vrhom žlice, oko 10 mg) koji sprečava djelovanje biljnih fenolnih komponenti i 1 mL hladnog kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 tučkom su homogenirani uzorci. Homogenat je potom centrifugiran 15 minuta na 14 000 rpm i  $+4^{\circ}\text{C}$ , a njegov supernatant još jednom, 60 minuta pri 14 000 rpm i  $+4^{\circ}\text{C}$ . Tako dobiveni

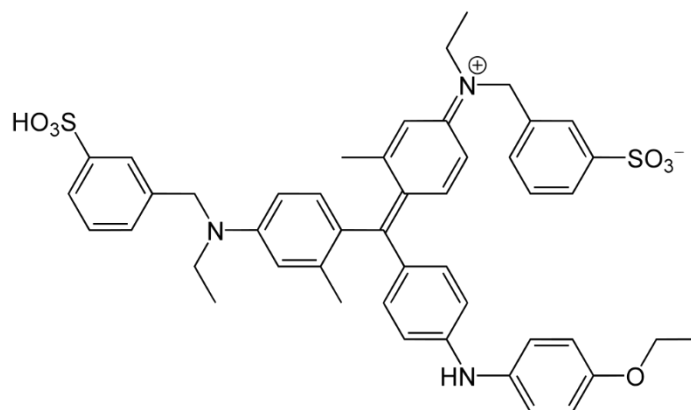
supernatanti tj. ekstrakti klijanaca su služili kao uzorci za određivanje koncentracije ukupnih eksprimiranih proteina te proteinskih karbonila. Do sljedećih analiza pohranjeni su na  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Ekstrakcija kako je opisano je vršena za po 6 replika od sva 3 tretmana (AgNP-PVP, cistein, njihova kombinacija) u svim koncentracijama i za kontrolnu skupinu klijanaca (netretirane biljke).

### 3.2.3. Određivanje koncentracije proteina metodom po Bradfordu

#### 3.2.3.1. Princip metode

Metoda po Bradfordu (1976), razvijena je za određivanje koncentracije ukupnih eksprimiranih topljivih proteina, a temelji se na vezanju boje *Coomassie Brilliant Blue G-250* (CBB) (Slika 7) na proteine. Boja postoji u tri oblika: plavom (anionskom), zelenom (neutralnom) i crvenom (kationskom). U kiselim uvjetima boja CBB prelazi u plavi, anionski oblik te vezuje prisutne proteine ionskim vezama s njihovim amino grupama, što im uzrokuje konformacijsku promjenu tercijarne strukture (Ninfa i sur., 2008). Potom hidrofobne interakcije s novoeksponiranim dijelovima proteina formiraju snažni kompleks s bojom koji ostaje stabilan i prikladan za spektrofotometrijsko mjerenje apsorpcije pri 595 nm. Intenzitet boje proporcionalan je koncentraciji proteina u otopini. Ako proteina u otopini nema, ona ostaje smeđe (crveno) obojana.



**Slika 7.** Boja *Coomassie Brilliant Blue G-250* (CBB) (preuzeto s [https://en.wikipedia.org/wiki/Coomassie\\_Brilliant\\_Blue](https://en.wikipedia.org/wiki/Coomassie_Brilliant_Blue)).

#### 3.2.3.2. Priprema otopina

Bradford matična otopina pripremljena je miješanjem 100 mL 96 % (V/V) etanola, 200 mL 88% (V/V) otopine  $\text{H}_3\text{PO}_4$  i 350 mg CBB G-250 boje za proteine.

Bradford radna otopina pripravljena je tako što je pomiješano 30 mL Bradford matične otopine, 15 mL 96 % etanola i 30 mL 88 % otopine H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> te nadopunjeno s redestiliranom vodom do 500 mL. Potom je otopina filtrirana te je čuvana u tamnoj boci na sobnoj temperaturi.

### 3.2.3.3. Postupak

Prije samog mjerenja apsorbancije u uzorcima, bilo je potrebno napraviti baždarni pravac. On je pripremljen pomoću otopina albumina goveđeg seruma (BSA, engl. *Bovine Serum Albumin*) poznatih koncentracija. Za njegovu izradu korištena je otopina BSA koncentracije 2 mg/mL pripravljena u 0,1 M kalij-fosfatnom puferu te razrijeđena istim puferom kako bi se dobio niz potrebnih koncentracija, kako je prikazano u Tablici 3.

**Tablica 3.** Konačne koncentracije standarda BSA za izradu baždarnog pravca pripravljene iz različitih volumena 2 mg/mL otopine BSA i kalij-fosfatnog pufera pH 7,0

V otopine BSA (2 mg/mL) u mL	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0
V kalij-fosf. pufera pH 7,0 u mL	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
<b>Konačna konc. standarda (mg/mL)</b>	<b>0,2</b>	<b>0,4</b>	<b>0,6</b>	<b>0,8</b>	<b>1,0</b>	<b>1,2</b>	<b>1,4</b>	<b>1,6</b>	<b>1,8</b>	<b>2,0</b>

Za izradu baždarnog pravca je korišteno po 20 µL svakog od pripremljenih standarda BSA i 980 µL Bradford radne otopine. Takva smjesa je lagano promiješana na vortexu te njen sadržaj prebačen u kivetu. Intenzitet dobivenog plavog obojenja mjeren je UV-Vis spektrofotometrom na 595 nm s po 2 replike svakog standarda. Kao slijepa proba umjesto uzorka služio je sam kalij-fosfatni pufer pH 7,0 pomiješan s Bradford radnom otopinom u istom omjeru.

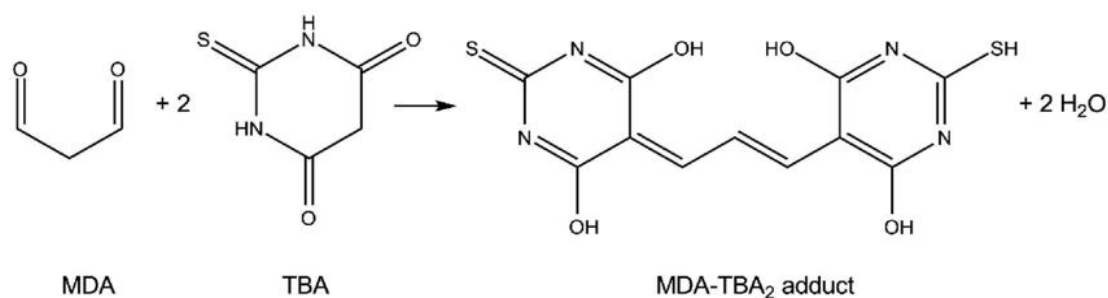
Za mjerenje koncentracije proteina iz ekstrakta klijanaca u 980 µL Bradford radne otopine ispipetirano je 20 µL ekstrakta (priprema ekstrakta opisana u 3.2.2.2.). Reakcijska smjesa je također lagano promiješana na vortexu, sadržaj prebačen u kivetu pa apsorbancija mjerena na 595 nm. Mjerenje je napravljeno za po 6 replika od sva 3 tretmana (AgNP-PVP,

cistein, njihova kombinacija) u svim koncentracijama i za kontrolnu skupinu klijanaca (netretirane biljke). Koncentracija proteina u svakome uzorku, izražena u mg/mL otopine, dobivena je očitavanjem prethodno napravljene baždarne krivulje ovisnosti koncentracije BSA o apsorbanciji na 595 nm. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost tih 6 replika  $\pm$  standardna pogreška.

### 3.2.4. Određivanje koncentracije MDA

#### 3.2.4.1. Princip metode

Za određivanje razine lipidne peroksidacije tj. koncentracije MDA korištena je reakcija s tiobarbituratnom kiselinom (TBA) prema metodi Heatha i Packera (1968). Molekule MDA u kiseljoj okolini s molekulama TBA stvaraju kompleks s konjugiranom dvostrukom vezom u omjeru 1:2 (Slika 8) koji otopinu boji crveno. Intenzitet obojenja koji odgovara koncentraciji nastalog kompleksa mjeri se UV-Vis spektrofotometrom.



**Slika 8.** Reakcija MDA i TBA te stvaranje crveno obojenog kompleksa MDA-TBA<sub>2</sub> (preuzeto s [https://www.researchgate.net/figure/Reaction-of-malondialdehyde-MDA-with-2-molecules-of-2-thiobarbituric-acid-TBA\\_fig1\\_304069866](https://www.researchgate.net/figure/Reaction-of-malondialdehyde-MDA-with-2-molecules-of-2-thiobarbituric-acid-TBA_fig1_304069866)).

#### 3.2.4.2. Priprema otopina

Ekstrakcijska smjesa za lipide bila je 0,3% (m/V) TBA u 10 % trikloroetanoj kiselini (TCA). Prvo je uzeto 10 mL čiste TCA i pomiješano s 90 mL redestilirane vode. Time je dobiveno 100 mL 10 % TCA. Potom je otopljeno 0,3 g TBA u 100 mL 10 % TCA.

#### 3.2.4.3. Postupak

Prije samog određivanja MDA potrebno je ekstrahirati lipide iz uzorka. To je napravljeno tučkom u tarioniku, dodatkom 1500  $\mu$ L reakcijske otopine (0,3 % (m/V) TBA u 10 % TCA) u 45 mg liofiliziranog biljnog tkiva (priprema opisana u 3.2.1.2.). Ta smjesa je potom



prebačena u tubice i stavljena u termomikser, gdje je grijana 30 minuta na 95°C. Tubice su za to vrijeme bile otvorene jer pri toj temperaturi smjesa vrije. Potom su smjese ohlađene, centrifugirane 30 minuta na 14 000 rpm i + 4°C, a dobivenim supernatantima mjerena je apsorbancija na 532 nm i 600 nm. Kao slijepa proba u tom mjerenju služilo je 1500 µL čiste reakcijske smjese otopine TBA u TCA koja je na isti način grijana u termomikseru pa hlađena i centrifugirana prije mjerenja. Razlika apsorbancija na 532 nm i 600 nm je korekcija za specifično zamućenje. Koncentracija lipidnih peroksida izražen kao koncentracija MDA izračunat je pomoću jednadžbe:

$$\text{Koncentracija MDA} = \frac{A_{532} - A_{600}}{m \times \varepsilon \times l} [\mu\text{mol/g liofiliziranog tkiva}]$$

gdje je:

$A_{532}$  – apsorbancija izmjerena na 532 nm

$A_{600}$  – apsorbancija izmjerena na 600 nm

$m$  – masa liofiliziranog tkiva (g)

$\varepsilon$  – molarni apsorpcijski koeficijent (155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

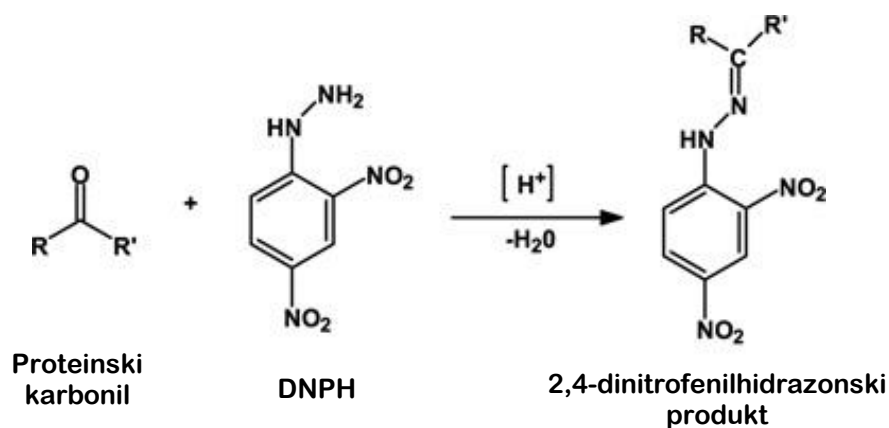
$l$  – duljina puta (1 cm)

Mjerenje je napravljeno za po 6 replika od sva 3 tretmana (AgNP-PVP, cistein, njihova kombinacija) u svim koncentracijama i za kontrolnu skupinu klijanaca (netretirane biljke). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost tih 6 replika ± standardna pogreška.

### **3.2.5. Određivanje koncentracije proteinskih karbonila**

#### **3.2.5.1. Princip metode**

Princip reakcije određivanja proteinskih karbonila zasniva se na reakciji karbonile skupine nastale oksidacijom proteina i distalnog dušika 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). Nukleofilnim napadom dušika na elektrofilni karbonilni atom ugljika eliminira se kisik u obliku vode, a nastali stabilni produkt, 2,4-dinitrofenilhidrazon, može se odrediti spektrofotometrijski (Slika 9) (Dalle-Donne i sur., 2003). Derivatizacija proteinskih karbonila iz uzorka u kvantitativnoj mjeri zahtijeva veliku količinu DNPH reagensa pa je on prisutan u suvišku, ali kasnije mora biti uklonjen ispiranjem sa smjesom etanol:etilacetat (1:1).



**Slika 9.** Reakcija proteinskog karbonila i DNPH uz stvaranje hidrazonskog produkta čija se apsorbanacija mjeri na 370 nm (preuzeto s <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/environmental/carbonyls-sampling-analysis.html> i prilagođeno).

### 3.2.5.2. Priprema otopina

2 M HCl pripravljen je razrjeđivanjem 8,3 mL 33 % HCl s destiliranom vodom do 50 mL. Za dobivanje 50 mL 10 mM DNPH u 2 M HCl, u prethodno pripremljenih 50 mL 2 M HCl dodano je 0,099 g DNPH.

100 mL 10 % TCA dobivena je razrjeđivanjem 100 % TCA, odnosno 10 mL 100 % TCA razrjeđeno je s 90 mL redestilirane vode.

Otopina etanola i etilacetata (1:1) za ispiranje nevezanog reagensa pripremljena je miješanjem jednakih volumena čistog etanola i etilacetata.

Za pripremu 6 M uree u 20 mM kalij-fosfatnog pufera pH 2,4 najprije je izvagano 0,1361 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  koji je otopljen u 40 mL destilirane vode. Potom je otopljeno 18,02 g uree te je otopina do 50 mL nadopunjena destiliranom vodom.

### 3.2.5.3. Postupak

Korištena je metoda po Levinu i suradnicima (1994). Pripremljena su dva seta plastičnih tubica. U prvi je ispipetirano po 20  $\mu\text{L}$  ekstrakta klijanaca (priprema opisana u 3.3.2.2.), 180  $\mu\text{L}$  kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 te dodano 300  $\mu\text{L}$  10 mM DNPH u 2 M HCl. Drugi je služilo kao slijepa proba, s 20  $\mu\text{L}$  ekstrakta klijanaca, 180  $\mu\text{L}$  kalij-fosfatnog pufera pH 7,0 i 300  $\mu\text{L}$  2 M HCl. Sadržaj tubica promiješan je na vorteksu i ostavljen u mraku sat vremena na sobnoj temperaturi uz povremeno protresanje. Nakon toga je u obje tubice dodano 500  $\mu\text{L}$  10 % TCA koja služi za precipitaciju proteina. Nakon 5 minuta na temperaturi - 20°C smjesa je

centrifugirana 10 minuta pri 14 000 rpm i +4°C. Izdvojeni talog u kojem su ciljani protein tri je puta ispran s po 500 µL otopine etanola/etilacetat (1:1) za uklanjanje nevezanog DNPH. Proteinski talog otopljen je u 1 mL 6 M uree u 20 mM kalij-fosfatnog pufera pH 2,4 uz vorteks. Potom je slijedilo spektrofotometrijsko određivanje produkata reakcije oksidiranih proteina i DNPH. Svaki uzorak s DNPH imao je svoju slijepu probu bez DNPH. Mjerena je apsorbancija pri 370 nm, a koncentracija izračunat po sljedećoj formuli:

$$\text{Koncentracija proteinskih karbonila} = \frac{A_{370}}{m \times \varepsilon \times l} [\mu\text{mol/mg proteina}]$$

gdje je:

$A_{370}$  – apsorbancija izmjerena na 370 nm

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

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

$l$  – duljina optičkog puta (1 cm)

Mjerenje je napravljeno za po 6 replika od sva 3 tretmana (AgNP-PVP, cistein, njihova kombinacija) u svim koncentracijama i za kontrolnu skupinu klijanaca (netretirane biljke). Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost tih 6 replika ± standardna pogreška.

### 3.3. Statistička obrada podataka

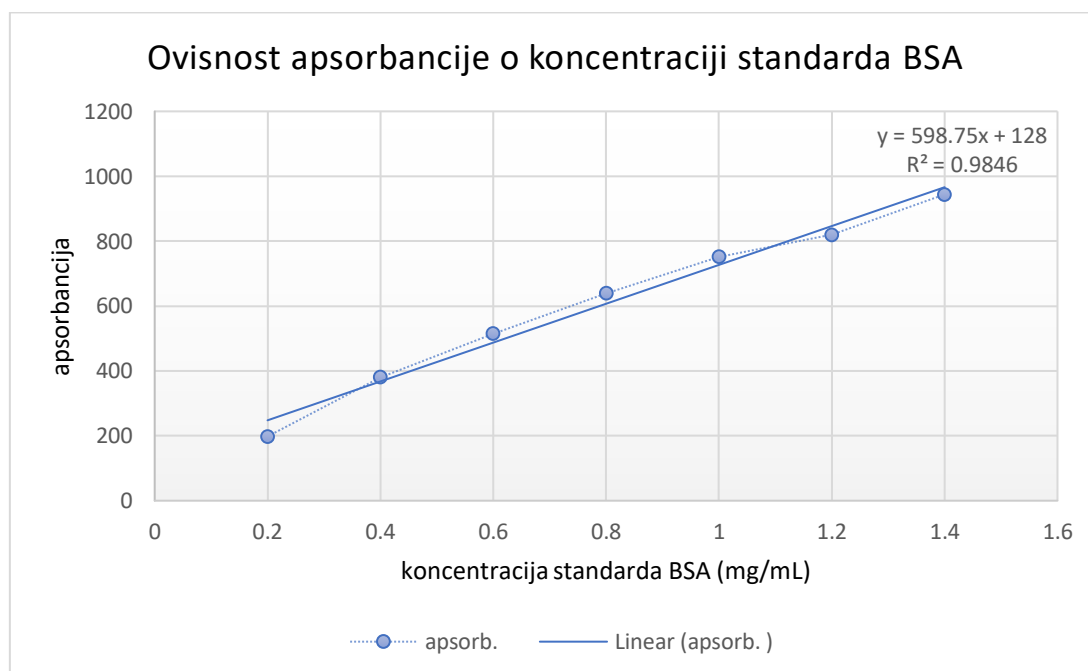
Svi podaci su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika ± standardne pogreške. Za statističku obradu rezultata korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA, engl. *analysis of variance*), nakon koje je proveden post-hoc Duncan test. Za tumačenje statistički obrađenih rezultata značajnom je uzeta razlika  $p \leq 0,05$ . Za to je korišten računalni program Statistica 12.0 (Stat Soft Inc., SAD).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Ukupni proteini

Ukupna koncentracija proteina ekstrahirana iz klijanaca duhana mjerena je kako bi se utvrdilo postoji li utjecaj AgNP-PVP, AgNP-PVP u kombinaciji s cisteinom ili samog cisteina na količinu eksprimiranih proteina u biljci. Promjena koncentracije eksprimiranih proteina općeniti je pokazatelj da stanica reagira na promijenjene uvjete u okolini. Koncentracija proteina mjerena je metodom po Bradfordu.

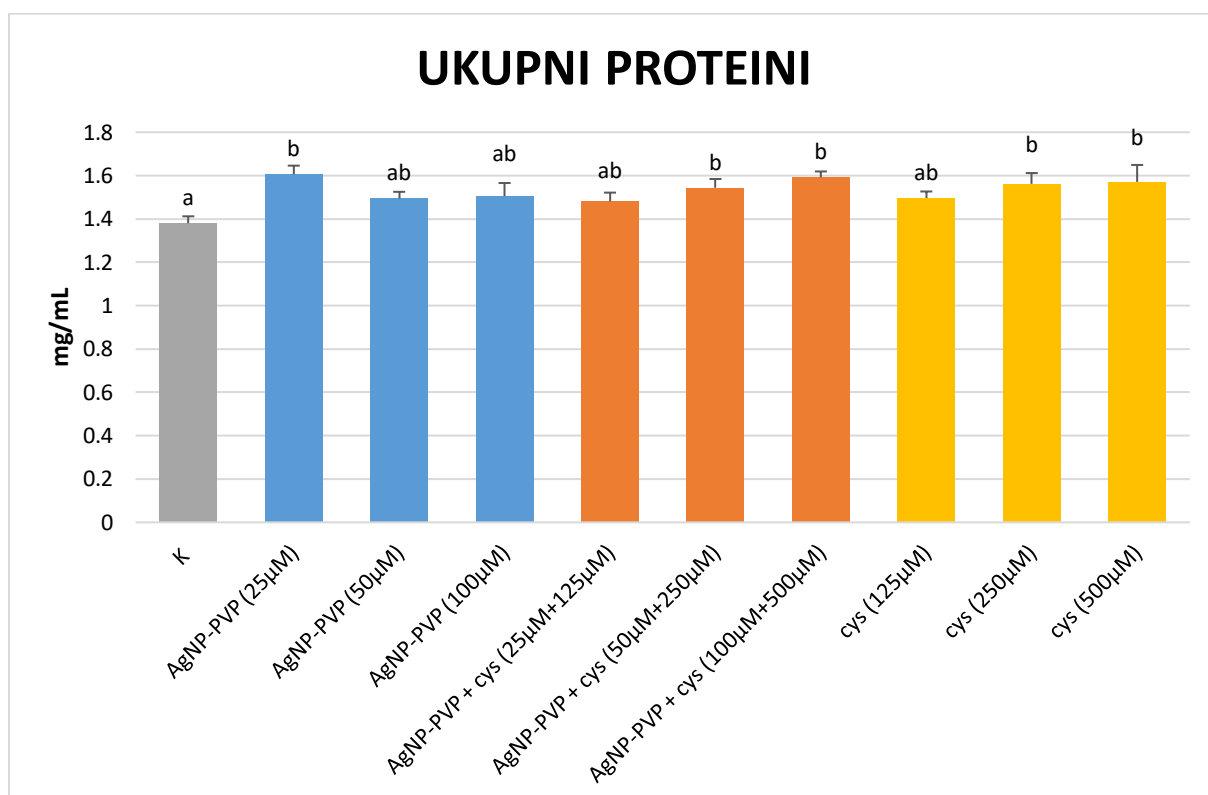
Mjerenjem apsorbancije standarda BSA koji su imali koncentraciju od 0,2 do 1,4 mg/mL provjerena je linearnost metode. Na Slici 10 prikazan je dobiveni baždarni dijagram ovisnosti apsorbancije o koncentraciji standarda BSA koji je bio linearan, s koeficijentom linearnosti  $R^2 = 0,9846$  te jednadžbom pravca  $y = 598,75x + 128$ .



**Slika 10.** Baždarni dijagram ovisnosti koncentracije proteina (BSA) o izmjerenoj apsorbanciji napravljen mjerenjem apsorbancije standardnih otopina BSA koncentracija od 0,2 do 1,4 mg/mL.

Nakon što je utvrđena linearnosti metode, napravljene su analize uzoraka nepoznate koncentracije. U uzorcima nepoznate koncentracije iz vrijednosti apsorbancije odčitana je koncentracija proteina pomoću dobivenog baždarnog dijagrama.

U odnosu na kontrolnu skupinu klijanaca duhana samo je najniža koncentracija AgNP-PVP, ona od 25  $\mu\text{M}$ , uzrokovala statistički značajan porast koncentracije proteina. Statistički značajan porast koncentracije eksprimiranih proteina izazvali su i tretmani s dvjema višim koncentracijama kombinacije AgNP-PVP i cisteina (50  $\mu\text{M}$  + 250  $\mu\text{M}$  i 100  $\mu\text{M}$  + 500  $\mu\text{M}$  AgNP-PVP i cistein) te tretmani s dvjema višim koncentracijama cisteina (250  $\mu\text{M}$  i 500  $\mu\text{M}$ ). Svi ostali tretmani su također uzrokovali porast ekspresije proteina u odnosu na kontrolu, ali taj porast nije bio značajan (Slika 11).

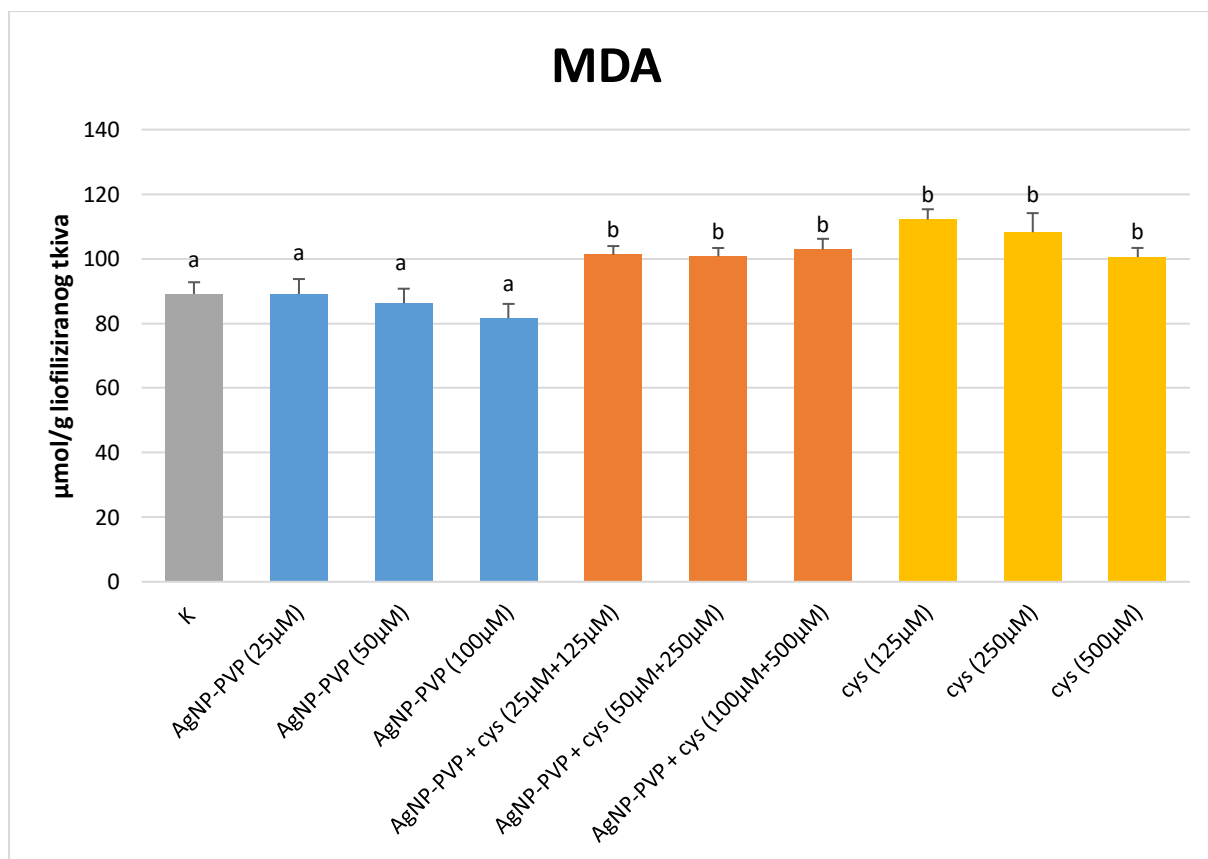


**Slika 11.** Koncentracija ukupnih proteina nakon 7-dnevnog tretmana AgNP-PVP-om (plava boja), AgNP-PVP + cisteinom (narančasta boja) i sa samim cisteinom (žuta boja). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

## 4.2. MDA

Koncentracija MDA mjerena je kao pokazatelj peroksidacije lipida stanica klijanaca duhana, posljedice oksidacijskog stresa staničnih lipida nakon tretmana klijanaca duhana s AgNP-PVP, kombinacijom AgNP-PVP i cisteina te samim cisteinom.

Kako je vidljivo na Slici 12 koncentracija MDA u stanicama klijanaca tretiranih AgNP-PVP-om bila je jednaka ili čak i manja od kontrolne skupine. Tretmani kombinacijom AgNP-PVP-a i cisteina i samim cisteinom doveli su do statistički značajno više koncentracije MDA u stanicama klijanaca u odnosu na kontrolnu skupinu. Uz navedene rezultate vidljivo je i da izmjerena koncentracija MDA u stanicama klijanaca opada porastom koncentracije AgNP-PVP-a i porastom koncentracije cisteina (Slika 12, prikazano plavom i žutom bojom).

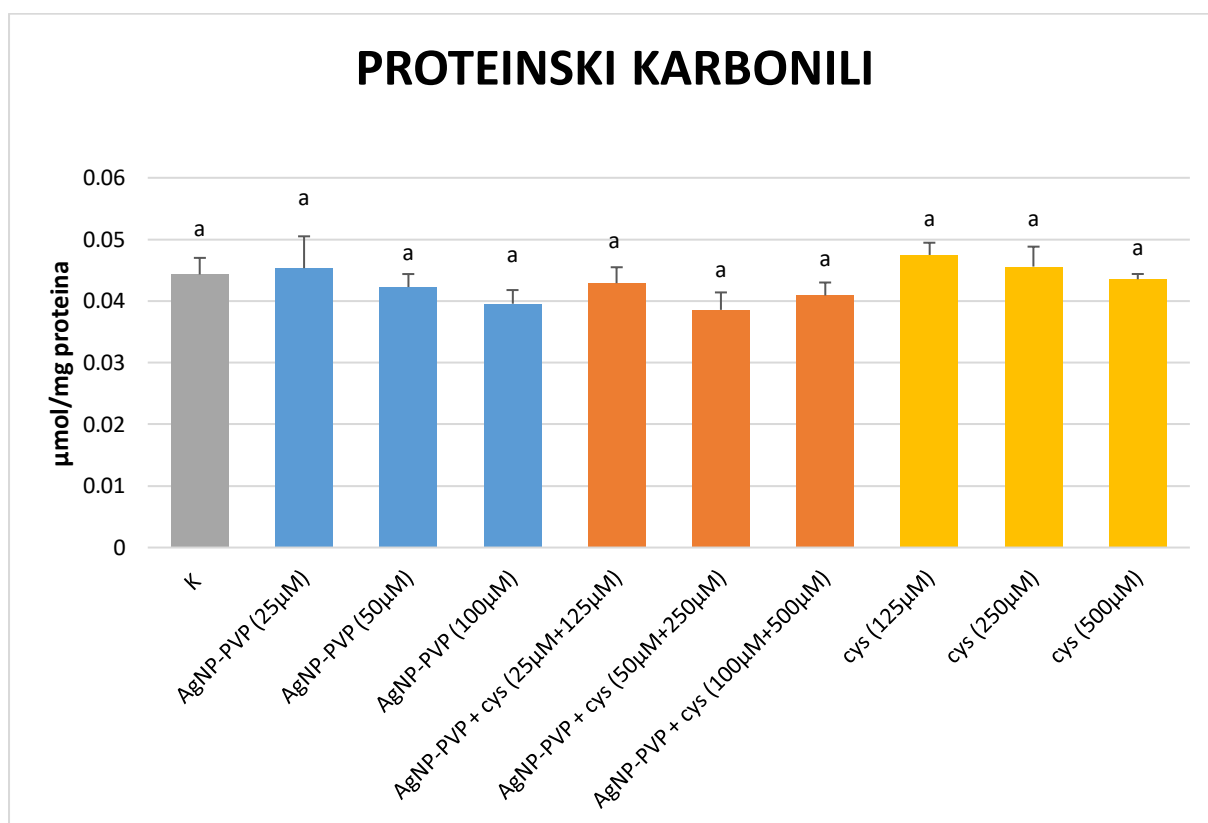


**Slika 12.** Koncentracija MDA nakon 7-dnevnog tretmana AgNP-PVP-om (plava boja), AgNP-PVP + cisteinom (narančasta boja) i sa samim cisteinom (žuta boja). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

### 4.3. Proteinski karbonili

Kao stabilni biomarkeri oksidativnog stresa nakon tretmana klijanaca duhana s AgNP-PVP, AgNP-PVP i cisteina te samim cisteinom uz MDA izmjereni su i proteinski karbonili. Proteinski karbonili posljedica su oksidacijskog oštećenja proteina.

Dobiveni rezultati prikazani su na Slici 13. Niti jedan tretman, uključujući sve ispitivane koncentracije AgNP-PVP-a, cisteina ili njihove kombinacije, nije imao za ishod statistički značajnu promjenu koncentracije proteinskih karbonila u klijancima duhana u odnosu na kontrolu. Iz grafičkog prikaza na Slici 13 je vidljiv pad koncentracije proteinskih karbonila porastom koncentracije AgNP-PVP-a i porastom koncentracije cisteina (prikazano plavom i žutom bojom), ali taj pad nije bio statistički značajan.



**Slika 13.** Koncentracija proteinskih karbonila nakon 7-dnevnog tretmana AgNP-PVP-om (plava boja), AgNP-PVP + cisteinom (narančasta boja) i sa samim cisteinom (žuta boja). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika  $\pm$  standardna pogreška. Stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju ( $p < 0,05$ ).

## 5. RASPRAVA

Dosadašnja ekotoksikološka ispitivanja pokazala su štetnost različitih nanočestičnih materijala čija produkcija i korištenje konstantno rastu na globalnoj razini (Navarro i sur., 2008a; Nowack i Bucheli, 2007). Jedan od najšire upotrebljivanih nanomaterijala je AgNP. Postoje istraživanja koja pokazuju da je AgNP toksičan te je povezan s pojavom oksidacijskog stresa u različitim organizmima ekosistema (Navarro i sur., 2008b; Tkalec i sur., 2019). Povezivanje AgNP s oksidacijskim stresom ne čudi stoga što se kao mehanizam baktericidnosti AgNP-a navodi povećana produkcija ROS-ova unutar bakterija (Xu i sur., 2012). AgNP također djeluje oštećenjem stanične membrane i makromolekula u stanici bakterije te otpuštanjem po nju štetnih iona srebra (Morones i sur., 2005).

Stoga je u ovom istraživanju odabrano na biljnom modelnom organizmu, klijancima duhana (*Nicotiana tabacum*), mjeriti parametre oksidacijskog stresa povezane sa štetnim učinkom AgNP-a. Pored toga je ispitano je li moguće cisteinom, snažnim kelatorom slobodnih iona srebra, prevenirati pojavu oksidacijskog stresa izazvanog AgNP-om uzrokovan oslobađanjem iona srebra iz AgNP. Kako bi se dobio odgovor na to pitanje, klijanci su u 7-dnevnom tretmanu bili izloženi česticama AgNP-PVP, kombinaciji AgNP-PVP i cisteina i samom cisteinu te je potom praćena koncentracija proteina i koncentracija parametara oksidacijskog stresa, MDA i proteinskih karbonila. Prvi tretman, onaj s AgNP-PVP trebao je izazvati oksidacijski stres. Drugi tretman, AgNP-PVP u kombinaciji s cisteinom trebao je biti tretman koji bi pokazao razlikuje li se utjecaj AgNP-PVP-a kada se uklone oslobođeni ioni srebra i time može li cistein potencijalno zaštititi biljku od štetnih posljedica iona srebra oslobođenih iz AgNP-PVP-a. Treći tretman, samo s cisteinom trebao je pokazati doprinos promjena parametara oksidacijskog stresa uzrokovanih samim cisteinom, odnosno bio je kontrola tretmanu AgNP-PVP u kombinaciji s cisteinom.

Koncentracija proteina mjerena je iz ekstrakta stanica klijanaca duhana metodom po Bradfordu (1976), kod koje je apsorbancija otopine koja sadrži boju CBB G-250 proporcionalna koncentraciji proteina u uzorku. Koncentracija se odredila usporedbom s baždarnim pravcem, napravljenim mjerenjem apsorbancija standardnih otopina poznatih koncentracija proteina BSA UV-Vis spektrofotometrom. Lipidna peroksidacija praćena je određivanjem koncentracije MDA, jednog od produkata tog procesa. Nakon ekstrakcije lipidnog sloja, kvantifikacija se provela reakcijom MDA s TBA. Nastali obojeni kompleks može se odrediti UV-Vis



spektrofotometrom. Koncentracija proteinskih karbonila, produkta oksidativnog oštećenja proteina određena je u reakciji s DNPH, a konačni produkt reakcije, 2,4-dinitrofenilhidrazonski produkt, također se kvantificirao UV-Vis spektrofotometrom.

Rezultati ovog ispitivanja su pokazali da je koncentracija ukupnih proteina u biljnim stanicama klijanaca duhana samo blago porasla u svim tretmanima, a značajan porast zabilježen je nakon tretmana s 25  $\mu\text{M}$  AgNP-PVP. Također, koncentracija proteina značajno je porasla nakon tretmana kombinacije AgNP-PVP s cisteinom i to dvije više koncentracije kombinacije AgNP-PVP + cistein (50 + 250  $\mu\text{M}$  i 100 + 500  $\mu\text{M}$ ) te nakon tretmana s dvije više koncentracije samog cisteina (250  $\mu\text{M}$  i 500  $\mu\text{M}$ ). I druga su istraživanja zabilježila porast koncentracije proteina nakon tretmana s AgNP. Porast koncentracije ukupnih proteina zabilježen je prilikom ispitivanja učinka čestica AgNP-PVP i AgNP-citrat na korjenčiće luka u koncentracijskom rasponu od 25 do 500  $\mu\text{M}$  AgNP (Milošić, 2014). Porast ukupnih proteina također je zabilježen i prilikom ispitivanja utjecaja 10  $\text{mg}/\text{dm}^3$  AgNP-PVP i 0,5 do 10  $\text{mg}/\text{dm}^3$  AgNP s omotačem od arapske gume (AgNP-GA) (koncentracije slične ovom ispitivanju) na vrstu *Spirodela polyrhiza* (Jiang i sur., 2014). U ispitivanju koje je provela Milošić (2014) na korjenčićima luka tretiranim AgNP s omotačem od cetiltrimetilamonijevog bromida (AgNP-CTAB; 25 – 500  $\mu\text{M}$ ) nije došlo do promijene koncentracije ukupnih proteina. Jiang i suradnici (2014) u svome radu pojašnjavaju kako izlaganje metalima može potaknuti stanice na povećanu sintezu proteina i njihovo iskorištenje, i to enzima uključenih u antioksidacijski mehanizam, kao što su SOD, APX, PPX, CAT. No, sadržaj ukupnih proteina nije specifičan parametar koji može potvrditi da je biljka pod stresom jer ga se može pripisati različitim proteinima, tako da ga je obavezno kombinirati s rezultatima drugih parametara oksidacijskog stresa.

Rezultati mjerenja koncentracije MDA pokazali su da AgNP-PVP ne uzrokuje oštećenje lipida. Koncentracija MDA porastom koncentracije AgNP-PVP od 25  $\mu\text{M}$  do 100  $\mu\text{M}$  samo blago opada, ali ne statistički značajno. Nepromijenjene koncentracije MDA zabilježene su u korijenu duhana nakon tretmana s AgNP-citratom u koncentracijama od 25 do 500  $\mu\text{M}$  te listu duhana nakon tretmana s AgNP-citratom u koncentracijama od 25 do 100  $\mu\text{M}$  (Bajan, 2017). Značajno smanjenje koncentracije MDA zabilježeno je u biljnoj vrsti *Pelargonium zonale* koja je bila tretirana nešto višim koncentracijama AgNP (20-80  $\text{mg}/\text{dm}^3$ ) (Hatami i Ghorbanpour, 2013); u vrsti *Gerbera jamesonii*, koja je bila izložena približno jednakim koncentracijama AgNP kao i u ovom istraživanju (1 -5  $\text{mg}/\text{dm}^3$ ) (Kazemi i Ameri, 2012); te u korjenčićima luka tretiranim AgNP-citratom i AgNP-PVP-om u koncentracijama od 25 do 500  $\mu\text{M}$  (Milošić, 2014). Na kalusima kultivara pšenice pri tretmanima višestruko većih koncentracija AgNP-a od ovog ispitivanja (od 20 do 60 ppm) zabilježen je porast koncentracije MDA (Barbasz i sur.,

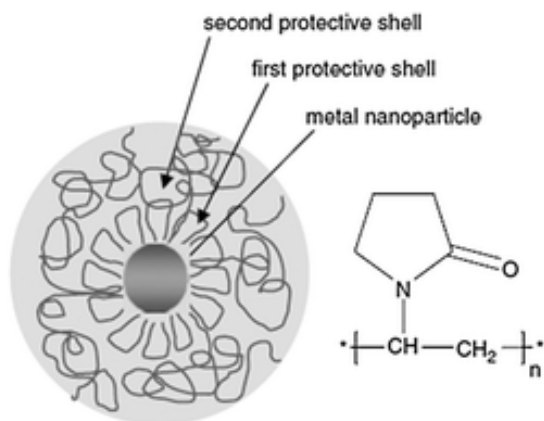
2016). Također, na klijancima riže i *Arabidopsis* nakon tretmana s koncentracijama AgNP nižim od ovog ispitivanja, točnije od 0,2 do 1 mg/dm<sup>3</sup> došlo je do porasta koncentracije MDA (Nair i Chung, 2014b; Nair i Chung, 2014a). Porast koncentracije MDA zabilježen je u listu duhana nakon tretmana s AgNP-citrat u koncentraciji od 500 μM (Bajan, 2017) i u korjenčićima luka tretiranim s AgNP-CTAB u koncentraciji od 25 do 500 μM (Milošić, 2014). Prethodna ispitivanja na klijancima duhana pokazuju početni porast koncentracije MDA nakon tretmana s 100 μM AgNP-citrat (Biba, 2016), za razliku od rezultata u ovom ispitivanju u kojem su korištene iste koncentracije AgNP, ali stabilizirane s PVP. U svom istraživanju Biba (2016) nakon tretmana s AgNP-citrat u koncentraciji od 500 μM u klijancima duhana bilježi pad koncentracije MDA, no u ovom ispitivanju tako visoka koncentracija AgNP nije korištena. Slični rezultati početnog porasta, a potom i pada koncentracije MDA zabilježeni su i u biljci *S. polyrhiza* nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNP-GA (Jiang i sur., 2014), primijenjenim u koncentracijama približnim ili nižim nego u ovom ispitivanju (0,5 do 10 mg/dm<sup>3</sup>). Moguće objašnjenje je da pri porastu koncentracija nanočestica raste i oksidacijski stres na biljne stanice, što u jednom trenutku rezultira prestankom stvaranja novih molekula MDA zbog nekroze stanica. U ovom istraživanju nakon tretmanima s AgNP-PVP u kombinaciji s cisteinom i nakon tretmana sa samim cisteinom koncentracija MDA je značajno porasla. Takvi rezultati bude sumnju da bi i sam cistein mogao biti uzročnik lipidne peroksidacije. No, takve hipoteze nisu poduprte nikakvim dosadašnjim istraživanjima navedenim u dostupnoj literaturi.

Tretman s AgNP-PVP-om nije doveo do statistički značajnih promjena koncentracije proteinskih karbonila u odnosu na kontrolnu skupinu. Također, ni preostali tretmani (AgNP-PVP s cisteinom i samim cisteinom) nisu doveli do promijena u koncentraciji proteinskih karbonila. U sličnom istraživanju provedenom na klijancima duhana tretiranim s AgNP-citratom u koncentracijama od 50 do 500 μM došlo je do porasta koncentracije proteinskih karbonila (Biba, 2016). Tretman s česticama AgNP primijenjenim u koncentracijama nešto nižim od onih korištenih u ovom istraživanju (0,2, 0,5, 1 mg/dm<sup>3</sup>) u *Arabidopsis* i riži izazvao je porast koncentracije proteinskih karbonila (Nair i Chung, 2014a; Nair i Chung, 2014b). Istraživanje na korjenčićima luka tretiranim AgNP-citratom u koncentraciji od 25 do 500 μM zabilježilo je pad koncentracije proteinskih karbonila u odnosu na kontrolu u svim primjenjenim koncentracijama AgNP-citrata (Milošić, 2014). Ipak, koncentracija proteinskih karbonila nije se promijenila u korjenčićima luka tretiranim s AgNP-PVP ni AgNP-CTAB u koncentracijama od 25 do 500 μM (Milošić, 2014) kao ni u stanicama korijena i listova duhana izloženih djelovanju AgNP-citrat (25 do 500 μM) (Bajan, 2017), što je u skladnosti s rezultatima dobivenim u ovom istraživanju.

Iz rezultata dobivenih u ovom istraživanju vidljivo je kako klijanci duhana nakon 7-dnevne izloženosti česticama AgNP-PVP u koncentracijama od 25 do 100  $\mu\text{M}$  nisu razvili stresni odgovor. U literaturi je navedeno kako različiti metali i nanočestični materijali poput AgNP uzrokuju oksidacijski stres koji polučuje oksidativno oštećenje proteina i lipida (Balen i sur., 2011b; Tkalec i sur., 2014; Tkalec i sur., 2019) pa je stoga teško izostanak „stresnih“ rezultata pripisati mjerenju neodgovarajućih parametara. Ostaje pitanje kakvi bi rezultati bili da su korištene više koncentracije AgNP ili AgNP s drugom vrstom omotača.

Ovo istraživanje pokušalo je dati odgovor na pitanje koja je uloga iona srebra ( $\text{Ag}^+$ ) u toksičnosti AgNP te može li se dio učinka AgNP-PVP pripisati ionima srebra ( $\text{Ag}^+$ ) te je stoga u istraživanju korišten i cistein kao kelator srebra. Prethodna ispitivanja s AgNP stabiliziranim s ugljikovim omotačem pokazala su značajnu razliku između tretmana AgNP-om i tretmana kombinacijom AgNP-a i cisteina kao kelatora iona srebra, što ukazuje da dio učinka dolazi i od oslobođenih iona srebra (Navarro i sur., 2008b). Međutim drugi istraživači nisu uočili zaštitni učinak cisteina, odnosno nije uočena razlika u toksičnim učincima prilikom tretmana s AgNP-GA i AgNP-GA s cisteinom (Yin i sur., 2011). Pretpostavlja se da kod AgNP-GA, arapska guma (GA, engl. *gum arabic*) djeluje kao sterički omorač te da AgNP-GA ne otpuštaju ione srebra za razliku od AgNP s ugljikovim omotačem.

U ovom istraživanju korišten je PVP kao stabilizator AgNP. PVP ovojnica također sterički štiti AgNP (Slika 14) i smatra se da bolje prevenira agregaciju, aglomeraciju i gubljenje oblika i veličine AgNP-a u usporedbi s, primjerice citratnom ovojnicom (Tejamaya i sur., 2012). Citratni omotač AgNP korišten u istraživanju na klijancima duhana djeluje na principu stabilizacije suprotnih naboja srebra i citrata (Biba, 2016). U radu Silve (2011) dokazana je manja toksičnost AgNP-PVP nego onog s citratnom ovojnicom, a ispitivanje je provedeno na bakterijama *Escherichia coli* i velikoj vodenbuhi, *Daphnia magna*, životinjskom modelnom organizmu. U svome radu Calderón-Jiménez i suradnici (2017) spominju kako takva „dobra“ stabilizacija AgNP-a koja bi bila pogodna za okoliš može imati utjecaj na njihove fizikalne i kemijske osobine te im posljedično smanjiti uporabnu vrijednost i ograničiti korištenje. Stoga se može zaključiti da PVP stabilizira AgNP toliko da se slobodni ioni srebra uopće ne ispuštaju u okolinu, što bi objasnilo zašto u ovom istraživanju nema uočenih razlika u tretmanima AgNP-PVP samim i uz cistein.



**Slika 14.** Skica nanočestice srebra s polivinilpirolidonskom ovojnicom (AgNP-PVP) (preuzeto s <https://pubs.rsc.org/image/article/2011/CP/c0cp02680h/c0cp02680h-f9.gif> ).

Iz svega navedenoga može se zaključiti da različite biljke na AgNP kao stresor reagiraju svojstveno. Kada se rezultati usporede s drugim istraživanjima, zaključuje se da vrsta ovojnice uvelike utječe na promjenu parametara oksidacijskog stresa. Nisu zanemarivi ni ostali parametri ispitivanja: koncentracija nanočestica, duljina i način njihove izloženosti i mjereni parametri.

## 6. ZAKLJUČCI

Nakon provedenog istraživanja i usporedbe s dostupnom literaturom može se zaključiti sljedeće:

1. Nakon sedmodnevnog tretmana česticama AgNP-PVP u klijanacima duhana nije došlo do značajnog porasta parametara oksidacijskog stresa, MDA i proteinskih karbonila, u odnosu na netretiranu skupinu klijanaca te se može zaključiti da AgNP-PVP u ovim eksperimentalnim uvjetima (modelni organizam, koncentracija i dužina tretmana) nije izazvao oksidacijski stres.
2. Značajne razlike u mjerenim parametrima nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNP-PVP u kombinaciji s cisteinom nije bilo, što dovodi do zaključka da PVP omotač stabilizira AgNP tako da ne dolazi do oslobađanja iona srebra (i ispoljavanja njihove toksičnosti).

Za kraj treba reći kako istraživanja o ekotoksičnosti nanomaterijala pa tako i fitotoksičnosti nanočestičnog srebra valja nastaviti, a njihove rezultate pratiti sa zakonskom regulacijom tržišta. Zdravstveno i ekološki sigurno napredovanje u polju nanotehnologije trebao bi nam svima biti imperativ stoga su proaktivna istraživanja neophodna i kritična točka u očuvanju prikladne upotrebe nanotehnologije.

## 7. LITERATURA

Awasthi YC, Yang Y, Tiwari NK, Patrick B, Sharma A, Li J, Awasthi S. Regulation of 4-hydroxynonenal-mediated signaling by glutathione S-transferases. *Free Radic Biol Med*, 2004, 37(5), 607-619.

Bajan Ž. Oksidacijski stres u biljkama duhana (*Nicotiana tabacum* L.) izloženim nanočesticama srebra. Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2017.

Balen B, Tkalec M, Šikić S, Tolić S, Cvjetko P, Pavlica M, Vidaković Cifrek Ž. Biochemical responses of *Lemna minor* experimentally exposed to cadmium and zinc. *Ecotoxicology*, 2011b, 20, 815-826.

Barbasz A, Kreczmer B, Oćwieja M. Effects of exposure of callus cells of two wheat varieties to silver nanoparticles and silver salt (AgNO<sub>3</sub>). *Acta Physiol Plant*, 2016, 38, 76.

Biba R. Utjecaj nanočestica srebra na pojavu oksidacijskog stresa i ekspresiju proteina u klijancima duhana (*Nicotiana tabacum*). Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2016.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72, 248-254.

Brar DS i Khush GS. Cell and tissue culture for plant improvement. U: Mechanisms for plant growth and improved productivity – Modern approaches. Basra AS, urednik, New York, *Mercel Dekker Inc*, 1994, str. 229-278.

Calderón-Jiménez B, Johnson ME, Montoro Bustos AR, Murphy KE, Winchester MR, Vega Baudrit JR. Silver Nanoparticles: Technological Advances, Societal Impacts, and Metrological Challenges. *Front Chem*, 2017, 5, članak 6.

Colvin VL. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nat Biotechnol*, 2003, 21, 1166–1170.

Dalle-Donne I, Rossib R, Giustarinib D, Milzania A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*, 2003, 329, 23-38.

Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res B*, 2000, 52(4), 662-668.

Flick CE, Evans DA. Tobacco. U: Hand book of plant cell culture. Sharp WR, Evans DA, Ammirato PV, Yamada Y, urednici, London, *Collier Macmillan Publishers*, 1984, str. 606-630.

Gill SS, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Biochem*, 2010, 48, 909-930.

Hatami M, Ghorbanpour M. Effect of nanosilver on physiological performance of *Pelargonium* plants exposed to dark storage. *J Appl Hortic*, 2013, 21(1), 15-20.

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

How are nanomaterials regulated in the EU? <https://ec.europa.eu/jrc/en/science-update/how-are-nanomaterials-regulated-eu>, pristupljeno 17. 8. 2019.

Inshakova E, Inshakov O, World market for nanomaterials: structure and trends, *MATEC Web Conf*, 2017, 129, 02013.

Ivanković M. Nanomaterijali i nanoproizvodi – mogućnosti i rizici. *Polimeri*, 2011, 32, 23-28.

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

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

Kesić A, Horozić E. Prednosti i neželjeni efekti primjene metalnih nanočestica i metalnih oksida u farmaceutskim i kozmetičkim preparatima. ŠESTI MEĐUNARODNI KONGRES „BIOMEDICINA I GEONAUKE-UTICAJ ŽIVOTNE SREDINE NA ZDRAVLJE LJUDI“, Beograd, 2016, 218-225.

Kesser R. Engineered Nanoparticles in Consumer Products. *Environ Health Perspect*, 2011, 119(3), 120-125.

Križanac Š. Klinička patofiziologija: za studente Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta. U: Osnove patofiziologije, Kujundžić M, urednik, Zagreb, Farmaceutsko-bijekemijski fakultet, 2003, str. 1-10.

Lansdown AB. Silver I: Its antibacterial properties and mechanism of action. *J Wound Care*, 2002, 11, 125-130.

Lanje AS, Sharma SJ, Pode RB. Synthesis of silver nanoparticles: a safer alternative to conventional antimicrobial and antibacterial agents. *J Chem Pharm Res*, 2010, 2, 478-483.

Leung BO, Jalilehvand F, Mah V, Parvez M, Wu Q. Silver(I) Complex Formation with Cysteine, Penicillamine, and Glutathione. *Inorg Chem*, 2013, 52(8), 4593-4602.

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

Ma X, Geisler-Lee J, Deng Y, Kolmakov A. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Sci Total Environ*, 2010, 481(16), 3053-3061.

Mason RP, Chignell CF. Free Radicals in Pharmacology and Toxicology - Selected Topics. *Pharmacol Rev*, 1981, 33(4), 189-211.

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

Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 2002, 7, 405-410.

Monica RC, Cremonini R. Nanoparticles and higher plants. *Caryologia*, 2009, 62(2), 161-165.

Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, Yacaman MJ. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 2005, 16(10), 2346-2353.

Moskovitz J, Oien DB. Protein Carbonyl and the Methionine Sulfoxide Reductase System. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 12, 405-415.

Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol Plant*, 1962, 15, 473-479.



Nair PM, Chung IM. Assessment of silver nanoparticle-induced physiological and molecular changes in *Arabidopsis thaliana*. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2014a, 21(14), 8858-8869.

Nair PM, Chung IM. Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere*, 2014b, 112, 105-113.

Nano.gov – Nanotechnology, <https://www.nano.gov/nanotech-101/what/definition>, pristupljeno 17. 8. 2019.

Nanočestica s PVP ovojnicom, <https://pubs.rsc.org/image/article/2011/CP/c0cp02680h/c0cp02680h-f9.gif>, pristupljeno 17. 8. 2019.

Nanomaterijali – ECHA, <https://echa.europa.eu/hr/regulations/nanomaterials>, pristupljeno 17. 8. 2019.

Navarro E, Baun A, Behra R, Hartmann NB, Filser J, Miao A, Quigg A, Santschi PH, Sigg L. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 2008, 17, 372–386.

Navarro E, Piccapietra F, Wagner B, Marconi F, Kaegi R, Odzak N, Sigg L, Behra R. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ Sci Technol*, 2008b, 42, 8959-8964.

Ninfa AJ, Ballou DP, Benore M. *Fundamental Laboratory Approaches for Biochemistry and Biotechnology*, 2nd Edition. New Jersey, SAD, Wiley, 2009, str. 113.

Nowack B, Bucheli TD. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ Pollut*, 2007, 50, 5-22.

Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv*, 2009, 27, 76-83.

Reakcija karbonil + DNPH, <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical/environmental/carbonyls-sampling-analysis.html>, pristupljeno 17. 8. 2019.

Reakcija MDA + TBA, [https://www.researchgate.net/figure/Reaction-of-malondialdehyde-MDA-with-2-molecules-of-2-thiobarbituric-acid-TBA\\_fig1\\_304069866](https://www.researchgate.net/figure/Reaction-of-malondialdehyde-MDA-with-2-molecules-of-2-thiobarbituric-acid-TBA_fig1_304069866), pristupljeno 17. 8. 2019.

- Reuben C. Opasni slobodni radikali. U: Antioksidansi. Izvori, 1998, str. 20-30.
- Rhee SG. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a Necessary Evil for Cell Signaling. *Science*, 2006, 312, 1882-1883.
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *J Bot*, 2012, Article ID 217037.
- Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, 1997, 82, 291- 295.
- Silva TU. An evaluation of coating material dependent toxicity of silver nanoparticles. Electronic Theses and Dissertations, East Tennessee State University, Johnson City, SAD, 2011, Paper 1229.
- Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis*, 2000, 5, 415–418.
- Suzuki YJ, Carini M, Butterfield DA. Protein Carbonylation. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 12(3), 323–325.
- Tang J, Xiong L, Wang S, Wang J, Liu L, Li J, Yuan F, Xi T. Distribution, Translocation and Accumulation of Silver Nanoparticles in Rats. *J Nanosci Nanotechnol*, 2009, 9(8), 4924-4932.
- Tejamaya M, Römer I, Merrifield RC, Lead JR. Stability of Citrate, PVP, and PEG Coated Silver Nanoparticles in Ecotoxicology Media. *Environ Sci Technol*, 2012, 46(13), 7011-7017.
- Tkalec M, Peharec Štefanić P, Balen B. Chapter Six - Phytotoxicity of silver nanoparticles and defence mechanisms. *Compr Anal Chem*, 2019, 84, 145-198.
- Tkalec M, Štefanić PP, Cvjetko P, Šikić S, Pavlica M, Balen B. The effects of cadmium-zinc interactions on biochemical responses in tobacco seedlings and adult plants. *PLoS ONE*, 2014, 9(1): e87582.
- Update of the Workplan on Nanomaterials – ECHA, [https://echa.europa.eu/documents/10162/21844190/mb\\_41\\_2015\\_workplan\\_nanomaterials\\_in\\_cl\\_annexes\\_en.pdf/20da85dc-6ca0-46f1-bfd5-50b92d015c2a](https://echa.europa.eu/documents/10162/21844190/mb_41_2015_workplan_nanomaterials_in_cl_annexes_en.pdf/20da85dc-6ca0-46f1-bfd5-50b92d015c2a), pristupljeno 17. 8. 2019.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biol Inter*, 2006, 160, 1–40.
- Vertuani S, Angusti A, Manfredini S. The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(14), 1677-1694.

Xu H, Qu F, Xu H, Lai W, Wang YA, Aguilar ZP, Wei H. Role of reactive oxygen species in the antibacterial mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli* O157:H7. *BioMetals*, 2012, 25, 45–53.

Yin L, Cheng Y, Espinasse B, Colman BP, Auffan M, Wiesner M, Rose J, Liu J, Bernhardt ES. More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environ Sci Technol*, 2011, 45(6), 2360-2367.

Yin L, Colman BP, McGill BM, Wright JP, Bernhardt ES. Effects of Silver Nanoparticle Exposure on Germination and Early Growth of Eleven Wetland Plants. *PLoS ONE*, 2012, 7(10): e47674.

Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC. Nanoparticles in Medicine: Therapeutic Applications and Developments. *Clin Pharmacol Ther*, 2008, 83(5), 761-769.

## 8. SAŽETAK

### Sažetak

Prethodna istraživanja pokazala su da nanočestično srebro (AgNP) može biti toksično za različite sudionike ekosistema, što posljedično može utjecati i na čovjeka. Cilj ovoga istraživanja bio je ispitati uzrokuju li AgNP stabilizirane polivinilpirolidonskom ovojnicom (AgNP-PVP) promjene u koncentraciji proteina i parametrima oksidacijskog stresa, malondialdehidu i proteinskim karbonilima u klijancima duhana (*Nicotiana tabacum*). Tražio se i odgovor na pitanje može li se potencijalno toksični učinak AgNP-PVP spriječiti dodatkom cisteina, dobrog kelatora otpuštenih iona srebra koji također mogu doprinjeti, ako dođe do njihovog oslobađanja, toksičnosti AgNP-PVP.

Klijanci duhana bili su tjedan dana izloženi AgNP-PVP u koncentracijama 25, 50 i 100  $\mu\text{M}$ . Dio klijanaca bio je izložen AgNP-PVP u kombinaciji s cisteinom (AgNP-PVP + cistein: 25 + 125  $\mu\text{M}$ , 50 + 250  $\mu\text{M}$ , 100 + 500  $\mu\text{M}$ ) te samom cisteinu u koncentracijama od 125, 250 i 500  $\mu\text{M}$ . Jedan dio klijanaca bio je netretiran te je služio kao kontrola. Rezultati su pokazali kako parametri oksidacijskog stresa nisu značajno porasli nakon tretmana s AgNP-PVP-om. Također, značajnije razlike nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNP-PVP u kombinaciji s cisteinom nije bilo. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako u navedenim eksperimentalnim uvjetima (modelni organizam, koncentracija i dužina tretmana) AgNP-PVP nije uzrokovao oksidacijski stres. S obzirom da nije uočena razlika u tretmanu s AgNP-PVP i AgNP-PVP u kombinaciji s cisteinom, može se zaključiti da je PVP omotač taj koji doprinosi stabilnosti AgNP te da ne dolazi do otpuštanja iona srebra.

## Summary

Previous research has shown that silver nanoparticles (AgNP) can be toxic to various ecosystem participants, which can consequently affect humans as well. The aim of this study was to investigate whether polyvinylpyrrolidone coated AgNPs (AgNP-PVP) cause changes in the protein concentration and concentration of the oxidative stress parameters, malondialdehyde and protein carbonyls in tobacco seedlings (*Nicotiana tabacum*). The question whether the potentially toxic effect of AgNP-PVP could be prevented by the addition of cysteine, a good chelator of silver ions that, if released, also contribute to toxicity of AgNP-PVP, was also posed.

Tobacco seedlings were exposed to AgNP-PVP for one week at concentrations of 25, 50 and 100  $\mu\text{M}$ . A part of the seedlings was exposed to AgNP-PVP in combination with cysteine (AgNP-PVP + cysteine: 25 + 125  $\mu\text{M}$ , 50 + 250  $\mu\text{M}$ , 100 + 500  $\mu\text{M}$ ) and cysteine alone at concentrations of 125, 250 and 500  $\mu\text{M}$ . One part of the plants remained untreated, as a control group. The results showed that the parameters of oxidative stress did not significantly increase with AgNP-PVP treatment. Also, there were no significant differences after treatments with AgNP-PVP and AgNP-PVP in combination with cysteine. From the obtained results it can be concluded that under the mentioned experimental conditions (model organism, concentration and length of treatment) AgNP-PVP did not cause oxidative stress. Given that no difference was observed in the treatment with AgNP-PVP and AgNP-PVP in combination with cysteine, it can be concluded that PVP is a coating that contributes to the stability of AgNP and it prevents release of silver ions.

# PRILOG

## Popis kratica

AgNP – nanočestice srebra

AgNP-citrat – nanočestice srebra s citratnom ovojnicom

AgNP-CTAB – nanočesticama srebra s cetiltrimetilamonij bromidnom ovojnicom

AgNP-GA – nanočestice srebra s ovojnicom od arapske gume

AgNP-PVP – nanočestice srebra s polivinilpirolidonskom ovojnicom

ANOVA – analiza varijance (engl. *analysis of variance*)

APX – enzim askorbat peroksidaza

BSA – otopina albumina govedeg seruma (engl. *Bovine Serum Albumin*)

CAT – enzim katalaza

CBB – boja *Coomassie Brilliant Blue G-250*

CLP – Uredba o razvrstavanju, označivanju i pakiranju tvari i smjesa; zakonska uredba  
Europske Unije

cys – aminokiselina cistein

DNPH – 2,4-dinitrofenilhidrazin

ECHA – Europska agencija za kemikalije (engl. *European Chemical Agency*)

GA – arapska guma (engl. *gum arabic*)

GPX – enzim glutation peroksidaza

HNE – 4-hidroksinonenal

MDA – malondialdehid

MES – kalijeve sol 2-(N-Morfolino)etansulfonske kiseline (engl. *2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid potassium salt*)

PEG – polietilenglikol

PPX – enzim pirogalol peroksidaza

PUFA – polinezasićene masne kiseline (engl. *Polyunsaturated fatty acids*)

PVP – polivinilpirolidon

PVP-40 – polivinilpirolidon s prosječnom molekularnom masom 40 000 g/mol

PX – enzimi peroksidaze

RCS – reaktivni ugljikovi spojevi (engl. *Reactive carbonyl species*)

REACH – Uredba o registraciji, evaluaciji, autorizaciji i ograničavanju kemikalija; zakonska uredba Europske Unije

RNS – reaktivni dušikovi spojevi (engl. *Reactive nitrogen species*)

ROS – reaktivni kisikovi spojevi (engl. *Reactive Oxygen Species*)

SOD – enzim superoksid dismutaza

TBA – tiobarbituratna kiselina

TCA – trikloroetena kiselina

TEM – transmisijski elektronski mikroskop

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Farmacija  
Zavod za farmaceutsku botaniku  
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### **PARAMETRI OKSIDACIJSKOG STRESA U KLIJANCIMA DUHANA (*Nicotiana tabacum*) NAKON TRETMANA NANOČESTICAMA SREBRA U KOMBINACIJI S CISTEINOM**

**Katarina Drobac**

#### **SAŽETAK**

Prethodna istraživanja pokazala su da nanočestično srebro (AgNP) može biti toksično za različite sudionike ekosistema, što posljedično može utjecati i na čovjeka. Cilj ovoga istraživanja bio je ispitati uzrokuju li AgNP stabilizirane polivinilpirolidonskom ovojnicom (AgNP-PVP) promjene u koncentraciji proteina i parametrima oksidacijskog stresa, malondialdehidu i proteinskim karbonilima u klijancima duhana (*Nicotiana tabacum*). Tražio se i odgovor na pitanje može li se potencijalno toksični učinak AgNP-PVP spriječiti dodatkom cisteina, dobrog kelatora otpuštenih iona srebra koji također mogu doprinjeti, ako dođe do njihovog oslobađanja, toksičnosti AgNP-PVP.

Klijanci duhana bili su tjedan dana izloženi AgNP-PVP u koncentracijama 25, 50 i 100  $\mu\text{M}$ . Dio klijanaca bio je izložen AgNP-PVP u kombinaciji s cisteinom (AgNP-PVP + cistein: 25 + 125  $\mu\text{M}$ , 50 + 250  $\mu\text{M}$ , 100 + 500  $\mu\text{M}$ ) te samom cisteinu u koncentracijama od 125, 250 i 500  $\mu\text{M}$ . Jedan dio klijanaca bio je netretiran te je služio kao kontrola. Rezultati su pokazali kako parametri oksidacijskog stresa nisu značajno porasli nakon tretmana s AgNP-PVP-om. Također, značajnije razlike nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNP-PVP u kombinaciji s cisteinom nije bilo. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti kako u navedenim eksperimentalnim uvjetima (modelni organizam, koncentracija i dužina tretmana) AgNP-PVP nije uzrokovao oksidacijski stres. S obzirom da nije uočena razlika u tretmanu s AgNP-PVP i AgNP-PVP u kombinaciji s cisteinom, može se zaključiti da je PVP omotač taj koji doprinosi stabilnosti AgNP te da ne dolazi do otpuštanja iona srebra.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 41 stranica, 14 grafičkih prikaza, 3 tablice i 65 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: nanočestice srebra, toksičnost, cistein, malonidaldehid, proteinski karbonili

Mentori: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Biljana Balen**, redovit profesor Sveučilišta u Zagrebu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Biološki odsjek

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Biljana Balen**, redovit profesor Sveučilišta u Zagrebu Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Biološki odsjek

**Dr. sc. Maja Bival Štefan**, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2019.



## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Pharmacy  
Department of Pharmaceutical Botany  
Schrottova 39, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### **OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IN TOBACCO SEEDLINGS (*Nicotiana tabacum*) EXPOSED TO SILVER NANOPARTICLES IN COMBINATION WITH CYSTEINE**

**Katarina Drobac**

#### **SUMMARY**

Previous research has shown that silver nanoparticles (AgNP) can be toxic to various ecosystem participants, which can consequently affect humans as well. The aim of this study was to investigate whether polyvinylpyrrolidone coated AgNPs (AgNP-PVP) cause changes in the protein concentration and concentration of the oxidative stress parameters, malondialdehyde and protein carbonyls in tobacco seedlings (*Nicotiana tabacum*). The question whether the potentially toxic effect of AgNP-PVP could be prevented by the addition of cysteine, a good chelator of silver ions that, if released, also contribute to toxicity of AgNP-PVP, was also posed.

Tobacco seedlings were exposed to AgNP-PVP for one week at concentrations of 25, 50 and 100  $\mu\text{M}$ . A part of the seedlings was exposed to AgNP-PVP in combination with cysteine (AgNP-PVP + cysteine: 25 + 125  $\mu\text{M}$ , 50 + 250  $\mu\text{M}$ , 100 + 500  $\mu\text{M}$ ) and cysteine alone at concentrations of 125, 250 and 500  $\mu\text{M}$ . One part of the plants remained untreated, as a control group. The results showed that the parameters of oxidative stress did not significantly increase with AgNP-PVP treatment. Also, there were no significant differences after treatments with AgNP-PVP and AgNP-PVP in combination with cysteine. From the obtained results it can be concluded that under the mentioned experimental conditions (model organism, concentration and length of treatment) AgNP-PVP did not cause oxidative stress. Given that no difference was observed in the treatment with AgNP-PVP and AgNP-PVP in combination with cysteine, it can be concluded that PVP is a coating that contributes to the stability of AgNP and it prevents release of silver ions.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 41 pages, 14 figures, 3 tables and 65 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Silver nanoparticles, toxicity, cysteine, malondialdehyde, protein carbonyls

Mentors: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Biljana Balen, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Science, Department of Biology

Reviewers: **Ana-Marija Domijan, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Biljana Balen, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Science, Department of Biology  
**Maja Bival Štefan, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2019.

