

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prirodoslovno-matematički fakultet**  
**Biološki odsjek**

Mirna Jaklinović, Luka Kobelščak, Albina Načkar, Lina Vinković

**Fitotoksični učinci nanočestica srebra stabiliziranih omotačima na biljku duhana**  
*(Nicotiana tabaccum L.)*

**Zagreb, 2020.**

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Biljane Balen i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2019./2020.



Ovo istraživanje provedeno je u sklopu projekta IP-2014-09-6488, NanoPhytoTox financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost.

## POPIS KRATICA

AgNO <sub>3</sub>	srebrov nitrat
AgNP	nanočestice srebra (eng. <i>silver nanoparticles</i> )
CTAB	cetiltrimetilamonijev bromid
DNPH	2,4 – dinitrofenilhidrazin
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	kalijev dihidrogen fosfat
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	dikalijev fosfat
MDA	malondialdehid
MS	hranjiva podloga po Murashige i Skoog-u
NaOCl	natrijev hipoklorit
PVP	polivinilpirolidon
ROS	reaktivni oblici kisika
TCA	trikloroetena kiselina

## SADRŽAJ RADA

1.	UVOD	1
2.	OSNOVNI POJMOVI	2
2.1.	Nanočestice srebra	2
2.1.1.	Stabilizacija nanočestica srebra omotačima	3
2.1.2.	Nanočestice srebra u različitim medijima	4
2.1.3.	Spektrofotometrijska karakterizacija nanočestica srebra	4
2.2.	Duhan kao modelna biljka	5
2.3.	Cistein	6
3.	FITOTOKSIČNOST, ABIOTIČKI I OKSIDACIJSKI STRES	7
3.1.	Lipidna peroksidacija	9
3.2.	Oksidacija proteina	10
4.	OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	11
5.	MATERIJALI I METODE	12
5.1.	Uzgoj biljaka	12
5.2.	Tretman biljaka	14
5.3.	Spektrofotometrijsko određivanje stabilnosti nanočestica srebra	15
5.4.	Određivanje sadržaja MDA	15
5.5.	Određivanje sadržaja proteinskih karbonila	16
5.6.	Statistička obrada podataka	18
6.	REZULTATI	19
6.1.	Stabilnost AgNP u tekućoj hranjivoj podlozi ½ MS	19
6.1.1.	Stabilnost AgNP-PVP	19
6.1.2.	Stabilnost AgNP stabiliziranih PVP omotačem uz dodatak cisteina	20
6.1.3.	Stabilnost AgNP-CTAB	22
6.1.4.	Stabilnost AgNP stabiliziranih CTAB omotačem uz dodatak cisteina	24

6.2.	Sadržaj malondialdehida	26
6.2.1.	Sadržaj MDA u korijenu	26
6.2.2.	Sadržaj MDA u listu	28
6.3.	Količina nastalih proteinskih karbonila	30
6.3.1.	Sadržaj proteinskih karbonila u korijenu	30
6.3.2.	Sadržaj proteinskih karbonila u listu	32
7.	RASPRAVA	35
8.	ZAKLJUČCI	38
9.	ZAHVALE	39
10.	LITERATURA	40
11.	SAŽETAK	45
12.	SUMMARY	46

## 1. UVOD

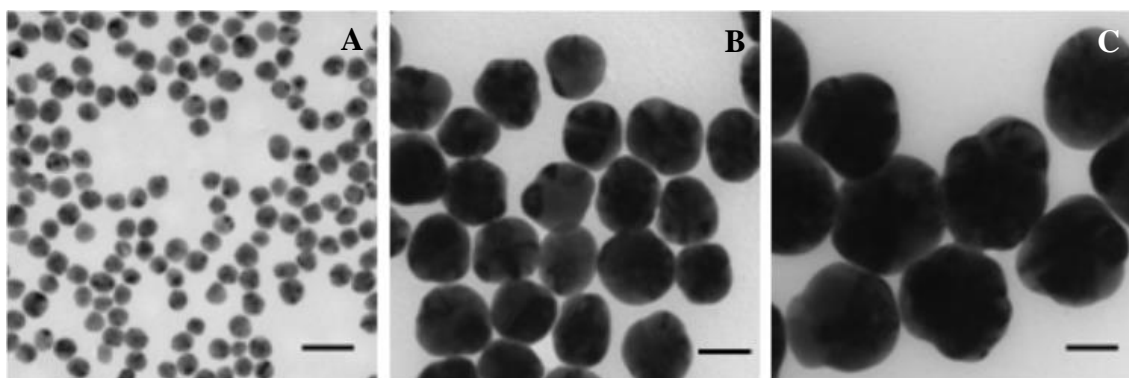
Zbog svog protubakterijskog i protugljivičnog učinka, srebro se u raznim oblicima i pripravcima koristi već iznimno dugi period. Ljudi su vrlo rano otkrili pozitivan učinak srebra na zdravlje, što je vidljivo u korištenju srebrnog posuđa za jelo i piće i srebrnog pribora za jelo te čuvanjem vina i namirnica u srebrnim posudama kako bi dulje ostale „svježee“. U ljekarnama su prodavani pripravci sa srebrom za liječenje rana i opekline. Danas je srebro općeprihvaćeno za korištenje u svakodnevnom životu – njime se oblažu četkice za zube, stavlja se u kreme, razne sprejeve za kožu itd. Osim spomenutih proizvoda farmaceutske i kozmetičke industrije, srebro je pronašlo svoje mjesto i u poljoprivredi i prehrambenoj industriji što pokazuje da su sva živa bića, uključujući i ljude, u vrlo velikom doticaju sa srebrom (Beriša, 2016). Upravo zbog tog razloga postoje mnoga istraživanja koja istražuju samo srebro kao i njegov utjecaj na živa bića.

Nanočestice srebra (AgNP) postaju sve zastupljenije u potrošačkim proizvodima. Jedinstvena fizikalna i kemijska svojstva AgNP, koja su razlog njihove sve veće zastupljenosti u znanosti i industriji, također su i razlog zabrinutosti radi njihovog potencijalno toksičnog utjecaja na okoliš i žive organizme, a pogotovo na biljke zbog njihove uloge u akumulaciji i distribuciji različitih tvari iz okoliša (Rico i sur., 2011).

## 2. OSNOVNI POJMOVI

### 2.1. Nanočestice srebra

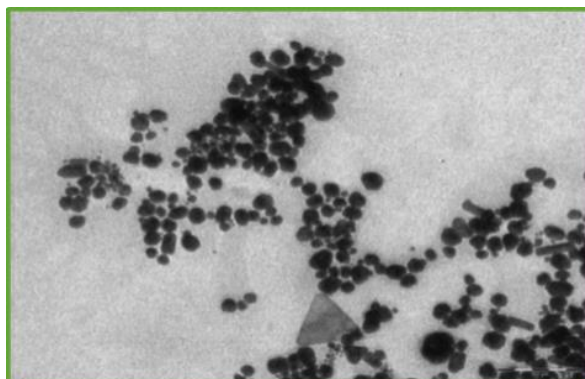
Nanotehnologija je multidisciplinarna grana znanosti koja obuhvaća dizajn, proizvodnju, karakterizaciju te primjenu struktura i sustava na nanometarskoj skali (Miralles i sur., 2012). Nanomaterijali su strukture čije su dimenzije  $\leq 100$  nm, a fizikalno-kemijska svojstva različita od istovjetnih materijala većih dimenzija (Mody i sur., 2010). Na nanorazini omjer površine prema volumenu značajno raste, što može rezultirati većom reaktivnošću materijala budući da do izražaja dolazi utjecaj površinskih atoma i kvantnog učinka na električna, optička, termalna, magnetska i biološka svojstva (Zuin i sur., 2011). Nanočestice (eng. *nanoparticles*, NP) metala su poseban tip nanomaterijala, a moguće ih je sintetizirati fizikalnim, kemijskim i biološkim metodama. Nanočestice su čestice na nanoskali (0,1 – 100 nm) s velikom primjenom u fizici, elektronici, dizajnu materijala, poljoprivredi, medicini, farmaceutskoj, prehrambenoj i kozmetičkoj industriji. Nanočestice srebra (AgNP) (**Slika 1.**) se često proizvode obložene različitim stabilizirajućim omotačima koji sprječavaju njihovu agregaciju (Nguyen i sur., 2013). Ulaskom u okoliš se do sad poznata kemijska i fizikalna svojstva nanočestica uvelike mijenjaju, što utječe na transport i moguću toksičnost AgNP (Balen, 2016). Toksičnost AgNP pripisana je mehanizmima koji uključuju narušavanje cjelovitosti stanične membrane (Suresh i sur., 2010), pojavu oksidacijskog stresa (ref), vezanje i oštećivanje proteina i DNA (Arora i sur., 2009) te apoptotičku staničnu smrt (Gopinath i sur., 2010).



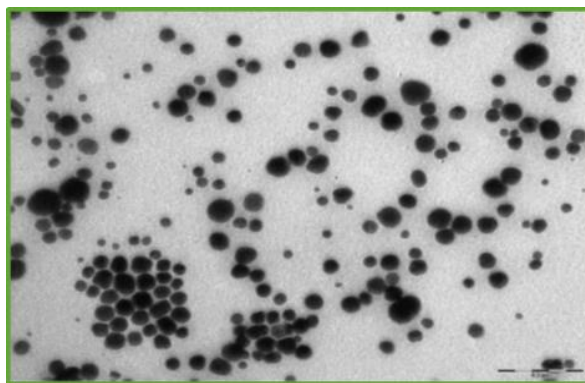
**Slika 1.** Nanočestice srebra promjera 20 nm (A), 60 nm (B) i 100 nm (C). Mjerilo 50 nm (preuzeto iz Oldenburg, 2020).

Istraživanje je provedeno na odraslim biljkama duhana, prateći utjecaj AgNP zasebno na listove i na korijen. Istražen je utjecaj dva laboratorijski sintetizirana tipa nanočestica srebra koje su stabilizirane s različitim omotačima, polivinilpirolidonom (AgNP-PVP) (**Slika 2.**) i

cetiltrimetilamonijevim bromidom (AgNP-CTAB) (**Slika 3.**). Taj je utjecaj uspoređen s istim koncentracijama tretmana ionskim srebrom ( $\text{AgNO}_3$ ), te njihove kombinacije s cisteinom.



**Slika 2.** Slika AgNP-PVP dobivena transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM) (snimila P. Peharec Štefanić).



**Slika 3.** Slika AgNP-CTAB dobivena transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM) (snimila P. Peharec Štefanić).

### 2.1.1. Stabilizacija nanočestica srebra omotačima

Mehanizam toksičnosti AgNP još nije u potpunosti istražen, pa se ne zna dolazi li toksičnost od samih nanočestica ili se toksičnost AgNP može povezati s oslobođenim ionima srebra ( $\text{Ag}^+$ ) (Kawata i sur., 2009). Srebro ima zanimljiva svojstva i lako je dostupno, no korištenje nanomaterijala na bazi srebra je ograničeno zbog njihove nestabilnosti i sklonosti oksidaciji u prisutnosti kisika (Lee i Jun, 2019).

Kako bi se spriječila agregacija AgNP u veće čestice ili njihova oksidacija, potrebno je koristiti stabilizatore tj. omotače. Kao omotači uspješno se koriste surfaktanti, mali ligandi, polimeri, dendrimeri, ciklodekstrini i polisaharidi (Campisi i sur., 2016). Korištenje stabilizatora može pridonijeti stabilizaciji prilikom rasta čestica, usporiti njihovu sedimentaciju i zaštititi od



gubitka površinskih svojstava. Omotači također štite AgNP od aglomeracije, značajno smanjuju raspad AgNP na ione  $\text{Ag}^+$ , potiču stvaranje srebrovih jezgri i povećavaju brzinu stvaranja AgNP (Iravani i sur., 2013).

Stabilizacija nanočestica ostvaruje se s tri mehanizma: elektrostatički, sterički ili kombinacijom. Kao uspješni stabilizatori nanočestica pokazali su se polimeri polivinilpirolidon (PVP), polietilen glikol ( $\text{C}_{2n}\text{H}_{4n+2}\text{O}_{n+1}$ ), polimetakrilna kiselina ( $(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2)_n$ ) i polimetilmetakrilat ( $(\text{C}_5\text{O}_2\text{H}_8)_n$ ) (Iravani i sur., 2013), koji sterički stabiliziraju AgNP. U nekim se istraživanjima koristi i dodekan tiol ( $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{AgS}$ ) (Oliviera i sur., 2005). S druge strane postoje i molekule omotača koje nose naboj, poput citrata ili cetiltrimetilamonijeva bromida (CTAB), koji elektrostatički stabiliziraju AgNP koje pri tome postaju negativno (AgNP-citrat) ili pozitivno (AgNP-CTAB) nabijene (Jarnević, 2017).

### **2.1.2. Nanočestice srebra u različitim medijima**

Ponašanje AgNP ovisi o tome u kojem se mediju nalaze. U slatkoj vodi dolazi do međusobne agregacije AgNP, otpuštanja iona  $\text{Ag}^+$  te otapanja i disperzije AgNP. Agregacija je znatno brža u morskoj u odnosu na vodu iz rijeka zbog jakih ionskih veza, a iz istog razloga brže je otapanje i disperzija nanočestica u riječnoj vodi (Bardaxoglou i sur., 2017).

Pri izlaganju AgNP otopini tla smanjuje se otpuštanje iona  $\text{Ag}^+$  zbog adsorpcije organskom tvari koja također povećava stabilnost AgNP. Povećanje stabilnosti AgNP organskom tvari značajno je tek kod većih koncentracija AgNP, jer tada nastaje više sudara među česticama AgNP, koji rezultiraju formiranjem agregata koji sprečavaju vezanje s organskim materijalom (Klitzke i sur., 2015).

U laboratorijskim uvjetima AgNP čuvaju se u ultračistoj (Milli-Q<sup>®</sup>) vodi, u kojoj su nanočestice izuzetno stabilne. Razlog tome je izuzetno nizak zeta elektrokinetički potencijal ultračiste vode koji minimizira agregaciju AgNP (Auclair i sur., 2019).

### **2.1.3. Spektrofotometrijska karakterizacija nanočestica srebra**

Spektrofotometrijska mjerenja se provode primjenom uređaja koji koriste svjetlost točno određene valne duljine (spektrofotometri) (Škobalj, 2019). UV/Vis (eng. *Ultraviolet-to-Visible*) spektrometrija se koristi kao jednostavna, pouzdana, fleksibilna i neinvazivna metoda za praćenje stabilnosti otopina nanočestica i drugih anorganskih i organskih spojeva. UV/Vis spektrofotometri mjere apsorbanciju ili transmisiju svjetlosti koja prolazi kroz medij (Chen Ye i sur., 2020). UV/Vis spektrometrija je osjetljiva metoda u molekularnoj spektrometriji koja koristi ultraljubičastu i

vidljivu svjetlost u rasponu valnih duljina od 200 nm do 780 nm. Ova metoda se temelji na apsorpciji, raspršivanju, difrakciji, refrakciji i refleksiji svojstva analiziranog uzorka (Roberts i sur., 2018).

## 2.2. Duhan kao modelna biljka

Duhan (*Nicotiana tabacum* L.) (Slika 4.) se često koristi kao model u istraživanjima abiotičkog stresa jer je relativno tolerantan na stresne uvjete i ima široku rasprostranjenost. Kultiviran je u skoro cijeloj Europi i raširen na mnogim područjima u svijetu (Bogdanović i sur., 2006). Duhan je ekonomski važna vrsta, relativno dostupna, ima kratko generacijsko vrijeme i može se lako transformirati (Balen, 2016). Lako apsorbira teške metale iz tla i zatim ih pohranjuje u korijenu i listovima zbog čega je vrlo dobar odabir za korištenje u ovom istraživanju uzevši u obzir da se srebro (koje je temelj ovog istraživanja) može ubrojiti u teške metale (Lugon-Moulin i sur., 2004).



**Slika 4.** Odrasla biljka duhana (*Nicotiana tabacum*, L.)  
(preuzeto sa [https://www.123rf.com/profile\\_suntornstork](https://www.123rf.com/profile_suntornstork))

Biljka duhana ima kratko generacijsko vrijeme i unutar tri mjeseca prođe sve faze života, od sjemenke do odrasle biljke. U odrasloj fazi, biljka može proizvesti i do milijun sjemenki što omogućuje lako širenje i razmnožavanje duhana u ekosustavu (Ganapathi i sur., 2004)

U laboratorijskim uvjetima, optimalna temperatura rasta za duhan je između 26 °C i 28 °C. Kulture duhana najbolje je držati na policama širokim oko 1 metra koje su izložene svjetlosti samo s jedne strane kako bi bile izložene jednolikom i konstantnom difuznom svjetlu (Slika 5.). Za uzgoj biljaka u komorama *in vitro* koristi se hranjiva podloga koji su razvili Murashige i Skoog (1962)

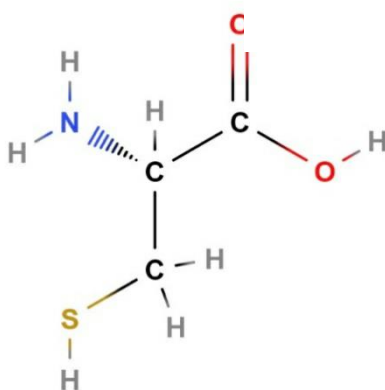
(MS podloga). Podloga sadrži anorganske mikro- i makroelemente, organske spojeve, a pH vrijednost iznosi 5,6.



**Slika 5.** Odrasle biljke duhana u komori za rast

### 2.3. Cistein

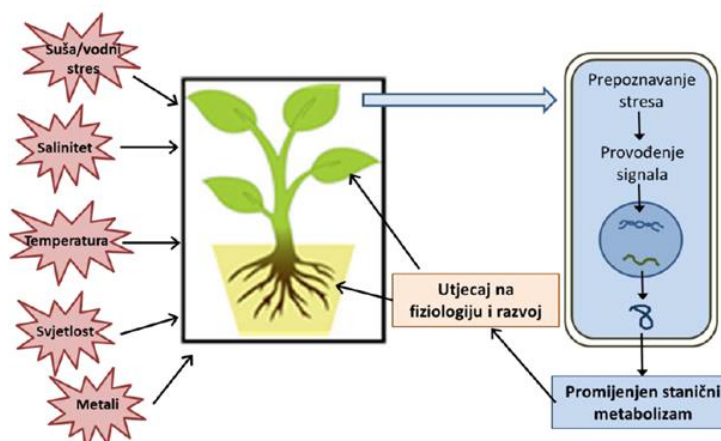
Cistein je jedna od aminokiselina koja izgrađuje proteine (**Slika 6.**). Sadrži tiolnu skupinu (-SH) umjesto hidroksilne (-OH). Tiolna skupina je reaktivnija od hidroksilne. Dvije tiolne skupine mogu se spojiti tvoreći disulfidne mostove koji su važni za stabilizaciju proteina (Berg i sur., 2013). Ioni  $\text{Ag}^+$  mogu stvarati komplekse s cisteinom, stvaranjem veze s tiolnom skupinom (Ag-SH). Na taj način se sprječava brza redukcija iona  $\text{Ag}^+$  (Khan i sur., 2012). Cistein je jak ligand srebra te je dokazano koristan u istraživanju utjecaja otopljenog srebra u ukupnoj toksičnosti AgNP. Može privući otopljene ione srebra te može utjecati na njihovu agregaciju, reaktivnost površine i otapanje nul-valentnih nanočestica srebra (Vanini i sur., 2013).



**Slika 6.** Strukturna formula molekule cisteina

### 3. FITOTOKSIČNOST, ABIOTIČKI I OKSIDACIJSKI STRES

Fitotoksičnost je promjena različitih razmjera u biljnom tkivu (privremeno ili trajno oštećenje vegetativnih ili generativnih organa, usporavanje ili zaustavljanje klijavosti te fizičke i morfološke promjene) nastala pod utjecajem različitih spojeva iz okoliša, kao što su metali u tragovima i fitotoksini, te sredstava za zaštitu biljaka, kao što su pesticidi i gnojiva (Bažok i Cenko, 2016). Nadalje, promjena može biti uzrokovana i povišenom koncentracijom različitih soli (Cai i Gao, 2011) ili povišene koncentracije uree, koja je korisna ukoliko je u dozvoljenim koncentracijama, ali povišene koncentracije mogu uzrokovati štetu na biljnom tkivu (Krogmeier i sur., 1989). Osim toga, promjena ovisi i o (okolišnim) uvjetima u kojima biljka raste, kao što su temperatura, vlaga i svjetlost (Ritter i Coble, 1981).

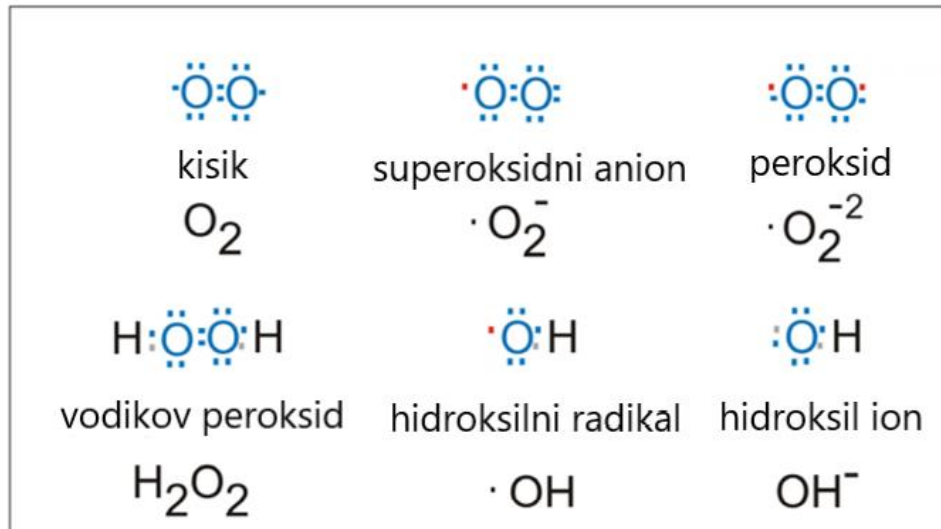


**Slika 7.** Utjecaj različitih čimbenika abiotičkog stresa na biljni organizam

(preuzeto iz Balen, 2016).

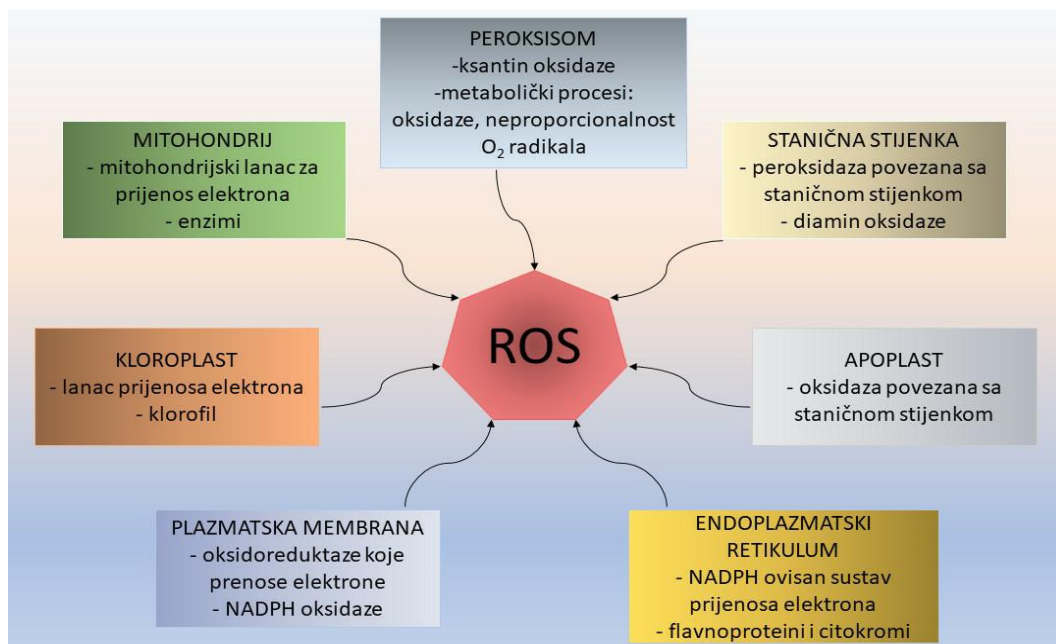
Abiotički stres je negativan učinak neživih čimbenika na žive organizme. Mogu ga izazvati mnogobrojni nedostaci i suvišci u okolišu kao što je svjetlost prejakog ili preslabog intenziteta, povišeni salinitet, povišena ili snižena temperatura, suša, povišena koncentracija određenih metala, što uključuje i metale prisutne u obliku nanomaterijala (**Slika 7.**) (Balen, 2016). Kao posljedica abiotičkog stresa može se javiti oksidacijski stres, koji ima velik utjecaj na rast i razvitak biljnog organizma te može smanjiti produktivnost biljaka za 65% do 87% (Balen, 2016). Oksidacijski stres izaziva promjene u ekspresiji gena biljne stanice, što izravno utječe na stanični metabolizam te promjene u rastu i prinosima. Kada biljka prepozna stres, na staničnoj razini dolazi do stvaranja reaktivnih oblika kisika (eng. *reactive oxygen species*, ROS) te se aktivira put prijenosa signala koji provodi informaciju unutar pojedinačne stanice i kroz cijelu biljku (Balen, 2016).

ROS molekule obuhvaćaju radikale kisika i njegove reaktivne neradikalne derivate, među kojima se ističu singletni kisik ( $^1\text{O}_2$ ), superoksidni radikal ( $\text{O}_2^-$ ), vodikov peroksid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) i hidroksilni radikal ( $\cdot\text{OH}$ ) (Slika 8.).



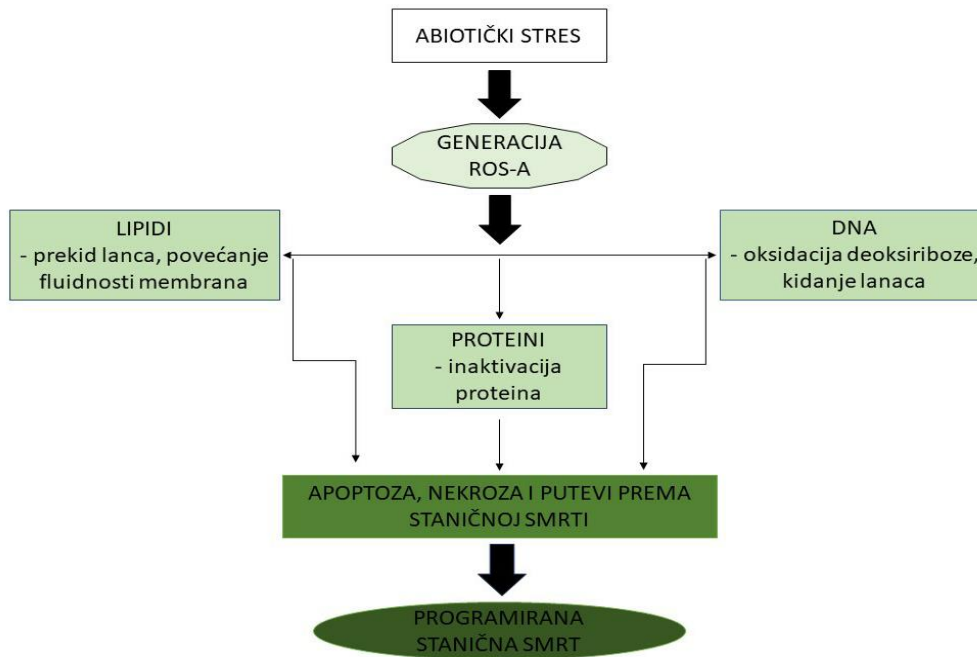
**Slika 8.** Kemijske formule i nazivi čestih ROS molekula (preuzeto i prilagođeno iz Held, 2014)

ROS molekule stvaraju se uobičajenim procesima u kloroplastima, mitohondrijima, peroksisomima, staničnoj membrani, staničnoj stijenci, apoplastu i endoplazmatskom retikulumu stanici, ali uglavnom u malim količinama (Slika 9.).



**Slika 9.** Mjesta proizvodnje ROS molekula u biljci (preuzeto i prilagođeno iz Hasanuzzaman i sur., 2013).

Međutim, okolišni stresni čimbenici pospješuju stvaranje molekula ROS u biljkama zbog narušavanja stanične homeostaze. Kada razina ROS premaši uspješnost obrambenih mehanizama, stanica je u stanju oksidacijskog stresa, što nanosi štetu biomolekulama kao što su lipidi i proteini (Slika 10.) (Parčetić-Kostelac i sur., 2016). To može uzrokovati promjenu u rastu i razvoju biljke i utjecati na njeno razmnožavanje.



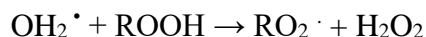
Slika 10. Utjecaj oksidacijskog stresa na pojedine molekule.

### 3.1. Lipidna peroksidacija

Molekula kisika može u normalnim biološkim uvjetima neenzimatskom oksidacijom oduzimati elektrone drugim molekulama, što uzrokuje nastanak slobodnih radikala unutar organizma. Najčešće mete slobodnih radikala su višestruko nezasićene masne kiseline (eng. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA), čija je posljedica lipidna peroksidacija. Mjerenjem količine nastalog malondialdehida (MDA), 4-hidroksinonenala (HNE), izoprostana te drugih produkata se može odrediti oštećenje lipida (Štefan i sur., 2007).

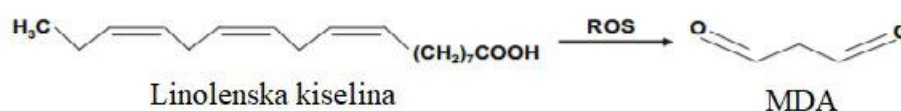
Malondialdehid se tijekom peroksidacije lipida stvara u malim količinama, a služi kao pokazatelj peroksidacije. Postoje razni oblici MDA, ali u fiziološkim se uvjetima nalazi u obliku enolatnog iona koji interreagira s proteinima.

Vrlo reaktivni hidroperoksilni radikal ( $\text{OH}_2^\bullet$ ) najčešće potiče lipidnu peroksidaciju stvaranjem peroksidnih radikala, prema reakciji:



Ovim se iz metilenske skupine uklanja atom vodika i stvaraju se slobodni lipidni radikali, a takvi radikali se nastoje stabilizirati reorganizacijom molekula, tvoreći konjugirane diene (Štefan i sur., 2007).

MDA, 4-hidroksinonenal (HNE) i izoprostan su aldehidi koji nastaju preoksidacijom molekula PUFA. MDA nastaje prema reakciji (**Slika 11.**):



**Slika 11.** Reakcija nastanka MDA

Lipidna peroksidacija i nastanak MDA višestruko utječu na funkciju membrana: smanjuju njihovu fluidnost, djeluju na transport iona i izmjenu fosfolipida između dvosloja lipida te u konačnici povećavaju propusnost membrane (Gill i Tuteja, 2010).

### 3.2. Oksidacija proteina

Dokazano je da oksidacijski stres potiče oksidaciju proteina. Oksidacija proteina se može utvrditi mjerenjem količine proteinskih karbonila, koji mogu nastati oksidacijskim cijepanjem osnovice proteina, direktnom oksidacijom nekih aminokiselina (lizin, arginin, histidin, prolin) ili spajanjem aldehida koji su nastali lipidnom peroksidacijom (Castegna i sur., 2003).

Proces karbonilacije označava kovalentno modificiranje aminokiselina potaknuto reaktivnim oblicima kisika i oksidacijskim stresom što uzrokuje stvaranje karbonilnih skupina. Karbonilacijom se mijenja ili smanjuje aktivnost proteina (Castegna i sur., 2003).

Karbonili su stabilne molekule koje se mogu detektirati u reakciji s 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH). U reakciji nastaje dinitrofenil hidrazon, a njegova koncentracija može biti spektrofotometrijski određena (Castegna i sur., 2003).

#### 4. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

U ovom radu istraženo je djelovanje čestica AgNP stabiliziranih omotačima od polivinilpirolidona (AgNP-PVP) i cetiltrimetilamonijevog bromida (AgNP-CTAB) na pojavu oksidacijskog stresa u odraslim biljkama duhana (*Nicotiana tabacum* L.). Rezultati dobiveni sa dvije vrste čestica uspoređeni su kako bi se utvrdio utjecaj različitih omotača na fitotoksičnost AgNP. Također je ispitan i utjecaj kombiniranih tretmana AgNP i cisteina kako bi se ispitala stabilnost AgNP i mogući utjecaj otopljenog srebra u ukupnoj toksičnosti AgNP. Spektrofotometrijski je analizirana je stabilnost AgNP-PVP i AgNP-CTAB, samih i u kombinaciji s cisteinom, u hranjivoj podlozi koja se koristi za uzgoj biljaka duhana. Djelovanje čestica AgNP-PVP i AgNP-CTAB uspoređeno je i s djelovanjem srebrovog nitrata ( $\text{AgNO}_3$ ) jednakih koncentracija, kako bi se otkrilo dolazi li toksičnost AgNP od samih nanočestica ili od disociranih iona  $\text{Ag}^+$ . U svim navedenim tretmanima izmjeren je sadržaj dvaju parametara oksidacijskog stresa; malondialdehida, kao pokazatelja oštećenja lipida te proteinskih karbonila, kao pokazatelja oštećenja proteina.

Ciljevi ovog rada bili su ispitati stabilnost AgNP-PVP i AgNP-CTAB u hranjivoj podlozi MS korištenoj za uzgoj duhana, istražiti izazivaju li AgNP-PVP i AgNP-CTAB pojavu oksidacijskog stresa u korijenu i listu biljaka duhana, utvrditi ovisi li taj učinak o omotaču korištenom za stabilizaciju AgNP, te utvrditi potječe li taj učinak od samih AgNP ili od iona  $\text{Ag}^+$  koji se s njih otpuštaju.



## 5. MATERIJALI I METODE

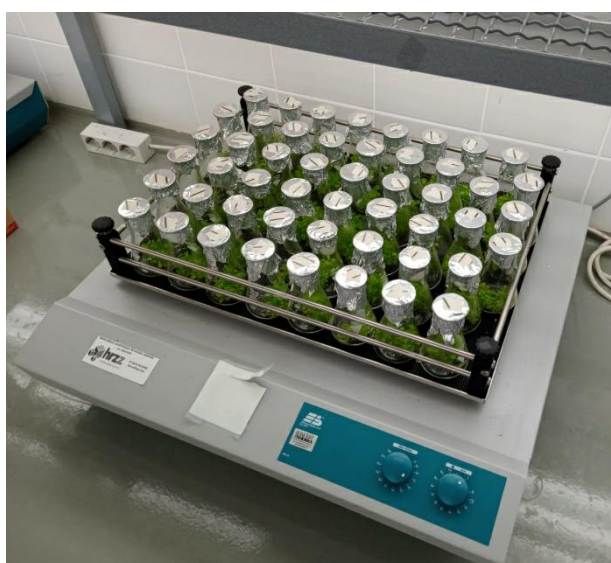
### 5.1. Uzgoj biljaka

Biljke duhana uzgajane su u tekućim hranjivim podlogama MS (**Tablica 1.**) u komori za uzgoj biljaka u uvjetima *in vitro* pri stalnoj temperaturi od  $24 \pm 1$  °C. Rasle su u ciklusima sa 16 sati svjetlosti i 8 sati tame na dnevnoj bazi. Intenzitet svjetlosti iznosio je  $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

**Tablica 1.** Sastav MS i MS ½ podloge (Murashige i Skoog, 1962)

<b>MAKROELEMENTI</b>	<b>MS (mg/L)</b>	<b>MS ½ (mg/L)</b>
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	5000
KNO <sub>3</sub>	1900	5000
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	5000
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	440	5000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	5000
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	370	5000
FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	27,80	0
<b>MIKROELEMENTI</b>		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	1
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,025	1
KI	0,83	1
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,25	1
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,025	1
MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	22,30	1
ZnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	8,6	2500
<b>ORGANSKI DODACI</b>		
saharoza	30000	15000
mio-inozitol	100	1000
MES	1000	500
B1 (tiamin) x HCl	0,1	0,1

U istraživanju su korištene sjemenke duhana *Nicotiana tabacum* L. koje su prije nasađivanja na hranjive podloge sterilizirane. U plastične tubice od 1,5 mL stavljeno je 0,05 g sjemenki duhana kojima je dodan 1 mL 50% natrijevog hipoklorita (NaOCl). Tubice su stavljene u tresilicu 15 minuta nakon čega se iz nje sterilnim nastavkom na mikropipeti izvukla otopina NaOCl, a potom dodalo 1 mL sterilne deH<sub>2</sub>O. Postupak s deH<sub>2</sub>O ponovljen je još 2 × te je nakon zadnjeg ispiranja dodano 500 μL MS podloge. Sadržaj tubica premješten je potom u Erlenmeyerove tikvice od 100 mL, u koje je prethodno stavljeno 5 mL sterilne MS podloge. Tikvice su zaštićene i pokrivene aluminijskom folijom te stavljene na tresilicu (**Slika 12.**). Sjemenke su na tresilici u komori isključavane 30 dana.



**Slika 12.** Tresilica sa sjemenkama duhana u Erlenmeyerovim tikvicama

Izrasli klijanci pojedinačno su prebačeni u staklene nosače za klijance („šeširiće“) i staklenke u kojima se nalazilo 50 mL sterilne MS podloge. Staklenke s klijancima smještene su u komoru za uzgoj biljaka kako bi klijanci izrasli u odrasle biljke s potpuno razvijenim korijenovim sustavom, za što je trebalo otprilike 30 dana.

## 5.2. Tretman biljaka

Odrasle biljke izložene su tretmanima u 50 mL MS podloge sa polovičnom koncentracijom makroelemenata (podloga ½ MS, **Tablica 1.**) uz dodatak AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO<sub>3</sub> te njihovim kombinacijama s cisteinom (**Tablica 2.**). Tretman je trajao 7 dana, nakon čega je tkivo korijena i lista pojedinačno uzorkovano, stavljeno na -80 °C te liofilizirano. Kontrolne biljke su prebačene u ½ MS podloge bez dodatka AgNP ili AgNO<sub>3</sub> u kojima su rasle 7 dana te zatim na isti način uzorkovane kao i tretirane biljke.

**Tablica 2.** Koncentracije AgNP, AgNO<sub>3</sub> i cisteina ispitane u tretmanima odraslih biljaka duhana.

TRETMAN	Ag (μM)	cistein (μM)
AgNP-PVP	25	0
	25	125
	50	0
	50	250
	100	0
	100	500
AgNP-CTAB	25	0
	25	125
	50	0
	50	250
	100	0
	100	500
AgNO <sub>3</sub>	25	0
	25	125
	50	0
	50	250
	100	0
	100	500

### 5.3. Spektrofotometrijsko određivanje stabilnosti nanočestica srebra

Prije izlaganja biljaka tretmanima, napravljena je spektrofotometrijska analiza stabilnosti nanočestica srebra. Mjerenja su izvedena UV/Vis spektrofotometrom, mjerenjem spektara 100  $\mu$ M otopine AgNP-PVP i AgNP-CTAB u podlozi  $\frac{1}{2}$  MS te otopina i njihove kombinacije s cisteinom na valnim duljinama od 300 nm do 800 nm. U UV kivetu stavljen je 1 mL svake analizirane otopine, a kao slijepa proba korištena je  $\frac{1}{2}$  MS podloga bez dodatka srebra i cisteina.

### 5.4. Određivanje sadržaja MDA

Za određivanja sadržaja MDA pripravljena je ekstrakcijska otopina koja se sastojala od 0,3%-tne tiobarbituratne kiseline (TBA) otopljene u 10%-tnoj trikloroetenoj kiselini (TCA). Za pripremu 100 mL navedene otopine pomiješano je 10 mL TCA s 90 mL reH<sub>2</sub>O, u što se dodalo 0,3 g TBA, te se cijela otopina zagrijavala do potpunog otapanja.

Za pripremu ekstrakata, korišteno je 40 mg liofiliziranog tkiva korijena i 20 mg liofiliziranog tkiva listova odraslih biljaka duhana (**Slika 13. A**), koji su na sobnoj temperaturi usitnjeni korištenjem tarionika i tučka u 1500  $\mu$ L ekstrakcijske otopine. Nakon usitnjavanja, smjesa je prebačena u plastične tubice od 2 mL i zagrijana 30 minuta u termomikseru (**Slika 13. B**) na 95 °C. Uz ekstrakte, u termomikser su stavljene i 2 slijepa probe sastavljene od 200  $\mu$ L kalij-fosfatnog pufera, pH 7 i 1300  $\mu$ L ekstrakcijske smjese. 0,1 M otopina kalij-fosfatnog pufer je pripravljena iz 1 M otopina KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i 1 M otopine K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Otopina KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> je pripravljena iz 6,804 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> koji se otapa u čaši uz lagano zagrijavanje te mu se nakon otapanja dodaje reH<sub>2</sub>O do 50 mL, dok je otopina K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pripravljena iz 8,709 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> koji se otapa u čaši bez zagrijavanja te mu se nakon otapanja dodaje reH<sub>2</sub>O do 50 mL. Obje otopine su čuvane na 4 °C. Za dobivanje 0,1 M kalij-fosfatnog pufera potrebno je pomiješati 1,925 mL 1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i 3,075 mL 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> te nadopuniti do 50 mL s reH<sub>2</sub>O. Ekstrakti su potom stavljeni u ledenu kupelj nekoliko minuta, kako bi se reakcija zaustavila, a zatim centrifugirani 30 minuta na 14000 rpm pri 4 °C. Supernatant je prelišen u čiste tubice, a talog bačen.

Spektrofotometar je nuliran korištenjem slijepa probe. Slijepa proba sadrži sve sastojke reakcijske smjese osim tvari čija se koncentracija određuje (Škobalj, 2019), u ovom istraživanju osim ekstrakta nakon centrifugiranja. Nakon baždarenja spektrofotometra, supernatant je prelišen u kivete i spektrofotometrom je mjerena apsorbancija na valnim duljinama od 532 i 600 nm. Zbog nespecifičnog zamućenja, učinjena je korekcija na način da je od vrijednosti očitane na 532 nm oduzeta vrijednost očitana na 600 nm.

Koncentracija lipidnih peroksida izražena je kao koncentracija MDA u  $\mu\text{mol g}^{-1}$  suhe tvari prema jednadžbi:

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

gdje je:

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

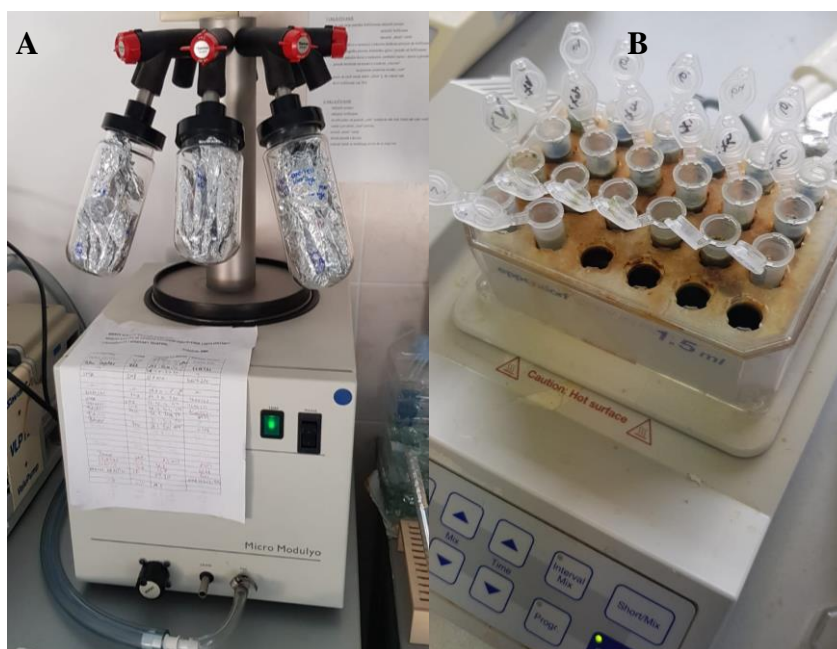
$A_{600}$  – apsorbancija izmjerena na 600 nm

$m$  – masa tkiva (g)

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

$l$  – duljina puta (1 cm)

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



**Slika 13.** (A) Liofilizacija tkiva (biljke duhana); (B) Zagrijavanje ekstrakata u plastičnim tubicama od 2 mL u termomikseru

### 5.5. Određivanje sadržaja proteinskih karbonila

Za pripremu ekstrakata, korišteno je 20 mg liofiliziranog tkiva korijena i 10 mg tkiva lista. U dobro ohlađen tarionik, stavljeno je liofilizirano tkivo zajedno s malom količinom polivinilpirolidona (PVP) i ekstrahirano je s 1,5 mL kalij-fosfatnog pufera pH 7. Dobiveni ekstrakt preliven je u tubicu i potom centrifugiran 15 minuta na 14000 rpm pri 4 °C. Supernatant je preliven

u čistu tubicu te ponovo centrifugiran 60 minuta na 14000 rpm pri 4 °C. Dobiveni supernatant prebačen je u čiste tubice i držan na ledu do sljedećeg koraka.

Pripremljene su dvije otopine 2 M klorovodične kiseline (HCl). U menzuru s 40 mL deH<sub>2</sub>O je dodano 8,3 mL HCl te dopunjeno do 50 mL s deH<sub>2</sub>O. Zatim je pripremljena 10 mM otopina 2,4 dinitrofenilhidrazina (DNPH) u 2 M HCl. Dodano je 0,099 g DNPH u 50 mL 2 M HCl, a druga otopina 2 M HCl je korištena kao kontrola. U jedan set plastičnih tubica, dodano je 200 µL pripremljenog ekstrakta i 300 µL 10 mM DNPH u 2 M HCl. U drugi set tubica dodano je 200 µL pripremljenog ekstrakta i 300 µL 2 M HCl. Oba seta tubica su pomiješana na vortexu<sup>1</sup> i stavljena u tamnu komoru pri sobnoj temperaturi na jedan sat uz povremeno miješanje.

Nakon inkubacije u mraku, u sve uzorke je dodano 500 µL 10%-tne otopine TCA, što je dovelo do taloženja proteina. Uzorci su stavljeni 5 minuta na hlađenje na -20 °C, te su potom centrifugirani 10 min na 14000 rpm i 4 °C. Supernatant je odliven, a talog ispran 3 × u 500 µL otopine etanol/etilacetata u omjeru 1:1.

Za otapanje taloga, pripremljena je 6 M otopina uree u 20 mM kalij-fosfatnom puferu pH 2,4. Izvagano je 0,1361 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> i otopljeno u 40 mL deH<sub>2</sub>O. Toj otopini je dodano 18,02 g uree i nadopunjeno do 50 mL s deH<sub>2</sub>O. Talog je otopljen u 1 mL dobivene otopine resuspendiranjem i miješanjem na vortexu.

Pri spektrofotometrijskom mjerenju svaki uzorak s DNPH imao je svoju slijepu probu bez DNPH, a apsorbancija se mjerila pri 370 nm. Sadržaj proteinskih karbonila izražen je prema jednadžbi:

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

gdje je:

A<sub>370</sub> – apsorbancija izmjerena na 370 nm

m – koncentracija proteina (mg proteina mL<sup>-1</sup>)

ε – molarni apsorpcijski koeficijent (22 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)

l – duljina optičkog puta (1 cm)

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

---

<sup>1</sup> Vortex je uređaj koji se koristi u laboratoriju za brzo miješanje male količine tekućine.

## 5.6. Statistička obrada podataka

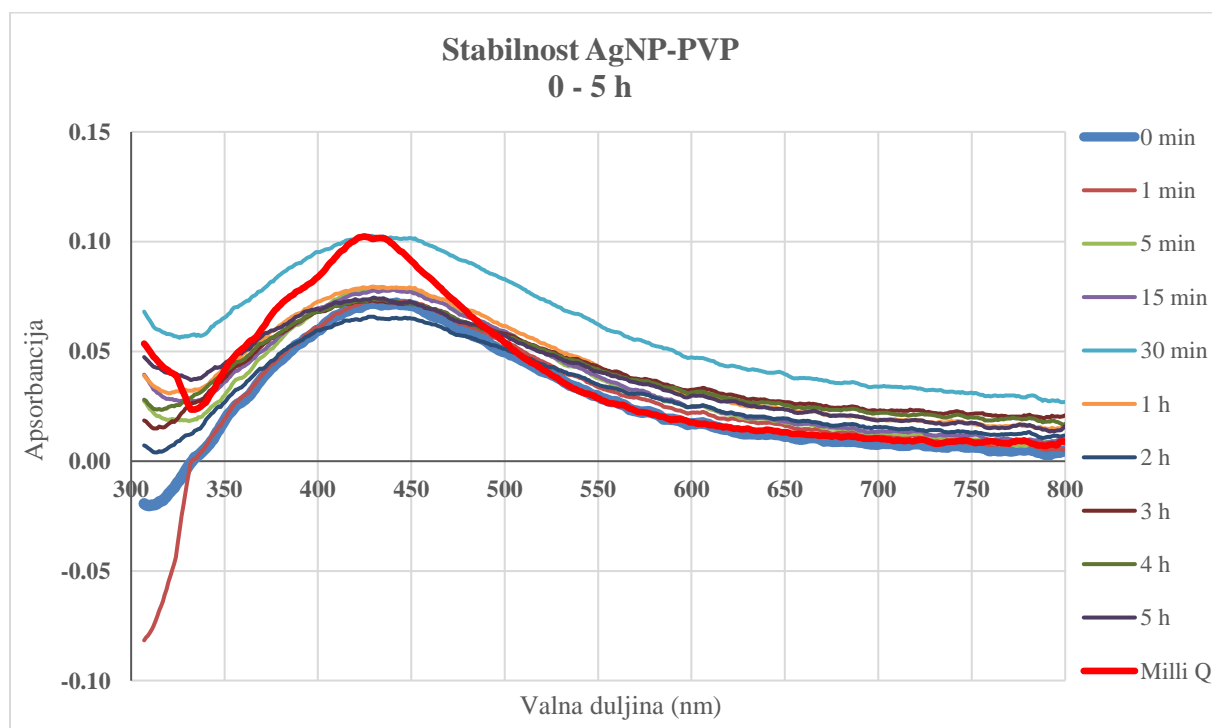
Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti 6 replika  $\pm$  standardne pogreške. Statistička obrada rezultata napravljena je korištenjem jednosmjerne analize varijance (eng. *ANalysis Of VAriance* – ANOVA), nakon čega je proveden post-hoc Duncan test. Pri tumačenju statistički obrađenih rezultata značajnom se smatrala razlika  $p \leq 0,05$ . Analiza je napravljena u programu Statistica 12.0 (Stat Soft Inc., SAD).

## 6. REZULTATI

### 6.1. Stabilnost AgNP u tekućoj hranjivoj podlozi ½ MS

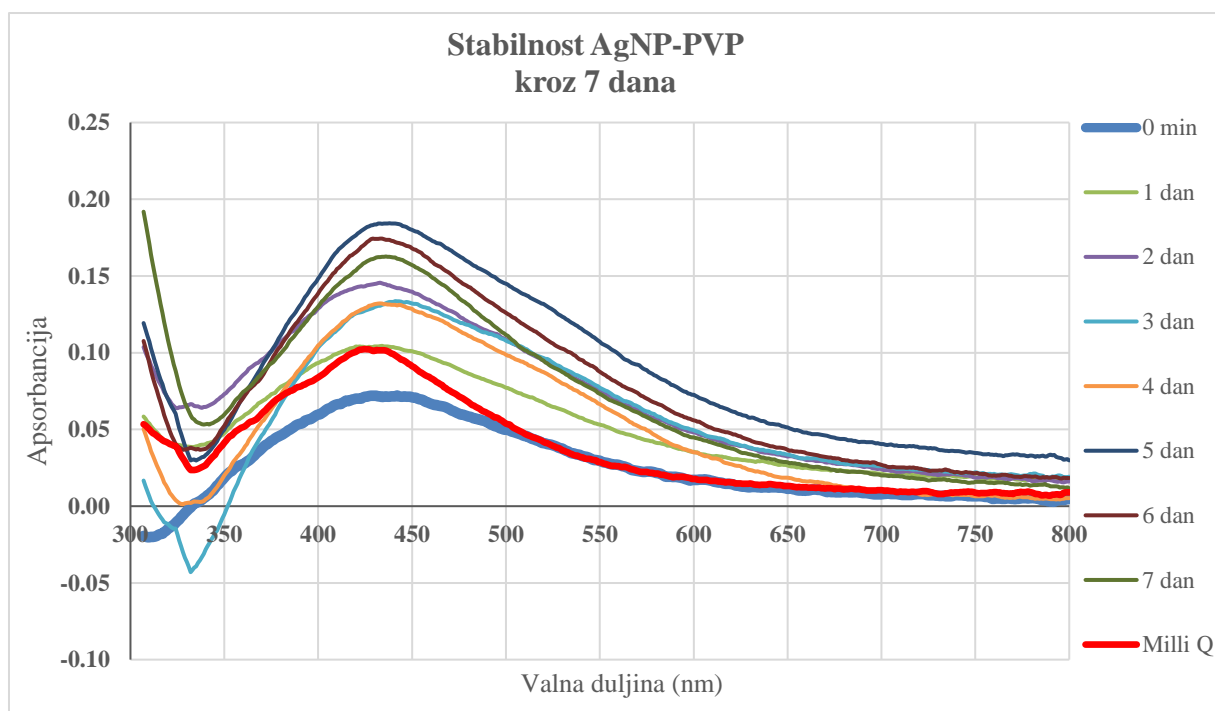
#### 6.1.1. Stabilnost AgNP-PVP

Stabilnost čestica AgNP-PVP u 100 µM otopini u podlozi ½ MS mjerena je u vremenskom periodu od 5 sati te u periodu od 7 dana, a vrijednosti su uspoređene s rezultatima analize stabilnosti 100 µM otopine AgNP-PVP u ultračistoj vodi (Milli Q), u kojoj je maksimalna vrijednost apsorbancije od 0,105 izmjerena na valnoj duljini od 433 nm. U peterosatnom periodu ispitivanja stabilnosti AgNP-PVP u podlozi ½ MS u nultoj minuti je izmjerena apsorbancija od 0,074 na 435 nm, a maksimalna vrijednost apsorpcijske krivulje od 0,104 izmjerena je u tridesetoj minuti na valnoj duljini od 424 nm. Do tridesete minute apsorbancija je bila manja u odnosu na onu izmjerenu u ultračistoj vodi, što upućuje na disocijaciju Ag<sup>+</sup>. Gotovo identično ponašanje čestica dobiveno je i nakon mjerenja u tridesetoj minuti (Slika 14.). Tijekom sedmodnevnog razdoblja maksimalna vrijednost apsorbancije od 0,185 izmjerena je peti dan na valnoj duljini od 437 nm. Ostala mjerenja, osim u nultoj minuti, pokazala su manju apsorbanciju u odnosu na peti dan, ali i povećanje apsorbancije i pomak vrijednosti prema većim valnim duljinama u odnosu na vrijednosti izmjerene u ultračistoj vodi (Slika 15.), što ukazuje na nestabilnost AgNP-PVP.



Slika 14. Stabilnost 100 µM otopine AgNP-PVP u tekućoj hranjivoj podlozi ½ MS tijekom 5 sati.

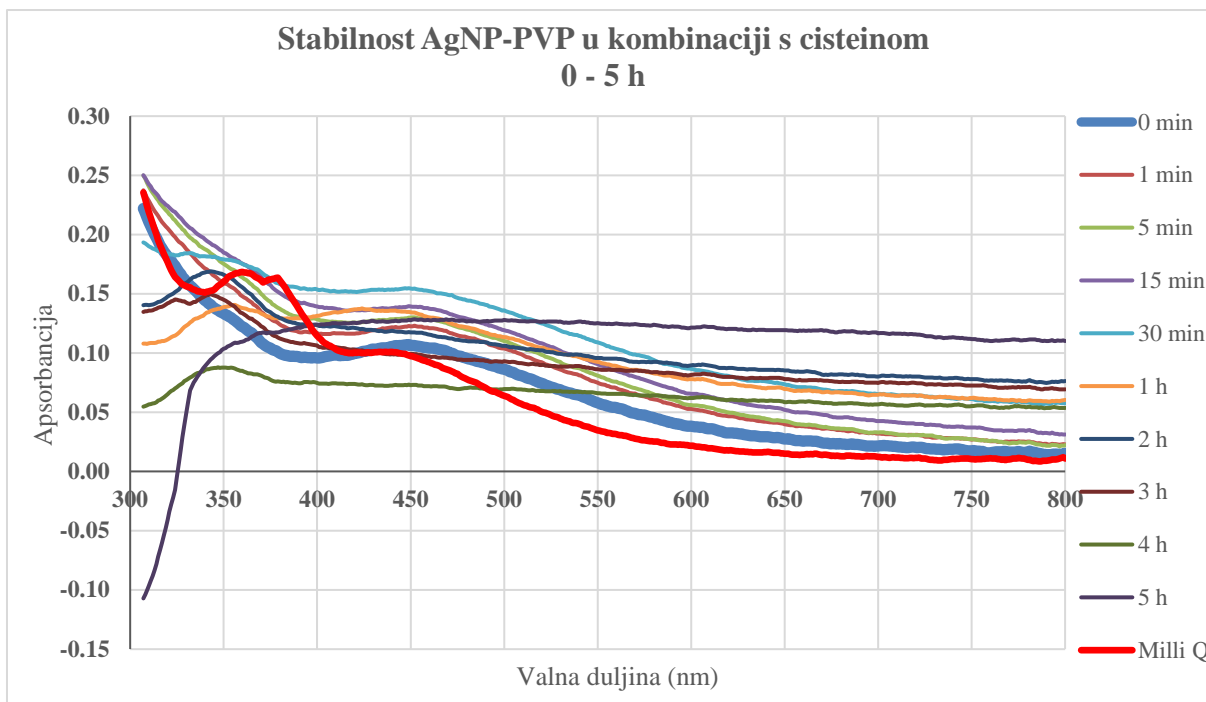




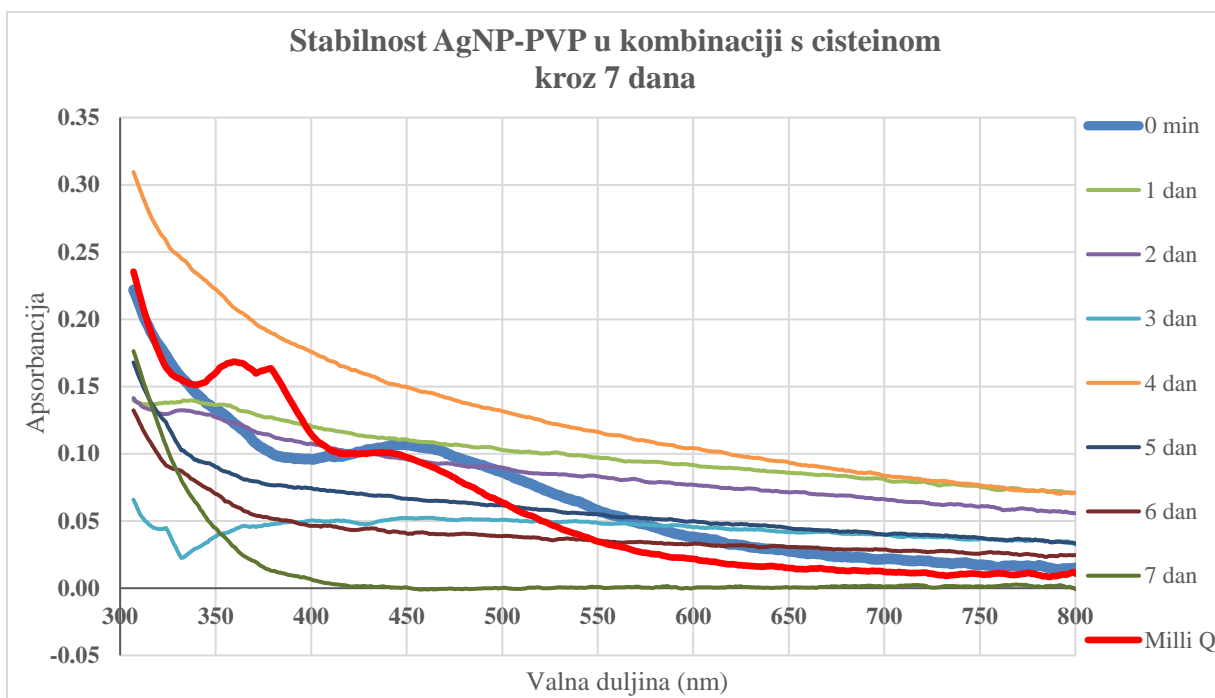
**Slika 15.** Stabilnost 100  $\mu\text{M}$  otopine AgNP-PVP u tekućoj hranjivoj podlozi  $\frac{1}{2}$  MS tijekom 7 dana.

### 6.1.2. Stabilnost AgNP stabiliziranih PVP omotačem uz dodatak cisteina

Stabilnost čestica 100  $\mu\text{M}$  otopine AgNP-PVP u kombinaciji s 500  $\mu\text{M}$  cisteinom u  $\frac{1}{2}$  MS podlozi također je mjerena je u vremenskom periodu od 5 sati te u periodu od 7 dana i uspoređena s vrijednostima dobivenim mjerenjem stabilnosti iste kombinacije AgNP-PVP i cisteina u ultračistoj vodi, u kojoj je maksimalna apsorbancija od 0,171 izmjerena na dvije valne duljine: 358 nm i 372 nm. Mjerenja u  $\frac{1}{2}$  MS podlozi u periodu od 5 sati pokazala su izostanak jasnog maksimuma u svim mjerenim vremenima, što ukazuje na disocijaciju  $\text{Ag}^+$ , odnosno raspad nanočestica (**Slika 16.**). Isti trend zabilježen je i nakon mjerenja u periodu od 7 dana (**Slika 17.**).



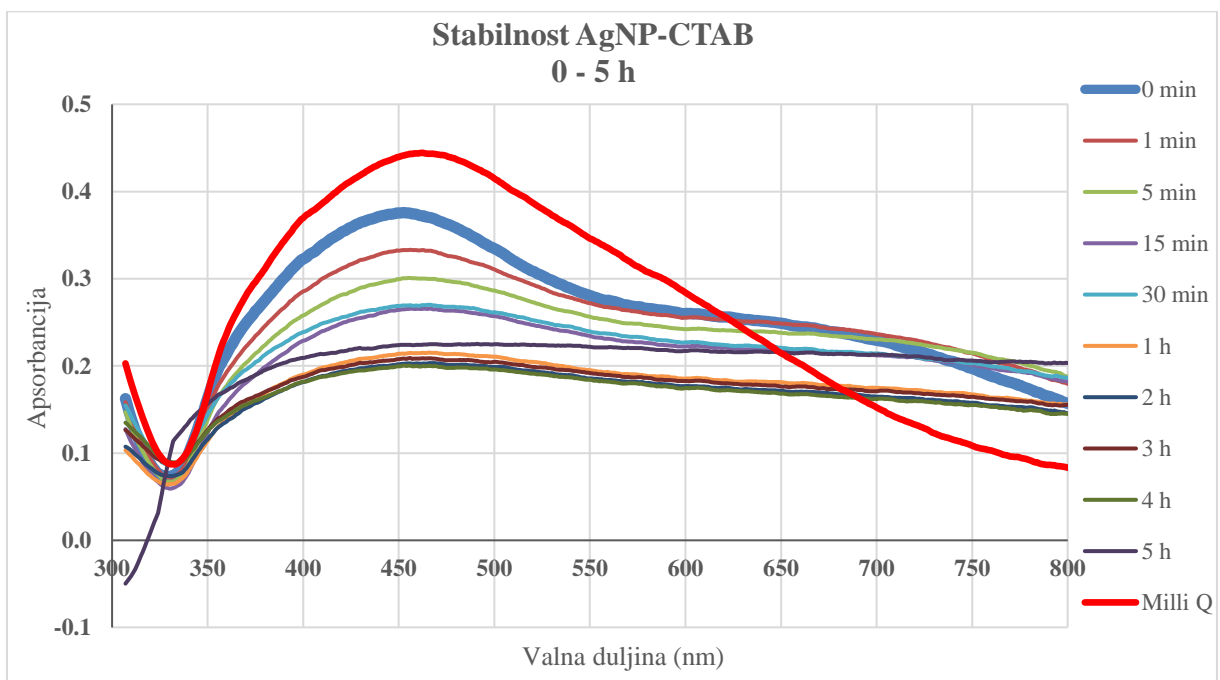
**Slika 16.** Stabilnost 100  $\mu\text{M}$  otopine AgNP-PVP u tekućoj hranjivoj podlozi  $\frac{1}{2}$  MS s dodatkom 500  $\mu\text{M}$  otopine cisteina tijekom 5 sati.



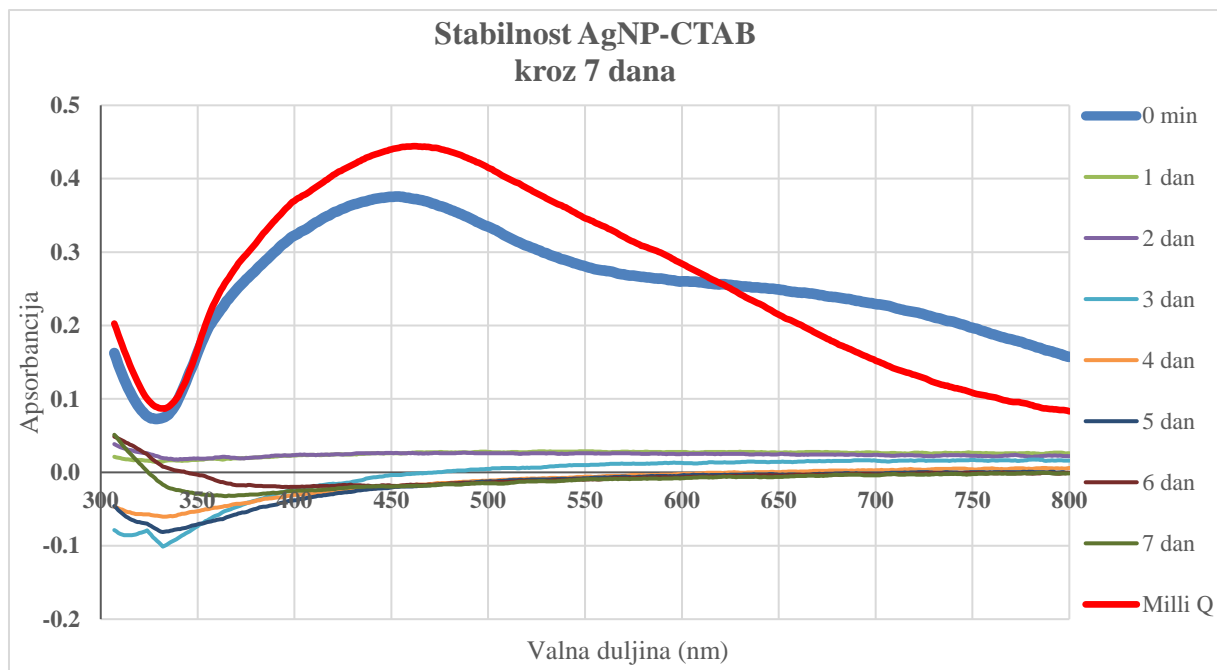
**Slika 17.** Stabilnost 100  $\mu\text{M}$  otopine AgNP-PVP u tekućoj hranjivoj podlozi  $\frac{1}{2}$  MS uz dodatak 500  $\mu\text{M}$  otopine cisteina tijekom 7 dana.

### 6.1.3. Stabilnost AgNP-CTAB

Stabilnost čestica AgNP-CTAB u 100  $\mu\text{M}$  otopini u podlozi  $\frac{1}{2}$  MS mjerena je u vremenskom periodu od 5 sati i u periodu od 7 dana, a vrijednosti su uspoređene s rezultatima analize stabilnosti 100  $\mu\text{M}$  otopine AgNP-CTAB u ultračistoj vodi, u kojoj je maksimalna vrijednost apsorbancije od 0,446 izmjerena na valnoj duljini od 455 nm. U peterosatnom periodu mjerenja stabilnosti AgNP-CTAB maksimalna apsorbancija od 0,379 izmjerena je u trenutku miješanja (nulta minuta) na valnoj duljini od 449 nm, nakon čega je apsorpcija postupno opadala kroz vrijeme, a maksimum se pomicao prema manjim valnim duljinama, što ukazuje na raspad nanočestica (**Slika 18.**). Tijekom mjerenja u sedmodnevnom periodu nisu zabilježene apsorpcijske krivulje s izraženim maksimumom, već samo vrlo male vrijednosti apsorbancije (**Slika 19.**), što ukazuje na potpuni raspad AgNP-CTAB .



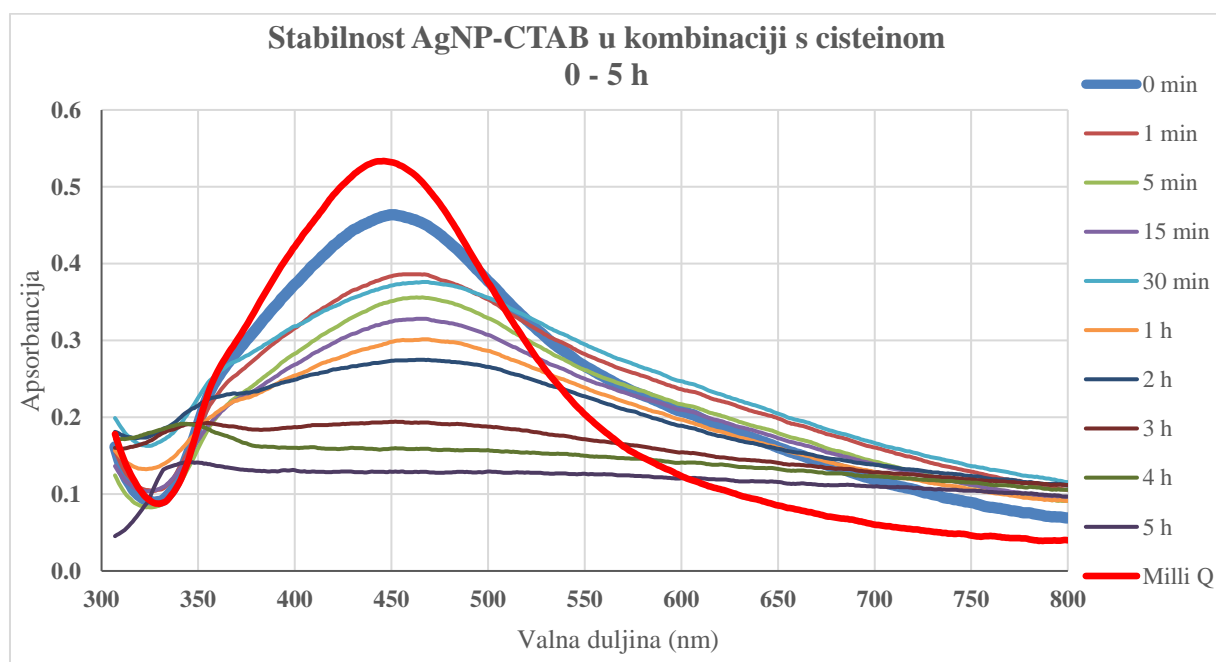
**Slika 18.** Stabilnost 100  $\mu\text{M}$  otopine AgNP-CTAB u tekućoj hranjivoj podlozi  $\frac{1}{2}$  MS tijekom 5 sati.



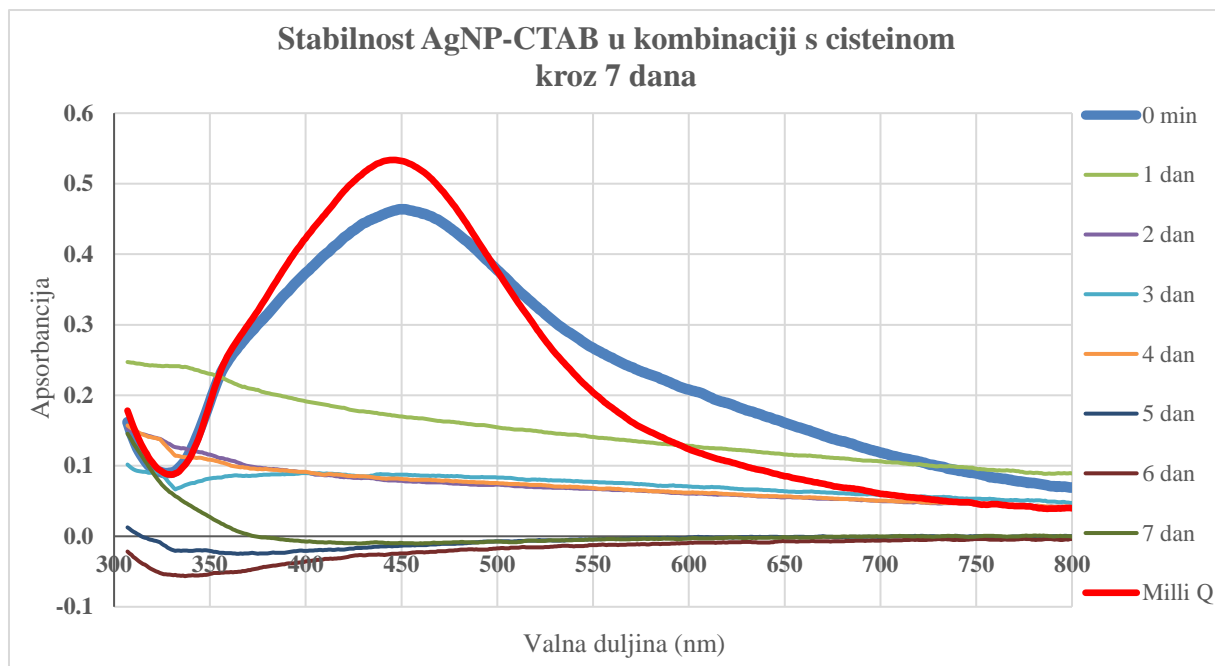
**Slika 19.** Stabilnost 100  $\mu$ M otopine AgNP-CTAB u tekućoj hranjivoj podlozi  $\frac{1}{2}$  MS tijekom 7 dana.

#### 6.1.4. Stabilnost AgNP stabiliziranih CTAB omotačem uz dodatak cisteina

Stabilnost čestica 100  $\mu\text{M}$  otopine AgNP-CTAB u kombinaciji s 500  $\mu\text{M}$  cisteinom u  $\frac{1}{2}$  MS podlozi također je mjerena je u vremenskom periodu od 5 sati te u periodu od 7 dana i uspoređena s vrijednostima dobivenim mjerenjem stabilnosti iste kombinacije AgNP-PVP i cisteina u ultračistoj vodi, u kojoj je maksimum apsorpcije od 0,535 izmjeren je na valnoj duljini od 440 nm. Maksimum apsorpcije AgNP-CTAB u kombinaciji s cisteinom od 0,466 izmjeren je u trenutku miješanja (nulta minuta) na valnoj duljini od 449 nm, nakon čega su se maksimalne vrijednosti apsorpcijskih krivulja postupno smanjivale s vremenom (što ukazuje na disocijaciju  $\text{Ag}^+$  iona i raspad AgNP), ali i pomicale prema većim valnim duljinama (što pokazuje agregaciju preostalih AgNP-CTAB čestica). Nakon tri sata mjerenja više nije bilo moguće zabilježiti maksimum apsorpcijske krivulje, što sugerira potpuni raspad AgNP (**Slika 20.**). Rezultati mjerenja apsorpcijskih spektara po danima bili su u skladu s rezultatom dobivenim nakon tri sata i potvrdili su potpuni raspada AgNP-CTAB. (**Slika 21.**).



**Slika 20.** Stabilnost 100  $\mu\text{M}$  otopine AgNP-CTAB u tekućoj hranjivoj podlozi  $\frac{1}{2}$  MS uz dodatak 500  $\mu\text{M}$  otopine cisteina tijekom 5 sati.



**Slika 21.** Stabilnost 100  $\mu\text{M}$  otopine AgNP-CTAB u tekućoj hranjivoj podlozi  $\frac{1}{2}$  MS uz dodatak 500  $\mu\text{M}$  otopine cisteina tijekom 7 dana.

## 6.2. Sadržaj malondialdehida

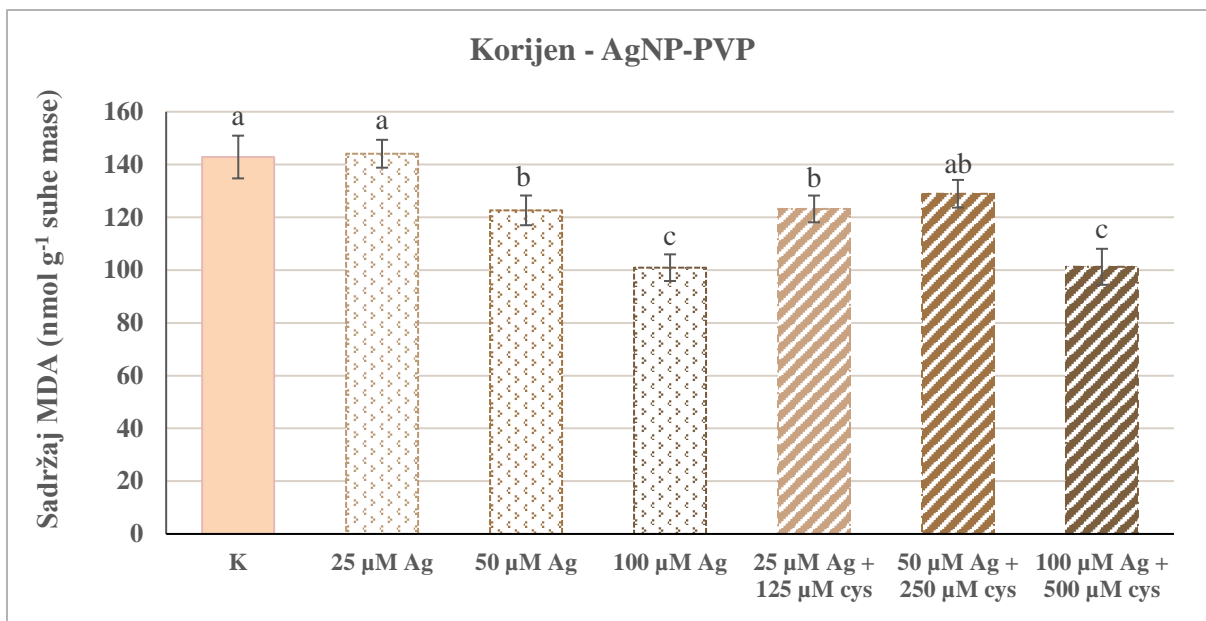
Količina malondialdehida nastalog u korijenu i listu biljaka duhana mjerena je kako bi se odredila razina lipidne peroksidacije, koja ukazuje na oksidacijski stres.

### 6.2.1. Sadržaj MDA u korijenu

Sadržaj MDA u korijenu duhana bio je značajno smanjen nakon tretmana s dvije veće koncentracije AgNP-PVP (50 i 100  $\mu\text{M}$ ), te nakon kombiniranih tretmana s 25 i 100  $\mu\text{M}$  AgNP-PVP i cisteinom u odnosu na kontrolu (**Slika 22.**). Usporedbom sadržaja MDA nastalog izlaganja samim AgNP-PVP i AgNP-PVP iste koncentracije u kombinaciji s cisteinom, značajno smanjenje zabilježeno je nakon kombiniranog tretmana s 25  $\mu\text{M}$  AgNP i 125  $\mu\text{M}$  cisteina u odnosu na tretman sa samim 25  $\mu\text{M}$  AgNP (**Slika 22.**)

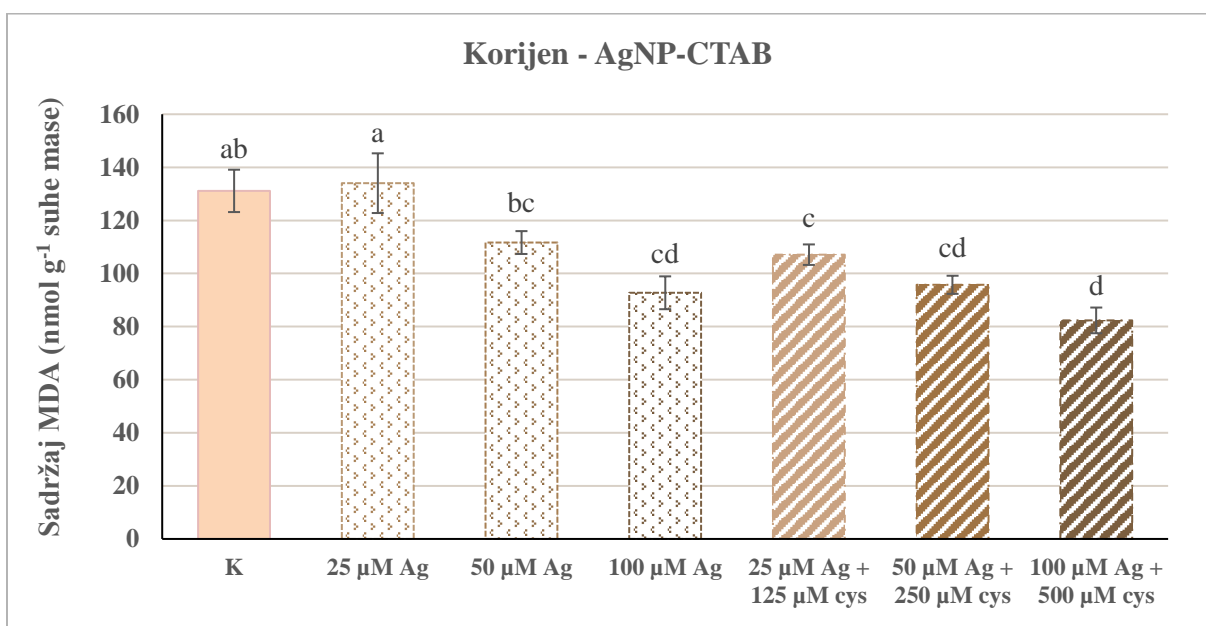
Smanjenje razine lipidne peroksidacije zabilježeno je i u korijenu biljaka tretiranih s dvije veće koncentracije AgNP-CTAB (50 i 100  $\mu\text{M}$ ) te nakon svih kombiniranih tretmana AgNP-CTAB i cisteina (**Slika 23.**). Smanjenje sadržaja MDA povećavalo se s povećanjem koncentracije nanočestica. Usporedbom razine lipidne peroksidacije nakon izlaganja samim AgNP-CTAB i nanočestica iste koncentracije u kombinaciji s cisteinom, značajno smanjenje zabilježeno za najnižu ispitanu koncentraciju AgNP-CTAB (25  $\mu\text{M}$ ) i 125  $\mu\text{M}$  cistein u usporedbi sa samim 25  $\mu\text{M}$  AgNP-CTAB; za ostale dvije koncentracije AgNP-CTAB, izmjeren je smanjeni sadržaj MDA u kombiniranim tretmanima, ali nije bio statistički značajan u odnosu na tretmane sa samim nanočesticama iste koncentracije (**Slika 23.**).

Nakon biljaka tretmana s  $\text{AgNO}_3$ , u korijenu je izmjeren značajno manji sadržaj MDA pri koncentracijama od 25 i 100  $\mu\text{M}$  te nakon izlaganja nižim koncentracijama  $\text{AgNO}_3$  u kombinaciji s cisteinom u usporedbi s kontrolom (**Slika 24.**). Dodatak cisteina značajno je smanjio utjecaj tretmana sa 50  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$ , odnosno povećao utjecaj tretmana sa 100  $\mu\text{M}$   $\text{AgNO}_3$  (**Slika 24.**).



**Slika 22.** Sadržaj MDA u korijenu nakon izlaganja odraslih biljaka duhana tretmanima s AgNP-PVP te kombinaciji AgNP-PVP i cisteina. Sadržaj je izražen u nmol g<sup>-1</sup> suhe mase.

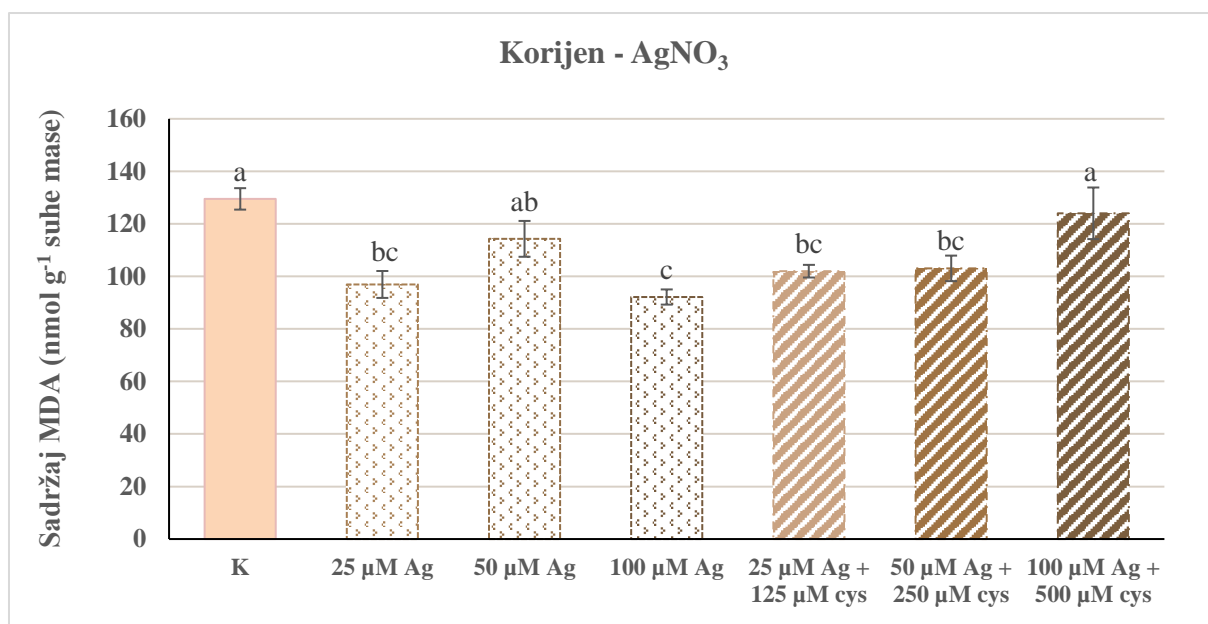
K – kontrola; Ag – AgNP-PVP; cys - cistein



**Slika 23.** Sadržaj MDA u korijenu nakon izlaganja odraslih biljaka duhana tretmanima s AgNP-CTAB te kombinaciji AgNP-CTAB i cisteina. Sadržaj je izražen u nmol g<sup>-1</sup> suhe mase.

K – kontrola; Ag – AgNP-CTAB; cys - cistein





**Slika 24.** Sadržaj MDA u korijenu nakon izlaganja odraslih biljaka duhana tretmanima s AgNO<sub>3</sub> te kombinaciji AgNO<sub>3</sub> i cisteina. Sadržaj je izražen u nmol g<sup>-1</sup> suhe mase.

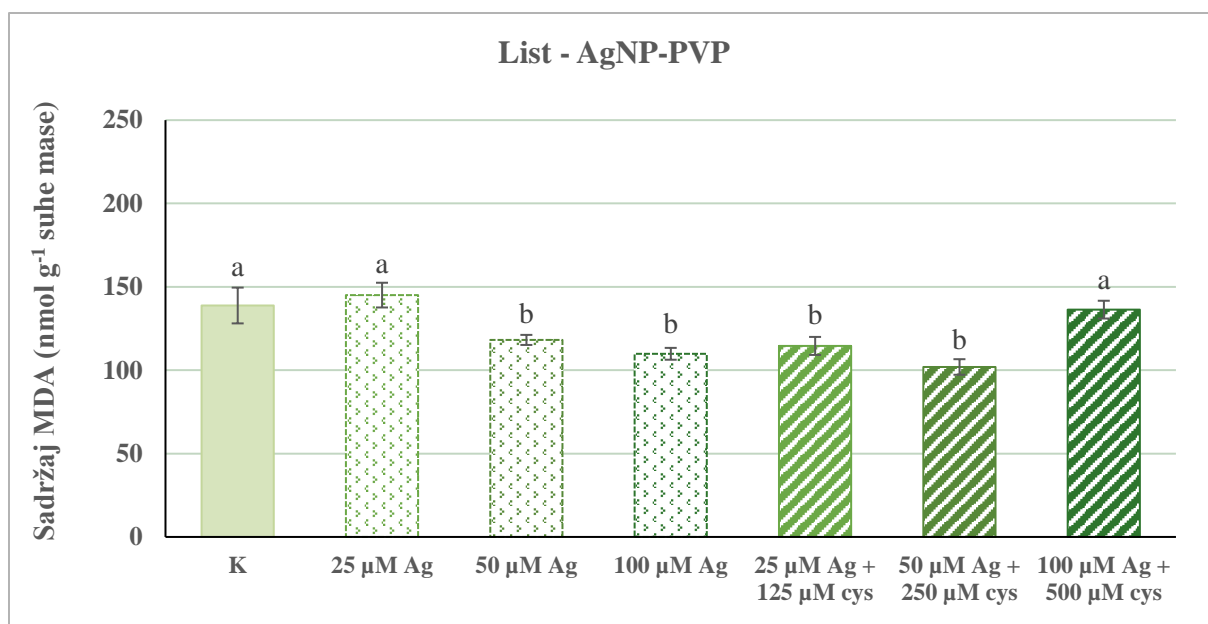
K – kontrola; Ag – AgNO<sub>3</sub>; cys - cistein

### 6.2.2. Sadržaj MDA u listu

U listovima odraslih biljaka duhana zabilježena je smanjena vrijednost sadržaja MDA u listu nakon izlaganja 50 i 100 μM AgNP-PVP te nakon kombiniranih tretmana 25 i 50 μM nanočestica s cisteinom u usporedbi s kontrolom (**Slika 25.**). Dodatak cisteina značajno je umanjio sadržaj samo pri koncentraciji od 25 μM AgNP-PVP, a povećao pri najvećoj koncentraciji AgNP-PVP (100 μM) (**Slika 25.**).

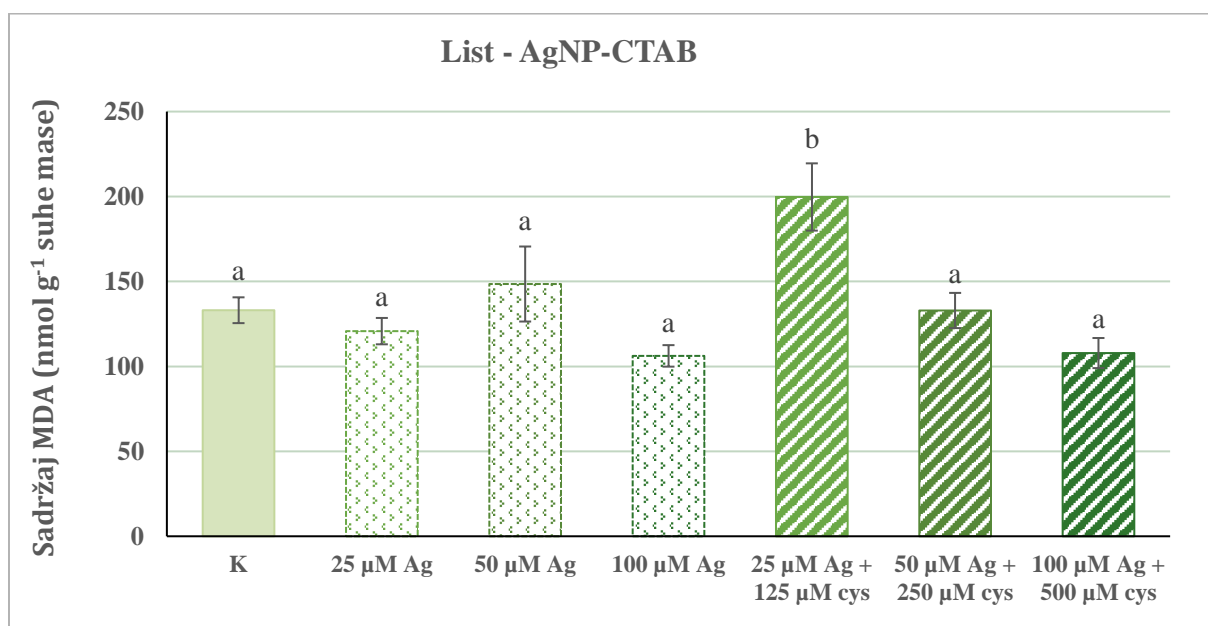
Značajna promjena sadržaja MDA u listovima duhana zabilježena je samo u tretmanu s najnižom koncentracijom AgNP-CTAB (25 μM) u kombinaciji s cisteinom (150 μM), došlo je povećanja sadržaja MDA, dok se svi ostali tretmani pokazali vrijednosti slične kontroli (**Slika 26.**).

U listovima biljaka tretiranih s AgNO<sub>3</sub> uočena je smanjena razina lipidne peroksidacije u odnosu na kontrolu samo pri koncentraciji od 100 μM AgNO<sub>3</sub>, dok je dodatak cisteina povećao sadržaj MDA i rezultirao vrijednostima koje nisu bile značajno različite od kontrolnih vrijednosti povećao (**Slika 27.**).



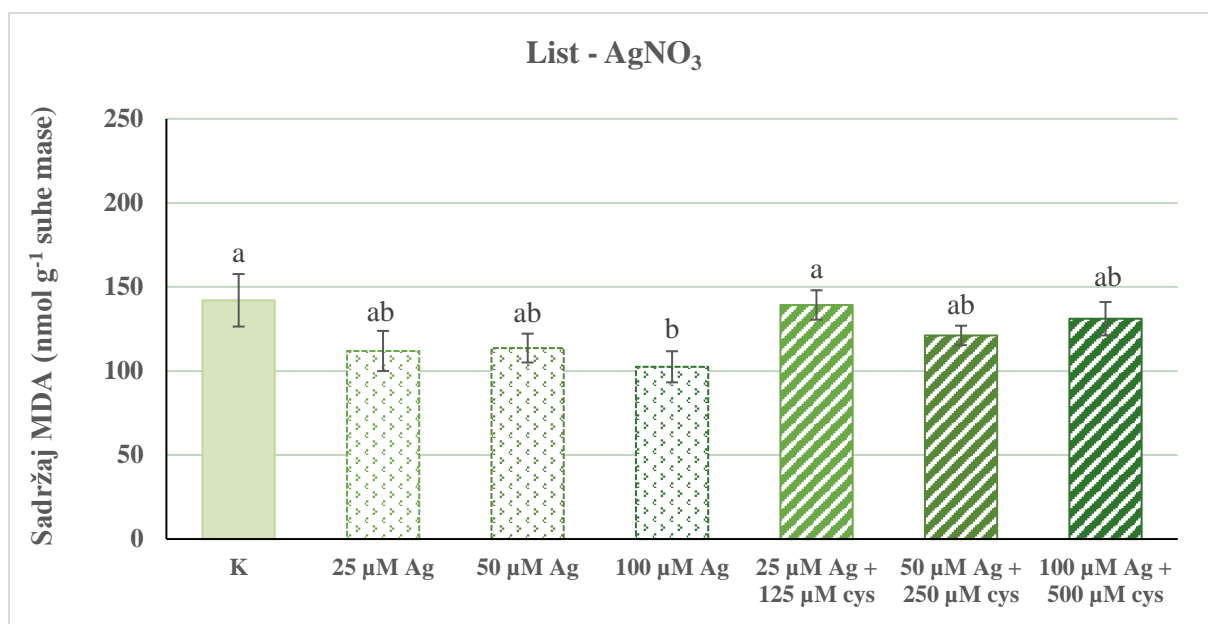
**Slika 25.** Sadržaj MDA u listu nakon izlaganja odraslih biljaka duhana tretmanima s AgNP-PVP te kombinaciji AgNP-PVP i cisteina. Sadržaj je izražen u nmol g<sup>-1</sup> suhe mase.

K – kontrola; Ag – AgNP-PVP; cys - cistein



**Slika 26.** Sadržaj MDA u listu nakon izlaganja odraslih biljaka duhana tretmanima s AgNP-CTAB te kombinaciji AgNP-CTAB i cisteina. Sadržaj je izražen u nmol g<sup>-1</sup> suhe mase.

K – kontrola; Ag – AgNP-CTAB; cys - cistein.



**Slika 27.** Sadržaj MDA u korijenu nakon izlaganja odraslih biljaka duhana tretmanima s AgNO<sub>3</sub> te kombinaciji AgNO<sub>3</sub> i cisteina. Sadržaj je izražen u nmol g<sup>-1</sup> suhe mase. K – kontrola; Ag – AgNO<sub>3</sub>; cys – cistein.

### 6.3. Količina nastalih proteinskih karbonila

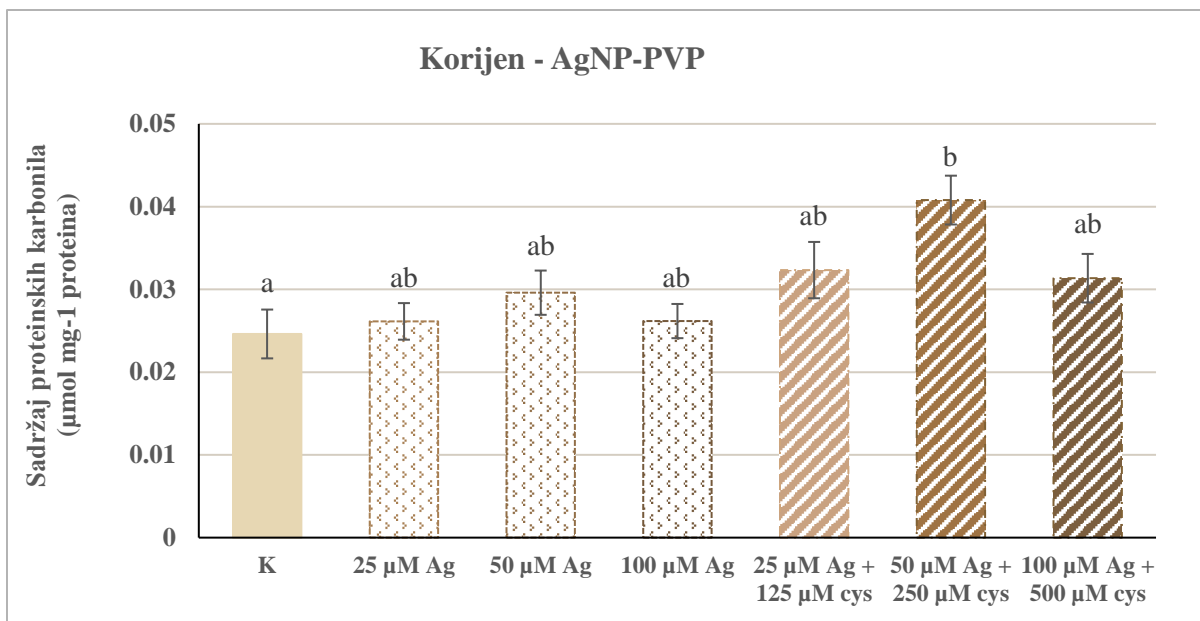
Sadržaj proteinskih karbonila izmjeren je kako bi se odredila razina oksidacije proteina u korijenu i listovima tretiranih biljaka duhana.

#### 6.3.1. Sadržaj proteinskih karbonila u korijenu

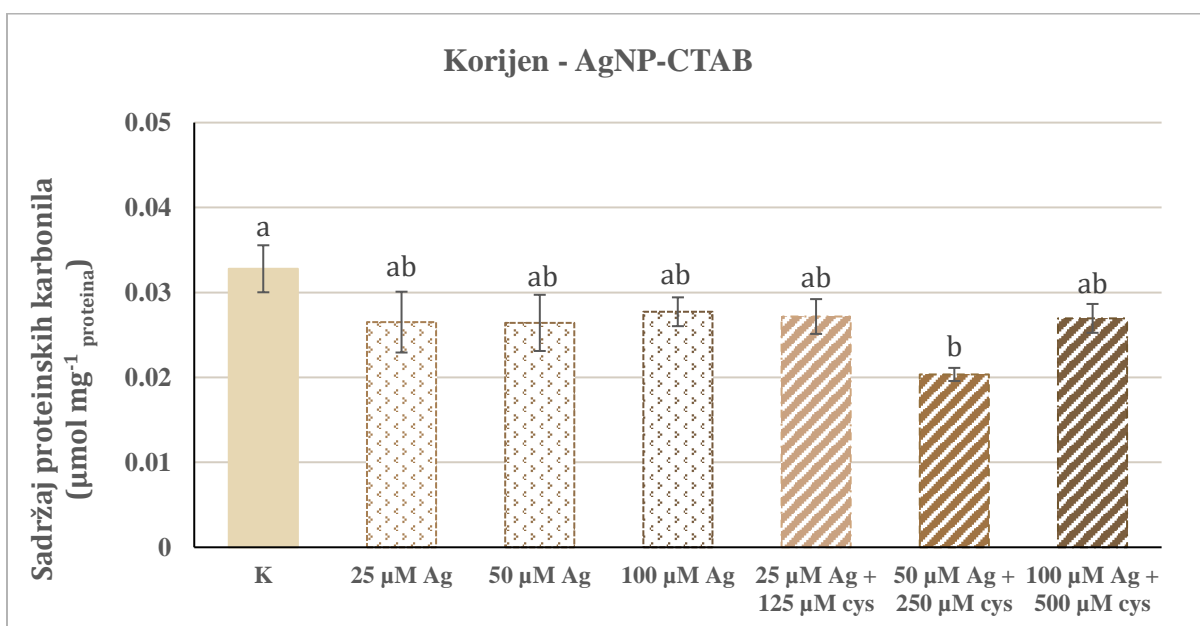
U korijenu biljaka tretiranih s AgNP-PVP izmjerena je statistički povišena razina karbonila samo nakon izlaganja biljaka duhana 50 μM AgNP-PVP u kombinaciji s 250 μM cisteinom, dok su ostali tretmani rezultirali vrijednostima sličnim u kontroli (**Slika 28.**).

Nakon većine tretmana s AgNP-CTAB zabilježene su slične vrijednosti sadržaja proteinskih karbonila kao u kontroli; iznimka je bio jedino tretman sa 50 μM AgNP-CTAB u kombinaciji s 250 μM cisteinom, u kojem je sadržaj karbonila bio značajno smanjen (**Slika 29.**).

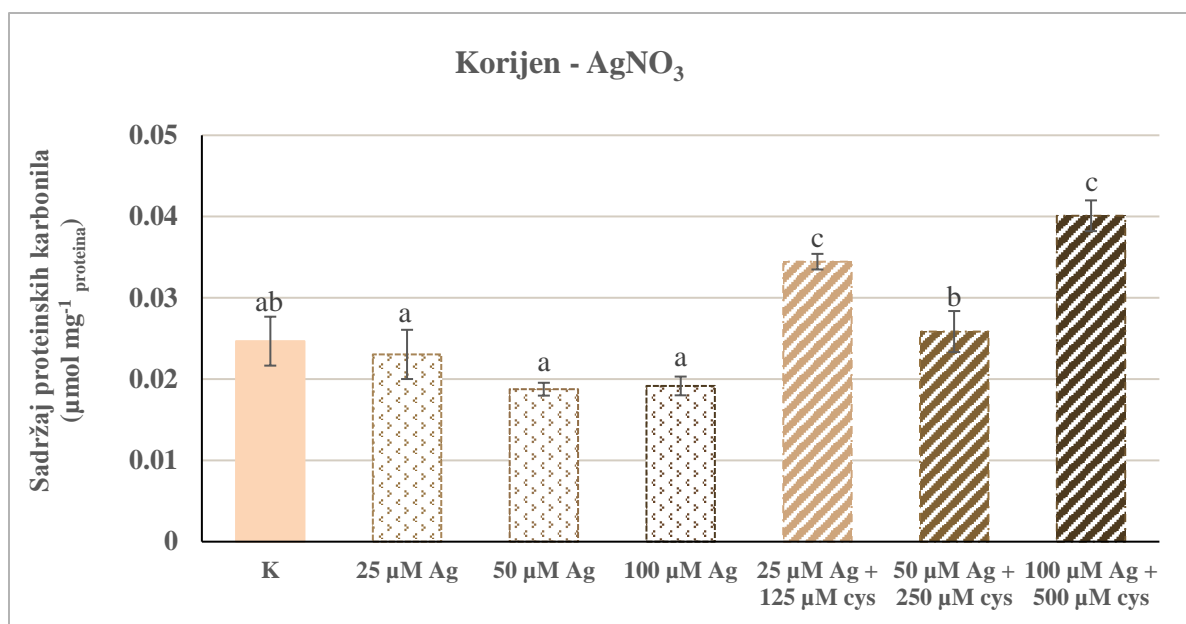
Tretmani biljaka duhana sa samim AgNO<sub>3</sub> pokazali su rezultate vrlo slične onima u kontroli, dok je u kombiniranim tretmanima s cisteinom zabilježeno značajno povećanje (**Slika 30.**).



**Slika 28.** Sadržaj proteinskih karbonila u korijenu nakon izlaganja odraslih biljaka duhana tretmanima s AgNP-PVP te kombinaciji AgNP-PVP i cisteina. Sadržaj je izražen u nmol g<sup>-1</sup> proteina. K – kontrola; Ag – AgNP-PVP; cys – cistein.



**Slika 29.** Sadržaj proteinskih karbonila u korijenu nakon izlaganja odraslih biljaka duhana tretmanima s AgNP-CTAB te kombinaciji AgNP-CTAB i cisteina. Sadržaj je izražen u nmol g<sup>-1</sup> proteina. K – kontrola; Ag – AgNP-PVP; cys – cistein.



**Slika 30.** Sadržaj proteinskih karbonila u korijenu nakon izlaganja odraslih biljaka duhana tretmanima s  $\text{AgNO}_3$  te kombinaciji  $\text{AgNO}_3$  i cisteina. Sadržaj je izražen u  $\text{nmol g}^{-1}$  proteina.

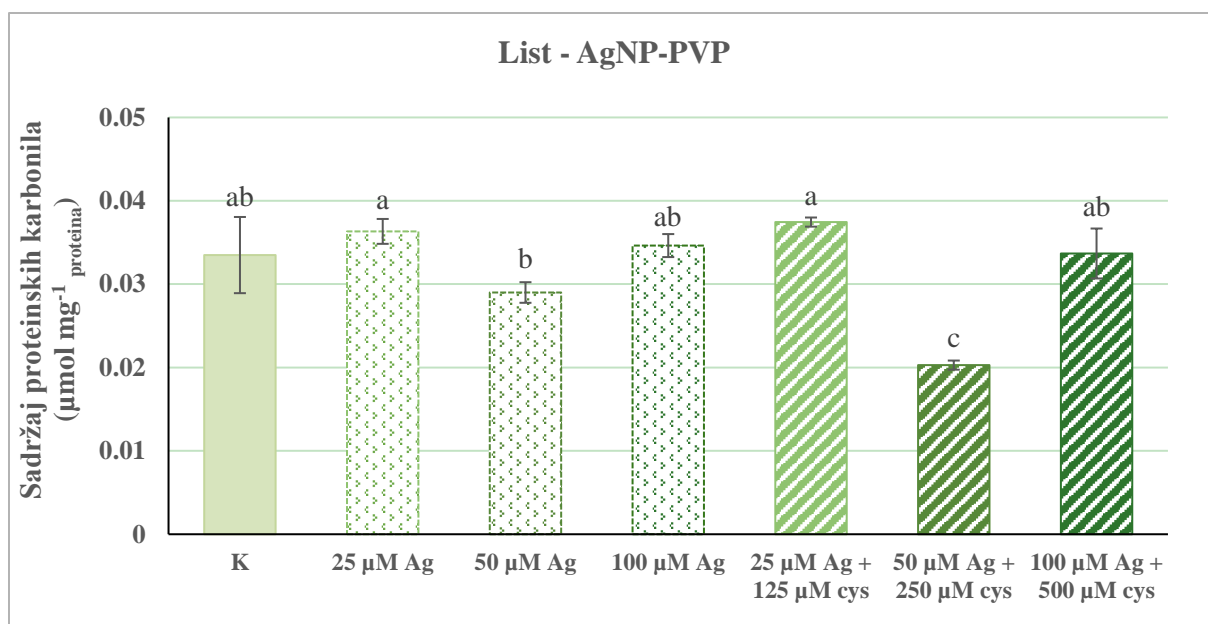
K – kontrola; Ag –  $\text{AgNO}_3$ ; cys – cistein.

### 6.3.2. Sadržaj proteinskih karbonila u listu

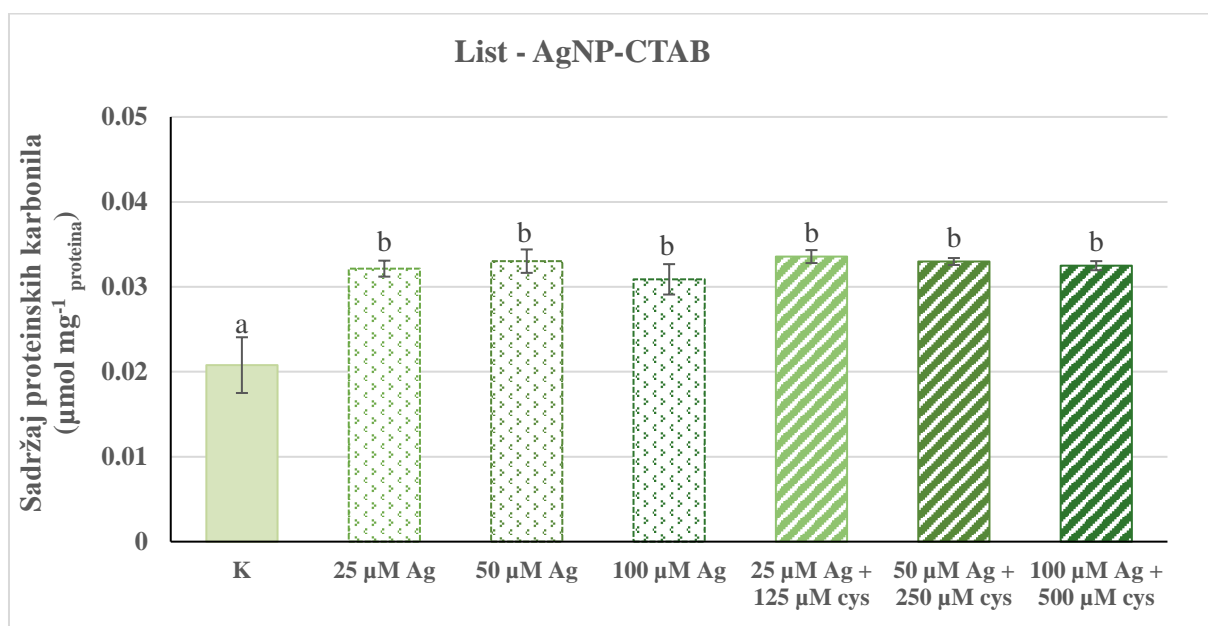
Sadržaj proteinskih karbonila u listovima biljaka tretiranih sa samim AgNP-PVP nije pokazao značajnu promjenu u odnosu na kontrolu, dok je u kombiniranim tretmanima jedino izlaganje  $50 \mu\text{M}$  AgNP-PVP i  $250 \mu\text{M}$  cisteinu pokazalo značajno smanjenu vrijednost (**Slika 31.**).

Nakon tretmana sa svim koncentracijama AgNP-CTAB, samih i u kombinaciji s cisteinom, zabilježen je značajan porast sadržaja proteinskih karbonila u odnosu na kontrolu, a vrijednosti se između tretmana nisu razlikovale (**Slika 32.**).

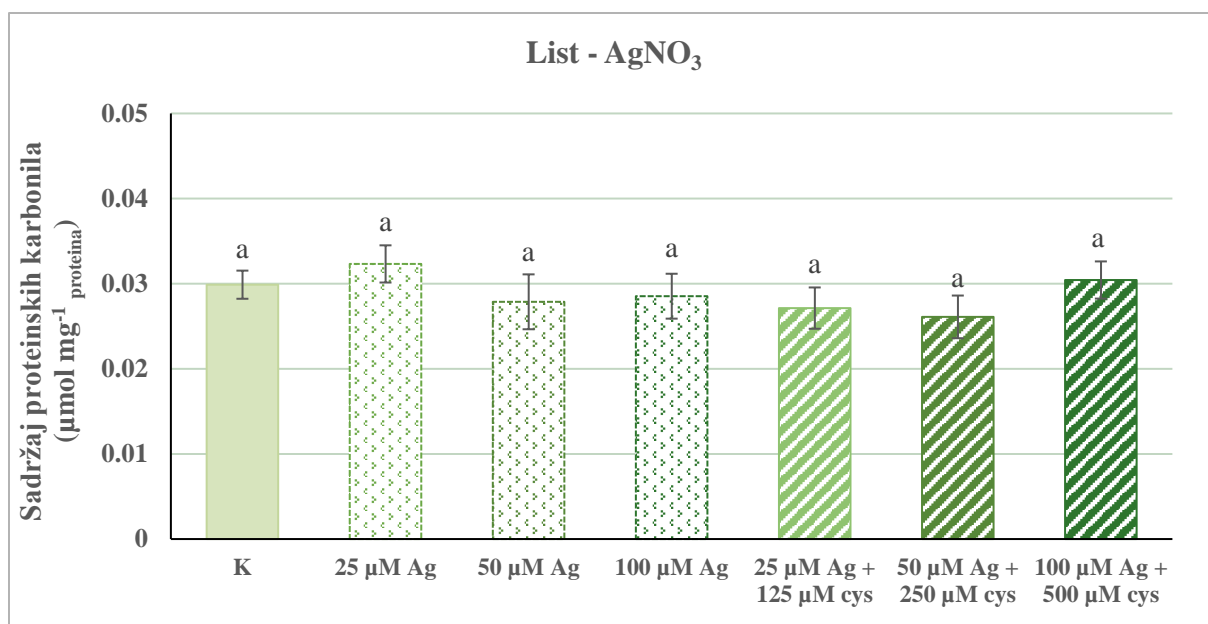
Izlaganje odraslih biljaka duhana tretmanima s  $\text{AgNO}_3$ , samog i u kombinaciji s cisteinom, nije pokazalo značajnu promjenu u sadržaju proteinskih karbonila ni u odnosu na kontrolu ni međusobno (**Slika 33.**).



**Slika 31.** Sadržaj proteinskih karbonila u listu nakon izlaganja odraslih biljaka duhana tretmanima s AgNP-PVP te kombinaciji AgNP-PVP i cisteina. Sadržaj je izražen u nmol g<sup>-1</sup> proteina. K – kontrola; Ag – AgNP-PVP; cys – cistein.



**Slika 32.** Sadržaj proteinskih karbonila u korijenu nakon izlaganja odraslih biljaka duhana tretmanima s AgNP-CTAB te kombinaciji AgNP-CTAB i cisteina. Sadržaj je izražen u nmol g<sup>-1</sup> proteina. K – kontrola; Ag – AgNP-PVP; cys – cistein.



**Slika 33.** Sadržaj proteinskih karbonila u listu nakon izlaganja odraslih biljaka duhana tretmanima s AgNO<sub>3</sub> te kombinaciji AgNO<sub>3</sub> i cisteina. Sadržaj je izražen u nmol g<sup>-1</sup> proteina.

K – kontrola; Ag – AgNO<sub>3</sub>; cys – cistein.

## 7. RASPRAVA

Napretkom nanotehnologije i porastom broja industrijskih grana u kojima se nanotehnologija primjenjuje, istovremeno se povećava i broj toksikoloških istraživanja nanomaterijala. Većinom su istraživanja provedena na bakterijama, algama, životinjama i ljudskim stanicama, a mali broj na višim biljkama (Navarro i sur., 2008). Do sada su rezultati pokazali i pozitivne i negativne utjecaje nanomaterijala na biljke (Navarro i sur., 2008) te se ovim istraživanjem pokušalo odgovoriti na neka pitanja na koja se još čeka odgovor.

Nanočestice srebra vrlo dobro apsorbiraju i raspršuju svjetlost zato što elektroni na metalnoj površini kolektivno osciliraju kada ih svjetlost pobuđuje na određenim valnim duljinama. Optička svojstva nanočestica ovise o promjeru nanočestica, o indeksu loma u blizini površine nanočestica te o agregaciji nanočestica. Kada se čestice agregiraju, optička svojstva nanočestica srebra se mijenjaju jer se elektroni delokaliziraju i dijele sa susjednim česticama. UV-vidljiva spektroskopija može se upotrijebiti kao jednostavna i pouzdana metoda praćenja stabilnosti otopina nanočestica. Kako se čestice destabiliziraju, izvorni pik apsorpcije smanjuje intenzitet zbog iscrpljivanja stabilnih nanočestica, a često se pik proširi ili se čak formira i sekundarni pik na većim valnim duljinama, zbog stvaranja agregata (Träger, 2001). Prema rezultatima analize stabilnosti, provedene u ovom radu, utvrđeno je da su AgNP prilično nestabilne u hranjivom mediju koji se koristi za uzgoj i tretman biljaka duhana. Do tridesete minute mjerenja AgNP-PVP pokazale su maksimalnu apsorbanaciju i najveću stabilnost na valnoj duljini od 433 nm, dok su se s protekom vremena vrijednosti apsorbanacije smanjivale, a maksimumi pomicali prema većim valnim duljinama, što upućuje na agregaciju AgNP i disocijaciju iona  $\text{Ag}^+$ . Slični rezultati dobiveni su i u radu Biba i sur. (2020), a ukazuju na smanjenje stabilnosti AgNP-PVP u tekućoj  $\frac{1}{2}$  MS podlozi koja se koristi za rast biljaka u uvjetima *in vitro*. Drugi tip korištenih nanočestica, AgNP-CTAB, pokazale su se stabilnijima u odnosu na AgNP-PVP u istoj hranjivoj podlozi s manjim promjenama u apsorbanaciji i valnim duljinama maksimuma, što je također u skladu s rezultatima koje su objavili Biba i sur., (2020). No, generalni zaključak koji se može izvesti iz ovih rezultata je kako niti jedan ispitan tip AgNP ne ostaje nepromijenjen u mediju tijekom sedmodnevnog tretmana biljaka, već da su čestice podložne i agregaciji (manje) i disocijaciji iona  $\text{Ag}^+$  (više). Dodatak cisteina to je dodatno potvrdio; ubrzao je raspad nanočestica u mediju, što je također bilo jače izraženo kod AgNP-PVP u odnosu na AgNP-CTAB. Naime, CTAB je relativno labilan ligand u prisutnosti cisteina, pri čemu cistein istiskuje CTAB stvaranjem tiolne veze s površinskim atomima srebra. Slijedom toga, brza aglomeracija AgNP-cisteina proizlazi iz premošćivajućeg učinka kroz vezanje vodika između aaminskih i karboksilnih kiselina cisteinskih liganda na



susjednim nanočesticama (Mandal i sur., 2001). Slična situacija može se pojaviti u slučaju cisteina koji je dodan u AgNP-PVP, međutim, steričko ometanje uzrokovano polimerima dugog lanca može značajno usporiti brzinu kojom dolazi do premošćavanja vezanjem vodika i stoga je primijećeno manje aglomeriranje prema istraživanju Biba i sur., (2020). U svakom slučaju, dobiveni rezultati sugeriraju da se potencijalni fitotoksični učinci AgNP mogu djelomično pripisati i djelovanju ionskog srebra.

Toksičnost AgNP pripisana je brojnim mogućim mehanizmima koji uključuju narušavanje cjelovitosti stanične membrane (Suresh i sur., 2010), vezanje i oštećivanje proteina i molekule DNA (Arora i sur., 2009) i stvaranje ROS (Navarro i sur., 2008). U povoljnim uvjetima ROS čine signalnu mrežu koja je očuvana u svim aerobnim organizmima i kontrolira široki spektar bioloških procesa (Mittler i sur., 2011). Kako bi mogle obavljati svoju ulogu signalnih molekula, ROS u stanici moraju biti prisutne u netoksičnim količinama, što je uvjetovano ravnotežom između količine oksidansa i antioksidansa (Mittler i sur., 2004). Povećanje količine ROS u stanici može dovesti do oksidacijskog stresa. ROS su jaka oksidacijska sredstva i uzrok su oksidacijske štete na biomolekulama poput lipida i proteina, što oslabljuje cjelovitost membrana i povećava propuštanje elektrolita te dovodi do smrti stanice (Anjum i sur., 2013). Višestruko nezasićene masne kiseline su meta stvorenih slobodnih radikala što uzrokuje lipidnu peroksidaciju, a kao posljedica toga je raspad lipidnih hidroperoksida i formiranje različitih reaktivnih aldehida (Esterbauer i Cheeseman, 1990). Stupanj lipidne peroksidacije određen je mjerenjem sadržaja malondialdehida, jednog od krajnjih produkata lipidne peroksidacije. U ovom istraživanju, sadržaj MDA u korijenu biljaka tretiranih nanočesticama srebra bio je značajno manji u odnosu na kontrolu u većini tretmana s AgNP-PVP, a sličan trend smanjenja razine lipidne peroksidacije zabilježen je i u korijenu nakon izlaganja česticama AgNP-CTAB. Razina MDA bila je manja u kombinaciji AgNP s cisteinom nego bez njega, što ukazuje na mogući ublažujući učinak cisteina koji je mogao vezati ione  $\text{Ag}^+$  otpuštene s nanočesticama u hranjivoj podlozi za izlaganje biljaka duhana. Drugačiji rezultati dobiveni su u korijenu biljaka duhana tretiranih s  $\text{AgNO}_3$ , u kojima je razina MDA bila je značajno manja pri svim koncentracijama u odnosu na kontrolu, dok su kombinirani tretmani rezultirali istim ili čak povećanim sadržajem MDA u odnosu na istu koncentraciju samog  $\text{AgNO}_3$ . Ovi rezultati pokazuju da AgNP i  $\text{AgNO}_3$  nemaju isti učinak te da se fitotoksičnost AgNP može, barem djelomično, pripisati djelovanju samih nanočesticama, što je u skladu s nekim ranije objavljenim istraživanjima (Cvjetko i sur., 2017; Anjum i sur., 2013).

Razina MDA u listovima biljaka duhana tretiranih s AgNP-PVP bila je smanjena u većini tretmana u odnosu na kontrolu. Takvu pojavu Xing i sur. (2010) pripisuju nekrozi tkiva i smrti stanica, u kojima je onemogućeno daljnje nakupljanje MDA. U listovima biljaka tretiranih s

AgNO<sub>3</sub> značajno smanjenje sadržaja MDA zabilježeno je samo nakon izlaganja najvišoj ispitanoj koncentraciji, dok su razine MDA u svim kombiniranim tretmanima s cisteinom bile slične kontrolnom uzorku. S obzirom da pad razine koncentracije MDA u ovom slučaju nije od velikog statističkog značaja, za konkretan zaključak bilo bi potrebno provesti isto istraživanje pri većim koncentracijama, jer se ovaj pad može pripisati propadanju tkiva izloženog jakim stresu.

Karbonilacija proteina može, također, poslužiti kao pokazatelj oksidacijskog stresa u biljci i označava kovalentnu modifikaciju proteina potaknutu pojačanim stvaranjem ROS. Razina oksidacije proteina određena je mjerenjem koncentracije proteinskih karbonila u stanici. Razina proteinskih karbonila u korijenu tretiranom s AgNP-PVP bila je povišena samo nakon izlaganja biljaka duhana kombiniranom tretmanu s 50 µM AgNP-PVP i 250 µM cisteina, dok je nakon izlaganja česticama AgNP-CTAB, ista kombinacija nanočestica i cisteina rezultirala znatno smanjenim vrijednostima. Ovakva razlika u učinku AgNP mogla bi se pripisati djelovanju različitih omotača koji su upotrijebljeni za stabilizaciju AgNP. Različit učinak AgNP stabiliziranih s različitim omotačima primijećen je pri pojavi oksidacijskog stresa u korijenčićima luka (Cvjetko i sur., 2017) te isklijavanju sjemenki i rastu klijanaca duhana (Biba i sur., 2020). Količina nastalih proteinskih karbonila u korijenu nakon tretmana s AgNO<sub>3</sub> bila je značajno povećana u svim kombiniranim tretmanima s cisteinom, što je rezultat koji je samo djelomično u skladu s rezultatima tretmana s AgNP, što ponovno ukazuje da se fitotoksičnost AgNP može većim dijelom pripisati djelovanju samih nanočestica.

Promjene u količini proteinskih karbonila u listovima odraslih biljaka duhana zabilježene su samo nakon izlaganja česticama AgNP, iako promjene nisu bile jednake. Naime, AgNP-PVP je izazvao smanjenje u sadržaju karbonila u nekim tretmanima, dok je AgNP-CTAB značajno povećao vrijednosti nakon svih tretmana, što se također može pripisati različitom djelovanju dvaju omotača koji su upotrijebljeni za stabilizaciju. Izostanak promjena u sadržaju proteinskih karbonila u listovima nakon izlaganja biljaka ionskom srebru (AgNO<sub>3</sub>) ponovno govori u prilog tvrdnji da je fitotoksičnost AgNP rezultat većim dijelom samih nanočestica, a tek manjim dijelom iona Ag<sup>+</sup> disociranih s AgNP.

## 8. ZAKLJUČCI

Analize stabilnosti čestica AgNP-PVP i AgNP-CTAB u hranjivoj podlozi ½ MS, korištenoj za uzgoj duhana, pokazale su nestabilnost oba tipa AgNP, iako su AgNP-CTAB ipak nešto stabilnije u usporedbi s AgNP-PVP. AgNP-PVP i AgNP-CTAB utječu na pojavu oksidacijskog stresa u korijenu i listu biljaka duhana, na što su ukazale promjene u sadržaju MDA i karbonila. No, budući da promjene u ovim parametrima oksidacijskog stresa nisu bile jednake nakon tretmana s različitim AgNP, može se zaključiti da fitotoksičnost AgNP ovisi i o stabilnosti AgNP u podlozi za izlaganje i o svojstvima omotača koji se koristi za stabilizaciju AgNP. Tretmani s AgNP i AgNO<sub>3</sub> pokazali su samo djelomično sličan fitotoksični učinak na biljku duhana, što ukazuje da je učinak AgNP manjim dijelom posljedica otpuštanja Ag<sup>+</sup> iona s AgNP, a većim dijelom djelovanja samih nanočestica.

## 9. ZAHVALE

Velike zahvale prof. dr. sc. Biljani Balen na pruženoj prilici, njenom mentorstvu, sugestijama, preporučenoj literaturi i metodologiji istraživanja te pomoći pri izradi ovog rada. Zahvaljujemo i mag. educ. biol. et chem. Renati Biba za stalnu i neposrednu pomoć u izvođenju laboratorijskog dijela ovog istraživanja te pri obradi dobivenih rezultata i njihovoj interpretaciji. Također, zahvalni smo za ugodnu i vedru atmosferu prilikom izvođenja laboratorijskog dijela istraživanja.

Dr.sc. Petri Cvjetko zahvaljujemo na neposrednoj pomoći pri izvođenju laboratorijskog dijela istraživanja. Doc. dr. sc. Petri Peharec Štefanić zahvaljujemo na pripremljenim mikroskopskim slikama nanočestica srebra.

Zahvaljujemo i ostalim djelatnicima Zavoda za molekularnu biologiju na njihovoj pomoći i ukazanom povjerenju.

## 10. LITERATURA

1. Anjum A., N., Gill S., S., Duarte C., A., Pereira, E., Ahmad, I. (2013) Silver nanoparticles in soil-plant systems. *Journal of Nanoparticle Research*, 15,1896. DOI: 10.1007/s11051-013-1896-7.
2. Arora, S., Jain, J., Rajwade, J. M., Paknikar, K. M. (2009) Interactions of silver nanoparticles with primary mouse fibroblasts and liver cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 236, 310-318. DOI: 10.1016/j.taap.2009.02.020
3. Auclair, J., Turcotte, P., Gagnon, C., Peyrot, C., Wilkinson, K.J., Gagné F. (2019) The influence of surface coatings of silver nanoparticles on the bioavailability and toxicity to *Elliptio complanata* Mussels. *Journal of Nanomaterials*, 2019, 1-10. DOI: 10.1155/2019/7843025
4. Balen, B. (2016) Promjene u ekspresiji biljnih proteina izazvane nanočesticama srebra. *Educatio biologiae*, 2, 115-130.
5. Bardaxoglou, G., Rouleau C., Pelletier E. (2017) High stability and very slow dissolution of bare and polymer coated silver nanoparticles dispersed in river and coastal waters. *Journal of Aquatic Pollution and Toxicology*, 1, 2-15.
6. Bažok, R., Cenko, P. (2016) Fitotoksičnost kombinacija insekticidnih i fungicidnih pripravaka na ukrasnu vrstu *Petunia* sp., *Poljoprivreda*, 2, 34-39.
7. Berg M., J., Tymoczko, J., Strye, L. (2013) *Biokemija*. 6. izdanje. Zagreb, Školska knjiga.
8. Beriša, E., (2016) Nova era primjene srebra u medicini, Vaše zdravlje
9. Biba, R., Matic, D., Lyons, D.M., Štefanić, P.P., Cvjetko, P., Tkalec, M., Pavoković, D., Letofsky-Papst, I., Balen, B. (2020) Coating-dependent effects of silver nanoparticles on tobacco seed germination and early growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 3441. DOI: 10.3390/ijms21103441.
10. Biba, R., Tkalec, M., Cvjetko, P., Peharec Štefanić, P., Šikić, S., Pavoković, D., Balen, B. (2020) Silver nanoparticles affect germination and photosynthesis in tobacco seedlings. *Acta Botanica Croatica*. DOI: 10.37427/botcro-2020-029
11. Bogdanović, S., Mitić, B., Ruščić, M., Dolina, K. (2006) *Nicotiana glauca* Graham (Solanaceae), a new invasive plant in Croatia. *Acta Botanica Croatica*, 65(2), 203-209.
12. Castegna, A., Drake, J., Pocernich, C., Butterfield, D. A. (2003) Protein carbonyl levels – An assessment of protein oxidation. U: Hensley K, Floyd RA (ur.) *Methods in Pharmacology and Toxicology: Methods in Biological Oxidative Stress*. Totowa, *Humana Press Inc.*, 161-168.

13. Cai, H., Gao, D. (2011) Phytotoxicity of salts in composted sewage sludge and correlation with sodium chloride, calcium nitrate, and magnesium nitrate. *Journal of Plant Nutrition*, DOI: 10.1080/01904167.2011.600406
14. Campisi, S., Schiavoni, M., Chan-Thaw, C. E., Villa, A. (2016) Untangling the role of the capping agent in nanocatalysis: Recent advances and perspectives. *Catalysts*, 6(12):185.
15. Chen Ye, Fan Zhang, Xue Tan, Huifang Sun, Wen Dai, Ke Yang, Minghui Yang, Shiyu Du, Dan Dai, Jinhong Yu, Nan Jiang, Weitao Su, Li Fu, He Li, Jing Kong, Cheng-Te Lin (2020) A dense graphene monolith with poloxamer prefunctionalization enabling aqueous redispersion to obtain solubilized graphene sheets. *Chinese Chemical Letters*, DOI:10.1016/j.ccllet.2020.01.021.
16. Cvjetko, P., Zovko, M., Peharec Štefanić, P., Biba, R., Tkalec, M., Domijan, A.M., 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. DOI: 10.1007/s11356-017-0928-8.
17. Esterbauer, H., Cheeseman, K.H. (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 186, 407-421.
18. Ganapathi, T. R., Suprasanna, P., Rao, P. S., Bapat, V. A. (2004) Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) – A model system for tissue culture interventions and genetic engineering, *Indian Journal of Biotechnology*, 3, 171-184.
19. Gill, S. S., Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 909-930.
20. Gopinath, P., Gogoi, S. K., Sanpui, P., Paul, A., Chattopadhyay, A., Ghosh, S. S. (2010) Signaling gene cascade in silver nanoparticle induced apoptosis. *Colloids and Surfaces B*, 77, 240–245.
21. Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Fujita, M. (2013) Extreme temperature responses, oxidative stress and antioxidant defense in plants. U: Vahdati, K. (ur.), *Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture*. IntechOpen, str. 169-205.
22. Held, P. (2014) An introduction to reactive oxygen species measurement of ROS in cells. BioTek. Dostupno na: <https://www.biotek.com/resources/white-papers/an-introduction-to-reactive-oxygen-species-measurement-of-ros-in-cells/> [25.07.2020.]
23. Irvani, S., Korbekandi, H., Mirmohammadi, V. S., Zolfaghari, B. (2014) Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 9(6), 385-406.

24. Jarnević, M. (2017) Utjecaj nanočestica i iona srebra na proteom duhana (*Nicotiana tabacum* L.). Diplomski rad. Zagreb: Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet.
25. Jiang, H.S., Yin, L.Y., Ren, N.N., Zhao, S.T., Li, Z., Zhi, Y., Shao, H., Li, W., Gontero, B. (2017) Silver nanoparticles induced reactive oxygen species via photosynthetic energy transport imbalance in an aquatic plant. *Nanotoxicology*, 11, 157–167, DOI: 10.1080/17435390.2017.1278802.
26. Kawata, K., Osawa, M., Okabe, S. (2009) In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. *Environmental Science and Technology*, 43, 6046–6051.
27. Khan, M. M., Kalathil, S., Lee, J., Cho, M. H. (2012) Synthesis of cysteine capped silver nanoparticles by electrochemically active biofilm and their antibacterial activities. *Bulletin - Korean Chemical Society*. 33(8).
28. Klitzke, S., Matreveli, G., Peters, A., Schaumann, G. E., Lang F. (2015) The fate of silver nanoparticles in soil solution — Sorption of solutes and aggregation. *Science of the Total Environment*, 535, 54-60.
29. Krogmeier, M.J., McCarty, G.W., Bremner, J.M. (1989) Phytotoxicity of foliar-applied urea. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(21), 8189-8191.
30. Lee, H. S., Jun, H.B. (2019) Silver nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(4), 865, DOI:10.3390/ijms20040865.
31. Lugon-Moulin, N., Zhang, M., Gadani, F., Rossi, L., Koller, D., Krauss, M., Wagner, G. J. (2004) Critical view of the science and options for reducing cadmium in tobacco (*Nicotiana tabacum*, L.) and other plants. *Advances in Agronomy*, 83:111-180.
32. Mandal, S., Gole, A., Lala, N., Gonnade, R., Ganvir, V., Sastry, M. (2001) Studies on the reversible aggregation of cysteine-capped colloidal silver particles interconnected via hydrogen bonds. *Langmuir*, 17, 6262–6268.
33. Miralles, P., Church, T.L., Harris, A.T., (2012) Toxicity, uptake, and translocation of engineered nanomaterials in vascular plants, *Environ Sci Technol.*, 46,9224–9239.
34. Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 9, 490-498.

35. Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., Van Breusegem, F. (2011) ROS signaling: The new wave? *Trends in Plant Science* 16, 300-309.
36. Mody, V.V., Siwale, R., Singh, A., Mody, H.R., (2010) Introduction to metallic nanoparticles, *J Pharm and Bioallied Sci.*, 2(4),282-289.
37. Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15.
38. Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L., Behra, R. (2008) Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science and Technology*, 42,8959-8964.
39. Nguyen, K.C., Seligy, V. L., Massarsky, A., Moon, T. W., Rippstein, P., Tan J., Tayabali, A. F. (2013) Comparison of toxicity of uncoated and coated silver nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series*, 429.
40. Oldenburg, S. J. (2014) *Silver Nanoparticles: Properties and Applications*, Merck, Dostupno na: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/nanomaterials/silver-nanoparticles.html> [20.06.2020.]
41. Oliviera, M. M., Ugarte, D., Zanchet, D., Zarbin, J. G. A. (2005) Influence of synthetic parameters on the size, structure, and stability of dodecanethiol-stabilized silver nanoparticles, *Journal od Colloid and Interface Science*, 292, 429-435.
42. Parčetić - Kostelac, I., Bešlo, D., Šperanda, M, Kopačin, T., Jozinović, A., Jović, T., Đidara, M. (2016) Oksidacijski stres u uvjetima intenzivnog fizičkog napora u ljudi i životinja. *Stočarstvo: Časopis za unapređenje stočarstva*, 70(2).
43. Peharec Štefanić, P., Jarnević, M., Cvjetko, P., Biba, R., Šikić, S., Tkalec, M., Cindrić, M., Letofsky-Papst, I., Balen, B. (2019) Comparative proteomic study of phytotoxic effects of silver nanoparticles and silver ions on tobacco plants. *Environmental Science and Pollution Research*, DOI: 10.1007/s11356-019-05552w.
44. Rico, C. M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J.L. (2011) Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
45. Ritter, R.L., Coble, H.D. (1981) Influence of temperature and relative humidity on the activity of acifluorfen. *Weed Science*, 29(4), 480-485.
46. Roberts, J., Power, A., Chapman, J., Chandra, S., Cozzolino, D. (2018) The use of UV-Vis spectroscopy in bioprocess and fermentation monitoring. *Fermentation*, 2018, 4, 18. DOI:10.3390/fermentation4010018.



47. Suresh, K., Sivakumar, K., Vijayaanand, M. A., Rajalingam, K., Rajkamal, G. (2010) Anti-lipid peroxidative and antioxidant effects of *Zingiber officinale* roscoe root extract in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene induced oral carcinogenesis, *Pharmacologyonline*, 2, 689-701.
48. Škobalj, A. (2019) Spektrofotometrija, Prirodoslovna škola Split.
49. Štefan, L., Tepšić, T., Zavidčić, T., Urukalo, M., Tota, D., Domitrović, R. (2007) Lipidna peroksidacija – uzroci i posljedice. *Medicina*, 43,84-93.
50. Träger, F. (2001) Optical properties and ultrafast electron dynamics in gold–silver alloy and core–shell nanoparticles, *Applied Physics B*, 73, 291.
51. Vanini, C., Domingo, G., Onelli, E., Prinsi, B., Marsoni, M., Espen, L. (2013) Morphological and proteomic responses of *Eruca sativa* exposed to silver nanoparticles or silver nitrate. *PLoS ONE* 8(7). DOI:10.1371/journal.pone.0068752.
52. Xing, W., Li, D., Liu, G. (2010) Antioxidative responses of *Elodea nuttallii* (Planch.) H. St. John to short-term iron exposure. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 873-878.
53. Yin, L., Cheng, Y., Espinasse, B., Colman, B.P., Auffan, M., Wiesner, M., Rose, J., Liu, J., Bernhardt, E.S. (2011) More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environmental Science and Technology*, 45(6), 2360-2367.
54. Zuin, S., Micheletti, C., Critto, A., Pojana, G., Johnston, H., Stone, V., Tran, L., Marcomini, A., (2011) Weight of evidence approach for the relative hazard ranking of nanomaterials. *Nanotoxicol*, 5(3),445–458.

## 11. SAŽETAK

Mirna Jaklinović, Luka Kobelščak, Albina Načkar, Lina Vinković

### Fitotoksični učinci nanočestica srebra stabiliziranih omotačima na biljku duhana (*Nicotiana tabacum L.*)

Nanočestice srebra (AgNP) sve su zastupljenije u proizvodima široke potrošnje zbog izraženih protugljivičnih i protubakterijskih svojstava. Jedinstvena fizikalna i kemijska svojstva nanočestica razlog su njihove sve veće zastupljenosti u industriji, iako njihov utjecaj na okoliš i žive organizme još nije dovoljno istražen. U ovom radu ispitano je djelovanje 25, 50 i 100  $\mu\text{M}$  AgNP, stabiliziranih omotačima od polivinilpirolidona (PVP) i cetiltrimetilamonijevog bromida (CTAB), na biljku duhana (*Nicotiana tabacum L.*), i uspoređeno s utjecajem srebrovog nitrata ( $\text{AgNO}_3$ ). Da se utvrdi potječe li učinak AgNP od samih nanočestica ili i od iona  $\text{Ag}^+$  koje one otpuštaju, ispitana je i kombinacija svih tretmana s cisteinom (125, 250 i 500  $\mu\text{M}$ ), dobrim kelatorom  $\text{Ag}^+$  iona. Spektrofotometrijski je analizirana stabilnost AgNP u tekućoj hranjivoj podlozi, kao i sadržaj malondialdehida (MDA) i proteinskih karbonila u korijenu i listu tretiranih i kontrolnih biljaka. Analize stabilnosti pokazale su nešto veću stabilnost AgNP-CTAB u odnosu na AgNP-PVP, iako su oba tipa čestica bila nestabilna i sklona agregaciji te, manjim dijelom, otpuštanju  $\text{Ag}^+$  iona. Učinak oba tipa AgNP na sadržaj MDA i proteinskih karbonila u korijenu i listovima bio je sličniji u usporedbi s učinkom  $\text{AgNO}_3$ , što pokazuje da je fitotoksičnost AgNP rezultat većim dijelom samih nanočestica, a tek manjim dijelom iona  $\text{Ag}^+$  disociranih s AgNP. Između dva tipa AgNP, čestice s CTAB omotačem pokazale su veću toksičnost u odnosu na AgNP-PVP, što se može pripisati djelovanju samog omotača, ali i nešto većom stabilnošću AgNP-CTAB u korištenoj hranjivoj podlozi  $\frac{1}{2}$  MS.

Ključne riječi: nanočestice srebra, duhan, malondialdehid, proteinski karbonili

## 12. SUMMARY

**Mirna Jaklinović, Luka Kobelščak, Albina Načkar, Lina Vinković**

### **Phytotoxic effects of differently coated silver nanoparticles in tobacco plants**

*(Nicotiana tabacum L.)*

Silver nanoparticles (AgNPs) are becoming more and more represented in consumer products because of their expressed antifungal and antibacterial properties. Unique chemical and physical properties, that are the reason of their increasing utilization in science and industry, also create a growing concern about their potentially toxic effects on the environment and living organisms. In this study, we investigated the effects of AgNPs, stabilized with polyvinylpyrrolidone (PVP) and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB), on tobacco plants (*Nicotiana tabacum L.*), and compared with the effects of silver nitrate (AgNO<sub>3</sub>). Concentrations of 25, 50 and 100 µM of AgNP and AgNO<sub>3</sub>, individually and in combination with cysteine (125, 250 and 500 µM), a strong silver ligand, were analysed, to determine whether the effects of AgNPs are nanoparticle-specific or come as a result of Ag<sup>+</sup> ions released from the nanoparticles. Stability of AgNPs in a liquid nutrient medium was spectrophotometrically examined. Content of malondialdehyde (MDA), as an indicator of lipid degradation, as well as the content of protein carbonyls, that demonstrate the level of protein damage, was measured. AgNP-PVP appear to be more stable in the medium compared to AgNP-CTAB, although both types of AgNPs have proven to be unstable and tend to aggregate and release Ag<sup>+</sup> ions. Obtained results indicate that AgNPs had more similar effects on the production of MDA and protein carbonyls in the root and the leaf than AgNO<sub>3</sub>, which indicates that phytotoxicity comes mostly from nanoparticles and less from dissolved Ag<sup>+</sup> ions. Between the two types of AgNPs, particles with CTAB coating have shown to be toxic then particles with PVP coating, which can be ascribed to the coating properties as well as to the higher stability of AgNP-CTAB in the ½ MS liquid nutrient medium.

**Keywords:** silver nanoparticles, tobacco, malondialdehyde, protein carbonyls