



Sveučilište u Zagrebu

FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Tea Crnković

OKSIDATIVNI STRES U SLATKOVODNOM RAČIĆU
***DAPHNIA MAGNA* NAKON IZLAGANJA**
NANOČESTICAMA SREBRA

Zagreb, 2015.

Ovaj rad izrađen je pod vodstvom dr. sc. Ivane Vinković Vrček s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada iz Zagreba i izv. prof. dr. sc. Irene Žuntar s Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a u suradnji s Nastavnim zavodom za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ iz Zagreba. Predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2014./2015.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Nanomaterijali i njihova primjena	1
1.2. Nanočestice srebra	4
1.3. Toksikologija nanočestica srebra.....	8
1.4. Oksidativni stres	12
1.4.1. Stvaranje reaktivnih kisikovih specija.....	13
1.4.2. Eliminacija reaktivnih kisikovih specija	14
1.4.3. Određivanje reaktivnih kisikovih specija	15
1.5. Biomarkeri u ekotoksikologiji	15
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	18
3. MATERIJALI I METODE	19
3.1. Priprema nanočestica srebra	19
3.1.1. Sinteza	19
3.1.2. Pročišćivanje	20
3.1.3. Karakterizacija	20
3.2. Testni organizam – <i>Daphnia magna</i>	24
3.3. Akutni test toksičnosti	25
3.4. Biomarkeri oksidativnog stresa	25
3.4.1. Metode detekcije biomarkera	25
3.4.2. Priprema testnih organizama	27
3.4.3. Reaktivne kisikove specije	28
3.4.4. Reducirani glutation	30
3.4.5. Katalaza	31
3.4.6. Superoksid dismutaza.....	31
3.4.7. Statistička obrada	32

4.	REZULTATI I RASPRAVA	33
4.1.	Karakterizacija nanočestica srebra	33
4.2.	Akutni test toksičnosti	37
4.3.	Biomarkeri oksidativnog stresa	38
5.	ZAKLJUČAK	44
6.	ZAHVALE	45
7.	LITERATURA	46
8.	SAŽETAK	52
9.	SUMMARY	53
10.	ŽIVOTOPIS	54

POPIS KRATICA I SIMBOLA

AA	askorbinska kiselina; vitamin C
KAT	katalaza
DCF	2',7'-diklorofluorescein
DCFH-DA	2',7'-diklorodihidrofluorescein diacetat
DHE	dihidroetidij
DLS	dinamičko raspršenje svjetlosti (od eng. <i>Dynamic Light Scattering</i>)
EDTA	etilendiaminotetraoctena kiselina
EOH	2-hidroetidij
g	jakost magnetskog polja Zemlje [9,81 m/s ²]
GSH	reducirani glutation
ISE	ion selektivna elektroda
M	mol/L
Mr	relativna molekulska masa [g/mol]
NADPH	reducirani nikotin adenin dinukleotid fosfat
OECD	(od eng. <i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>)
PB	fosfatni pufer (od eng. <i>Phosphate Buffer</i>)
REACH	(od eng. <i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i>)
ROS	reaktivne kisikove specije (od eng. <i>Reactive Oxygen Species</i>)
rpm	okretaji po minuti
SM	standardni medij za kulture
SERS	(od eng. <i>Surface Enhanced Raman Scattering</i>)
SOD	superoksid dismutaza
SPR	(on eng. <i>Surface Plasmon Resonance</i>)
TEM	transmisijska elektronska mikroskopija (od eng. <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
UV	ultračista voda

POPIS SLIKA

Slika 1.1. Skala koja preikazuje veličinu nanočestica (preuzeto iz [3]).

Slika 1.2.a. Sektori u kojima se primijenjuje nanosrebro (preuzeto iz [8]).

Slika 1.2.b. Top-down i bottom-up pristupi sintezi nanočestica (preuzeto iz [3]).

Slika 1.2.c. Rast i stabilizacija nanočestica (preuzeto iz reference [9]).

Slika 1.3. Toksičnosti nanočestica srebra kod različitih organizama (preuzeto iz [2]).

Slika 1.4.a. Reaktivne kisikove specije. Crvena točka predstavlja nesparen elektron (preuzeto iz [18]).

Slika 1.4.b. Putevi metabolizma kisika u organizmu (preuzeto iz [17]).

Slika 1.5. Predložena primjena biokemijskih biomarkera u okolišnim studijama zagađenja (preuzeto iz [28]).

Slika 3.2. *Daphnia magna* (preuzeto iz [42]).

Slika 3.4.1.2. UV-Vis spektrofluorimetar (preuzeto iz [43]).

Slika 3.4.3.a. Oksidacija dihidroetidija u 2-hidroetidij (preuzeto iz [18]).

Slika 3.4.3.b. Oksidacija DCFH-DA (preuzeto iz [18]).

Slika 4.1.a. Nepročišćene (lijevo) i pročišćene (desno) nanočestice srebra obložene citratom.

Slika 4.1.b. Dijagram distribucije veličina AgNPs u UV nakon 48 h.

Slika 4.1.c. Dijagram distribucije veličina AgNPs u SM nakon 48 h.

Slika 4.1.d. Agregacija nanočestica srebra tijekom 48 h u SM.

Slika 4.1.e. TEM slika nanočestica srebra u UV.

Slika 4.1.f. TEM slika agregiranih nanočestica srebra u SM.

Slika 4.3.a. In vivo utjecaj nanoAg i Ag⁺ na oksidativni stres induciran u neonatima vrste *Daphnia magna* nakon akutnog izlaganja tijekom 48 h. Razina ROS-a izmjerena pomoću DCFH-DA.

Slika 4.3.b. In vivo utjecaj AgNP i Ag⁺ na oksidativni stres induciran u neonatima vrste *Daphnia magna* nakon akutnog izlaganja tijekom 48 h. Razina ROS-a izmjerena pomoću DHE.

Slika 4.3.c. In vivo utjecaj AgNP i Ag⁺ na oksidativni stres induciran u Daphnije magne nakon akutnog izlaganja. Razina CAT.

Slika 4.3.d. In vivo utjecaj AgNP i Ag⁺ na oksidativni stres induciran u Daphnije magne nakon akutnog izlaganja. Razina GSH.

Slika 4.3.e. In vivo utjecaj AgNP i Ag⁺ na oksidativni stres induciran u Daphnije magne nakon akutnog izlaganja. Razina SOD.

POPIS TABLICA

Tablica 1.1. Nanomaterijali među nama: njihovi rizici i dobrobiti (preuzeto iz [4]).

Tablica 1.2. Povećana primjena nanosrebra u medicinskim proizvodima (preuzeto iz [3]).

Tablica 1.3. Mogući efekti nanočestica kao temelj patofiziologije i toksičnosti (preuzeto iz [16]).

Tablica 3.1.3.1. Program spaljivanja nanočestica srebra kod određivanja koncentracije na atomskom apsorpcijskom spektrofotometru.

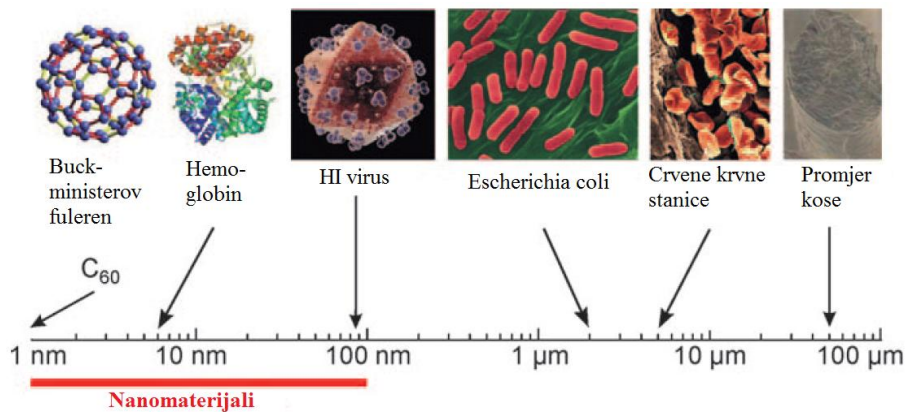
Tablica 4.1. Hidrodinamički promjer, ζ potencijal i polidisperzijski indeks sintetiziranih nanočestica u UV i SM.

1. UVOD

1.1. Nanomaterijali i njihova primjena

Nanotehnologija predstavlja danas jedno od najbrže rastućih industrijskih područja i smatra se kao sljedećom industrijskom revolucijom [1]. Globalna socioekonomska vrijednost nanotehnologije ubrzano i stalno raste, nanomaterijali imaju značajan utjecaj na gotovo sva područja društva.

Prema zadnjem izvještaju o nanotehnologiji Europske Komisije iz 2013. godine, nanomaterijali su definirani kao prirodni ili proizvedeni materijali koji sadrže čestice u nevezanom stanju, u agregatima ili u aglomeratima od kojih 50 % ili više čestica ima jednu ili više dimenzija u rasponu od 1 do 100 nm [2].



Slika 1.1. Skala koja prikazuje veličinu nanočestica (preuzeto iz [3]).

Nanomaterijali danas imaju vrlo raširenu primjenu, a samo neki primjeri načina upotrebe nanočestica nabrojani su u Tablici 1.1. U toj tablici navedeni su i rizici, odnosno koristi primjene nanočestica.

Tablica 1.1. Nanomaterijali među nama: njihovi rizici i dobrobiti (preuzeto iz [4]).

Primjena	Rizik	Dobrobit
Nanokristali u fotovoltičnim uređajima	Svjetlosno zagađenje u ruralnim područjima, oportunistički trošak za ekonomije fosilnog goriva	Zelena, obnovljiva energija, novi samoosvjetljujući zasloni za elektroničke uređaje
Antimikrobni zavoji za rane s nanosrebrom	Otpuštanje biocida u okoliš, šteta za prirodne mikrobnе sustave	Poboljšano zacjeljivanje rana i smanjen rizik od infekcija
Kreme za sunčanje s titanovim dioksidom koji učinkovito apsorbira UV zračenje	Šteta uzrokovana titanom na vodene organizme i ekosustave pješćanih obala	Proizvodnja transparentnih i učinkovitih kreme za sunčanje. Potencijalno smanjenje pojavnosti raka kože.
Suplementi metalnih nanomaterijala za povećavanje efikasnost sagorijevanja goriva	Respiratorno izlaganje nanomaterijalima iz ispušnih cijevi. Široki domet transporta nanočestica u atmosferu	Manje čađe iz dizelskih vozila i manje zagađenja urbanog zraka. Efikasno sagorijevanje zrakoplovnih goriva. Smanjen učinak staklenika
Medicinska primjena hidroksiapatita i nanosilikata u rekonstrukciji kosti	Erodირane čestice s površine mogu prouzročiti patologiju u drugim unutarnjim organima	Strukturni popravci zubi i kosti koristeći prirodne materijale koji su već u tijelu (nema imunog odgovora)
Nanomaterijali u pakiranjima za hranu	Nenamjerni unos nanomaterijala s pakiranja u hranu. Nesiguran rizik cjeloživotnog oralnog izlaganja nanočesticama	Jača i lakša pakiranja za zaštitu mekane hrane, antibakterijsko pakiranje za duži rok trajanja. Povećana sigurnost hrane
Upotreba ugljikovih nanocijevčica za sportsku opremu	Otpuštanje nanomaterijala u okoliš, s odlagališta na kraju njihove upotrebe?	Bolji proizvodi koji traju duže. Smanjuju ozljede povezane sa sportom
Upotreba nanomaterijala kao katalizatora u industrijskim procesima	Nepažljiva ugradnja toksičnih katalizatora u potrošačke proizvode, odbacivanje katalizatora na odlagališta	Poboljšana efikasnost i ekonomija industrijskih procesa. Manje industrijskog otpada po toni proizvoda
Upotreba nanomaterijala u filtraciji i pročišćavanju vode	Nenamjerno izlaganje ekosustava nanomaterijalima putem vode	Novi izvori prijenosne, sigurne vode za piće u siromašnim područjima. Efikasniji sustavi pročišćivanja vode. Smanjeno izlaganje patogenim organizmima i toksinima

Od svih metala, nanočestice srebra danas imaju najveću komercijalizaciju, kako u znanosti tako i u industriji, medicini i osobnim proizvodima, koja je rezultat njihovog izraženog

antimikrobnog djelovanja [3]. Njihova se godišnja globalna proizvodnja procijenjuje na 55 tona [5].

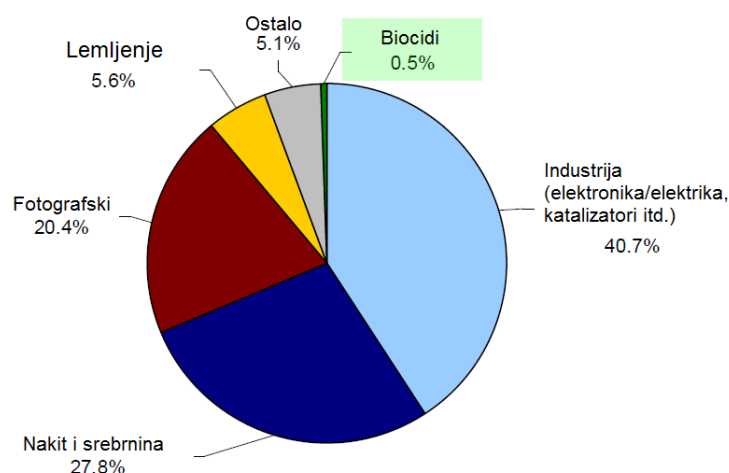
Pravna regulacija proizvodnje, primjene i upotrebe nanomaterijala zadana je okvirima regulative Europske Unije pod nazivom REACH. REACH (od eng. *Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) označava „Registraciju, evaluaciju, autorizaciju i restrikciju kemikalija“, a odnosi na proizvodnju i upotrebu kemijskih tvari te njihov potencijalni utjecaj na ljudsko zdravlje i okoliš. Ona predstavlja okvir za zakonodavstvo u području proizvodnje, stavljanje na tržište i samostalne primjene kemijskih tvari. Glavna obveza REACH-a je registracija tvari proizvedenih u količini od jedne tone ili više, te pružanje informacija u lancu nabave. Obzirom da su nanočestice kemijski jednake svojoj makroformi, one zbog toga imaju jednaki CAS broj (od eng. *Chemical Abstract Service*), te u industriji nisu prepoznate kao nova vrsta kemijskih tvari. Kao rezultat toga, proizvodnja i korištenje nanočestica koje sadrže metale jednako se reguliraju kao i konvencionalne kemijske tvari prema REACH-u [6].

„Klasifikacija, označavanje i pakiranje“ (CLP, od eng. *Classification, Labelling and Packaging*) je još jedna regulativa Europske Unije i nanomaterijali su po objema regulativama, REACH i CLP, definirani kao kemijske „supstance“. Nanomaterijali koji ispunjavaju kriterij za klasifikaciju kao opasni po Regulaciji (EC) No 1272/2008 u CLP tvari i mješavina moraju se označiti kao takvi [7].

Na temelju Komunikacije drugog regulatornog osvrta na nanomaterijale, Europska Komisija je zaključila da REACH određuje najbolje moguće okvire za upravljanje rizika od nanomaterijala kada se oni pojavljuju kao tvari ili mješavine. Unatoč tome, unutar tih okvira su potrebni specifični zahtjevi za nanomaterijale. Komisija razmatra promjene u nekim REACH priložima i potiče Europsku kemijsku agenciju (ECHA, od eng. *The European Chemical Agency*) za daljnji razvoj smjernica za njihovu registraciju [7].

1.2. Nanočestice srebra

Srebrne nanočestice su čestice metalnog srebra koje imaju barem jednu dimenziju manju od 100 nm. Jako male dimenzije nanočestica posljedično dovode do velike specifične površine koja je zaslužna za jedinstvena svojstva nanosrebra. Nanočestice srebra, kao i nanočestice drugih metala, imaju drugačija fizikalna, kemijska, biološka i optička svojstva zbog male veličine, kemijskog sastava, površinske strukture, topljivosti, oblika i sklonosti agregiranju. Nanočestice se odlikuju pojavom površinske plazmonske rezonancije (SPR, od eng. *surface plasmon resonance*) koja je posljedica kolektivnih oscilacija ili fluktuacija u elektronskoj gustoći s interaktivnim elektromagnetskim poljem. Te oscilacije su jako osjetljive na adsorpciju molekula na metalne površine. Smanjenjem promjera nanočestica rezonancija se pomiče prema infracrvenom spektru i širi se apsorpcijski pik. Zbog svih tih svojstava metalne nanočestice danas imaju vrlo raširenu primjenu i upotrebu u mnogim gospodarskim područjima, uključujući potrošačke proizvode, zdravstvo, transport, energiju i agronomiju (Slika 1.2a). Na primjer, srebrni nanomaterijali koriste se u SERS (od eng. *surface enhanced Raman scattering*) spektroskopii, za detekciju DNA sljedova, lasersku desorpciju, ionizacijsku masenu spektrometriju peptida, kolorimetrijsko određivanje histidina i herbicida, identifikaciju bakterija te u mnogim drugim istraživačkim područjima. U industriji se koriste kao katalizatori, srebrne nanožice služe kao nanokonektori i nanoelektrode za elektroničke uređaje, a u svakodnevnim proizvodima nanosrebro se može naći u tekstilu s antibakterijskim svojstvima, krpama za čišćenje, šamponima, filterima za zrak, premazima na hladnjacima i perilicama za rublje, spremnicima za hranu itd.



Slika 1.2.a. Sektori u kojima se primijenjuje nanosrebro (preuzeto iz [8]).

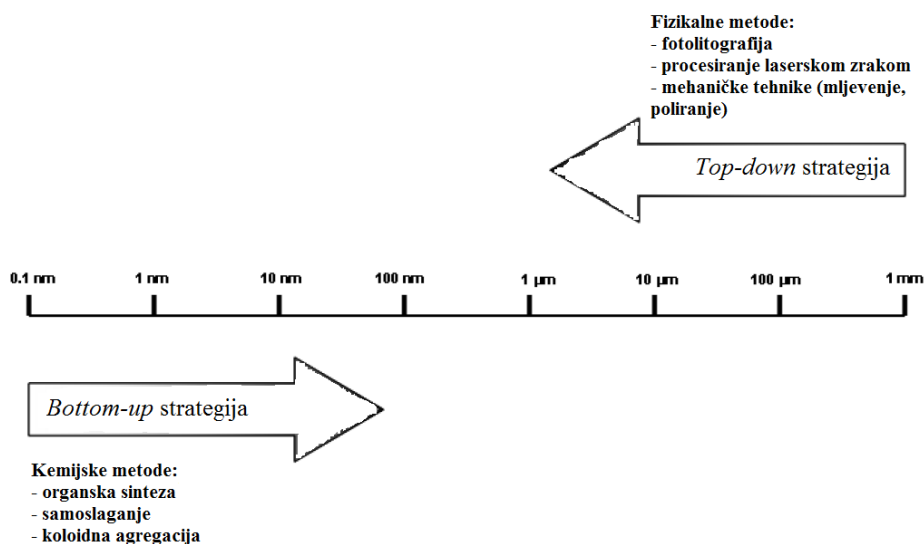
Široka primjena nanosrebra u medicini prikazana je u Tablici 1.2.

Tablica 1.2. Povećana primjena nanosrebra u medicinskim proizvodima (preuzeto iz [3]).

Područje	Primjeri
Anesteziologija	Premazivanje maski za disanje, endotrahealne cijevi za mehaničku ventilacijsku pomoć
Kardiologija	Premazivanje katetera za praćenje
Zubarstvo	Aditivi u dentalnim materijalima, srebrom punjene SiO ₂ nanokompozitne smole
Dijagnostika	Biodetekcija, ultrasjetljive i ultrabrze platforme za kliničke testove za dijagnozu infarkta miokarda, fluorescentno opažanje RNA
Dostava lijeka	Udaljenom laserskom zrakom inducirani otvor mikrokapsula
Očna njega	Prevlaka na kontaktnim lećama
Vizualizacija	Nanokompoziti za stanično obilježavanje i vizualiziranje, molekularna vizualizacija
Neurokirurgija	Premazivanje katetera za drenažu cerebrospinalne tekućine
Ortopedija	Aditivi u cementima za kost, implantati za zamjenu zglobova, ortopedske čarape
Briga za pacijenta	Superapsorbirajući hidrogel za materijale za inkontinenciju
Farmaceutici	Tretmani za dermatitis, ulcerozni kolitis i akne, inhibicija HIV-1 replikacije
Kirurgija	Premazivanje bolničkog tekstila (kirurške odore, maske...)
Urologija	Premazivanje kirurške mreže za zdjeličnu rekonstrukciju

Napredak u području nanomaterijala omogućio je pripravljanje nanočestica srebra različitih oblika, veličina i površinskih svojstava. Najveći izazov pri sintezi je kontrola veličine i oblika čestica, morfologije, kemijskog sastava i kristalne strukture.

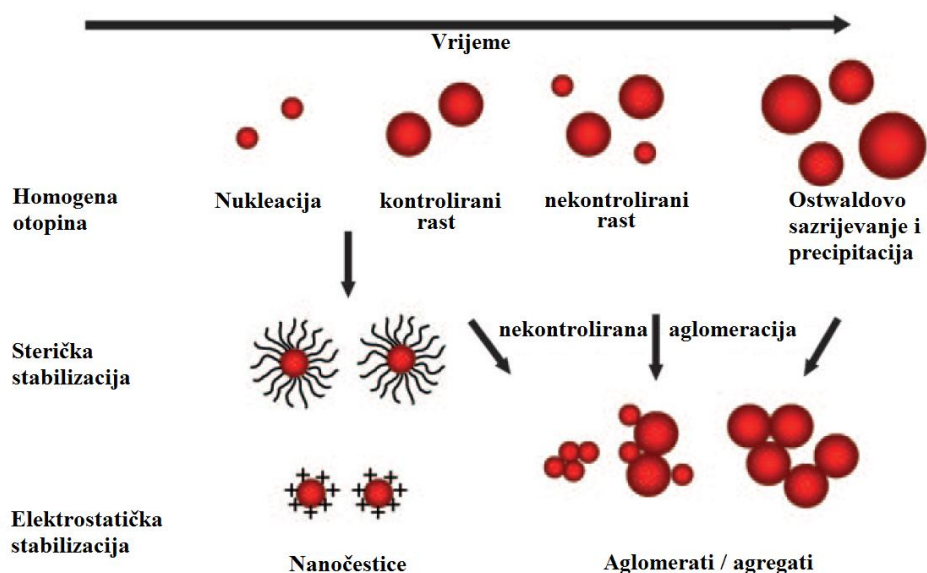
U literaturi je prisutan veliki broj različitih metoda koje se mogu klasificirati prema pristupu, a razlike su svedene na specifične reaktante i reakcijske uvjete [3]. Dvije su osnovne sintetske strategije (slika 1.2.b).



Slika 1.2.b. Top-down i bottom-up pristupi sintezi nanočestica (preuzeto iz [3]).

Top-down tehnika temelji se na stvaranju izoliranih atoma iz većih komada materijala koristeći razne tehnike distribucije. Obično se primjenjuju fizikalne metode poput mljevenja, rezanja, ponavljajućeg suzbijanja ili fotolitografije. Nedostatak ove tehnike je prisutnost površinskih nedostataka na nanostrukturama koje značajno utječu na njihova svojstva. *Bottom-up* tehnike započinju s otopljenim solima srebra koje se reduciraju pri čemu nastaju nanočestice procesom nukleacije i rasta. Kod ovih tehnika potrebno je koristiti različite tvari (surfaktante, polielektrolite, polimere) za stabilizaciju nastalih nanočestica te omogućiti kontrolu veličine i oblika nanočestica. Sintezama se može pristupiti konvencionalnim metodama u kojima se koriste citrat, borhidrid, dvofazni sustavi, organski reducens ili inverzni micelarni sustavi, dok se u nekonvencionalnim metodama koriste tehnike poput laserske ablacije, radiokatalize, vakuumske isparavanja metala ili Svedbergova metoda elektrokondenzacije. Nedostaci *bottom-up* tehnike su nemogućnost masovne proizvodnje za industrijsku primjenu i akumulacija zaostalih kemikalija u suspenzijama nanočestica. Od tih nečistoća najčešće je ionsko srebro, jer učinkovitost redukcije nikad nije 100 %. Pristupi sintezi također se mogu klasificirati kao „zeleni“ i „ne-zeleni“ obzirom na izbor ekološki prihvatljivih reagenasa poput šećera i biljnih ekstrakata za stvaranje i stabilizaciju nanosrebra. Mana „zelenog“ pristupa je slabija kontrola morfologije stvorenih nanočestica u odnosu na „ne-zelene“ metode [3].

Nastajanje nanočestica odvija se u tri faze: 1) nukleacija, 2) evolucija jezgri u klice i 3) rast klica u nanokristale (slika 1.3.b). Ovdje su klice definirane kao čestice veće od jezgara koje više nemaju fluktuacije strukture. Elektronskom mikroskopijom utvrđeno je da je konačan oblik nanočestica srebra određen unutarnjom strukturom odgovarajuće klice i afinitetom vezanja oblagajućeg reagensa. Nukleacija predstavlja prvi korak u procesu kristalizacije. Polaganim porastom koncentracije atoma dolazi se do točke superzasićenja gdje se atomi počinju agregirati u male nakupine (jezgre) procesom samonukleacije. Jednom formirane jezgre zatim ubrzano rastu i koncentracija metalnih atoma u otopini pada. Ako koncentracija atoma brzo padne, ispod razine minimalnog superzasićenja, dodatna se nukleacija neće više dogoditi. Kontinuiranim dovođenjem atoma putem kemijske reakcije jezgre će rasti u sve veće nanokristale dok se ne postigne ravnoteža između atoma na površini nanokristala i atoma u otopini. Osim rasta putem dodavanja pojedinačnih atoma, jezgre i nanokristali mogu se spajati u veće čestice aglomeracijom (slika 1.2.c). Kod dobivanja atoma redukcijom iz viših oksidacijskih stanja, kao što je slučaj kod redukcije Ag^+ , nije sigurno je li srebro prvo reducirano u metalno srebro koje se zatim agregira u jezgre i raste u nanokristale ili nereducirane specije tvore jezgre prije same redukcije [9].



Slika 1.2.c. Rast i stabilizacija nanočestica (preuzeto iz reference [9]).

Jednom kada je nakupina čestica narasla do kritične veličine, strukturne fluktuacije postaju energetske nepovoljne i nakupina ostaje u dobro definiranoj strukturi. Ova kritična točka dovodi do nastanka klice. Stoga je za dobivanje nanočestica točno određenog oblika ključno osigurati strogu kontrolu populacije klica različitim unutrašnjim strukturama [3,9].

1.3. Toksikologija nanočestica srebra

Oslobađanje kemikalija u okoliš danas je jedan od veoma važnih uzroka dugotrajnog unošenja štetnih tvari u žive organizme, pa time kontrola onečišćenja postaje dio analitičke toksikologije. Onečišćenje zraka, vode, tla i hrane oduvijek je pratilo čovjeka, ali nikad kao danas nije bilo ugroženo njegovo postojanje zbog gomilanja onečišćivala u okolišu. Glavni problem njihovog širenja jest nemogućnost postavljanja granica u prirodi te stalna razmjena tvari između svih dijelova okoliša [10].

Iako je toksikologija osnovnih makromaterijala dobro definirana, toksičnost tvari nanometarske skale je značajno drugačija. Nanomaterijali imaju jedinstvena biološka svojstva u odnosu na makromaterijale i potencijalni rizici nisu isti. Kao rezultat toga, novi toksikološki podaci o nanomaterijalima će najvjerojatnije dovesti do njihove različite procjene opasnosti. Za sada manjak tih podataka ne dopušta adekvatnu procjenu rizika. Potrebno je težiti ravnoteži između razvoja nanotehnologije i potrebnih istraživanja kako bi se identificirala opasnost i stvorila znanstvena baza podataka u svrhu procjene rizika. Da bi se to ostvarilo, potrebno je imati osnovno znanje o ekotoksikološkom profilu nanomaterijala [11].

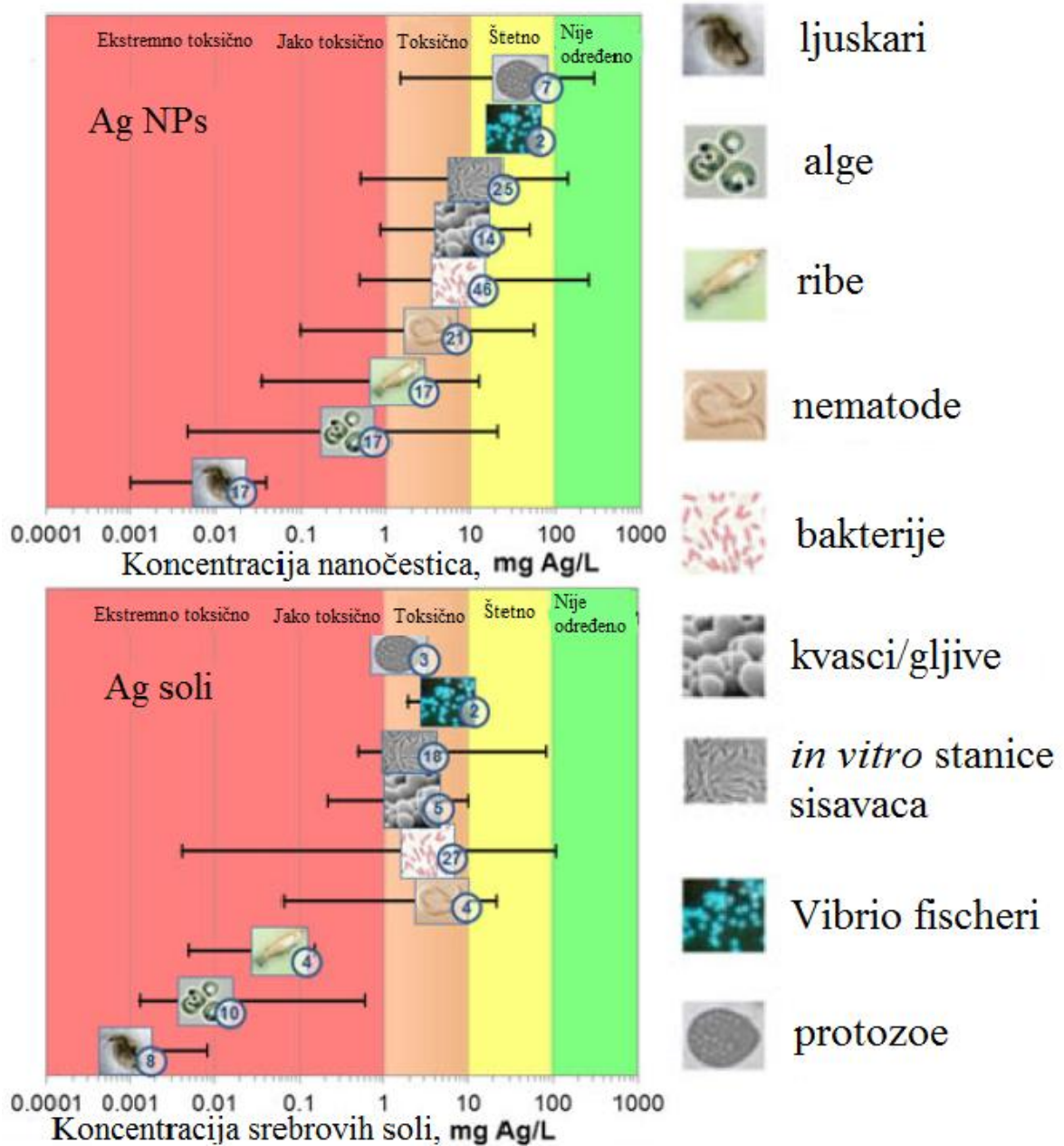
Sve većom proizvodnjom i potrošnjom nanomaterijala dolazi do povećanog odlaganja nanočestica u okoliš što u konačnici vodi do tzv. zagađenja nanočesticama, njihovim odlaganjem u zemne vode i tlo. Do danas nema detaljnih studija o mehanizmu transporta, biodegradaciji ili asocijaciji nanočestica s biološkim materijalima koji bi mogli ukloniti nanomaterijale [12]. Studije o utjecaju nanočestica na biljke i mikrobe su također rijetke. Ishod nanomaterijala u vodenom okolišu kontroliran je mnogim biotičkim/abiotičkim procesima poput topljivosti te interakcije između nanočestica i ostalih kemikalija u ekosustavu. Ekološka procjena rizika je esencijalna za razumijevanje učinaka nanomaterijala na okoliš budući da ista ona svojstva nanočestica koja ih čine tako primamljivima mogu potencijalno dovesti do nepredvidljivih rizika za zdravlje ljudi i okoliša.

Kako bi se odredila opasnost nanomaterijala potrebni su pouzdani i reproducibilni protokoli kako bi se testirali osnovni materijali kao i proizvodi namijenjeni potrošačima. Postizanje tog cilja pokazalo se prilično zahtjevnim zbog velikog broja novih nanomaterijala koji se kontinuirano proizvode [13].

Obzirom na posebnost fizičko-kemijskih svojstava nanočestica, one mogu biti vrlo reaktivne u biološkom sustavu, te izazvati osim povoljnih, željenih, učinaka, također i štetne učinke. Stoga se razvila posebna grana toksikologije - nanotoksikologija – koja proučava interakcije nanostrukture s biološkim sustavima s naglaskom na objašnjavanje veze između fizikalnih i kemijskih svojstava nanočestica i toksičnih učinaka [14]. Biološka toksičnost nanočestica može se pripisati nekim od slijedećih svojstava:

- visoki omjer površine i volumena povećava interakcije s okolnim molekulama što neizravno povećava toksičnost
- kemijski sastav čestice povećava reaktivnost
- površinski naboj koji sudjeluje u elektrostatskim interakcijama, a koji je karakteriziran ζ potencijalom, važan je faktor kod stvaranja agregata te u interakciji nanočestica i stanica; utječe na količinu adsorbiranih proteina na površini čestice [15]
- topljivost, koja zbog interakcija s komponentama biološkog medija poput aminokiselina i proteina, može izazvati toksičnost
- moгуćnost adsorpcije biomolekula dovode do učinka “Trojanskog konja” - unos stranih čestica u stanicu koje na sebe imaju adsorbiranu biomolekulu
- hidrofobnost može omogućiti česticama da ulaze u interakcije s proteinima i staničnim membranama
- komplementarnost nanostrukture može prouzročiti inhibiciju enzimske aktivnosti, kompetitivno ili nekompetitivno
- akumulacija inertne čestice u tijelu može pokrenuti stvaranje tkiva oko stranog tijela i dovesti do nastanka ožiljka.

Do sada je u literaturi opisano toksično djelovanje nanočestica srebra na veliki broj različitih vrsta (slika 1.3.).



Slika 1.3. Toksičnosti nanočestica srebra kod različitih organizama (preuzeto iz [2]).

U Tablici 1.3. sažeto su opisani neki od opaženih i u literaturi opisanih bioloških učinaka nanočestica koji mogu rezultirati određenim patofiziološkim stanjima.

Tablica 1.3. Mogući efekti nanočestica kao temelj patofiziologije i toksičnosti (preuzeto iz [16]).

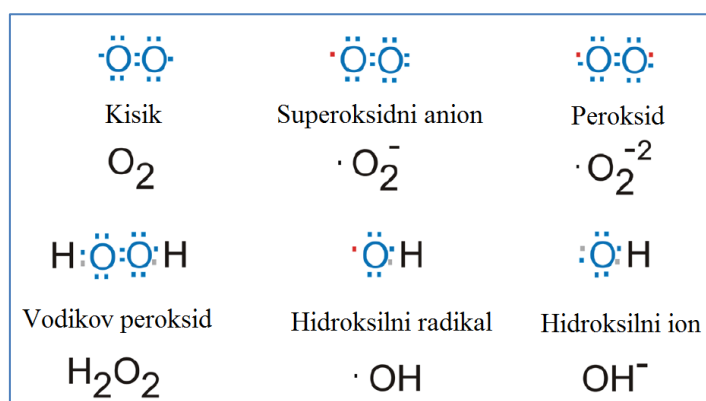
Eksperimentalni učinci srebrnih nanočestica	Mogući patofiziološki ishodi
Stvaranje ROS-a	Oksidativni stres, oštećenje proteina, DNA i membrana
Oksidativni stres	Faza II enzimske indukcije, upala, mitohondrijska perturbacija
Mitohondrijska perturbacija	Oštećenje unutrašnje membrane, tranzicija propusnosti, otvaranje pora, apoptoza, aponekroza, citotoksičnost
Upala	Infiltracija tkiva upalnim stanicama, fibroza, granulomi, aterogeneza, ekspresija proteina akutne faze
Unos preko retikuloendotelnog sustava	Asimptomatska sekvencijacija i skladištenje u jetri, slezeni i limfnim čvorovima te moguće povećanje i disfunkcija organa
Denaturacija i degradacija proteina	Gubitak enzimske aktivnosti, autoantigeničnost
Unos u jezgru	Oštećenje DNA, grupiranje nukleoproteina, autoantigeni
Unos u živčano tkivo	Ozljeda mozga i perifernog živčanog sustava
Perturbacija fagocitne funkcije, otpuštanje medijatora	Kronična upala, fibroza, granulomi, smetnje u micanju infektivnog agensa
Endotelna disfunkcija, poremećaj zgrušavanja	Aterogeneza, tromboza, srčani udar
Stvaranje neoantigena, raspad imune tolerancije	Autoimunost, efekti adjuvansa
Promijenjena regulacija staničnog ciklusa	Proliferacija, zastoj staničnog ciklusa, starenje
Oštećenje DNA	Mutageneza, metaplazija, karcinogeneza

Oksidativni stres se smatra jednim od najvažnijih mehanizama toksičnosti metalnih nanočestica, pa tako i nanočestica srebra.

1.4. Oksidativni stres

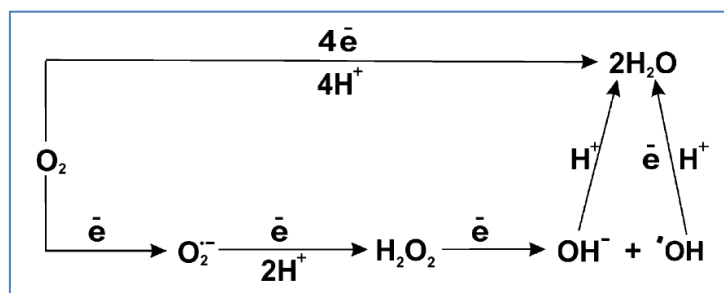
Oksidativni stres je stanje u kojem se prolazno ili kronično poveća ustaljena koncentracija reaktivnih kisikovih specija, tj. nastane neravnoteža prema prooksidativnom stanju i na taj način se poremeti stanični metabolizam i njegova regulacija te se oštećuju stanične komponente [17]. Koncentracija ROS-a je dinamički parametar, tj. koristi se izraz ustaljeno stanje ROS koncentracije. Zbog raznih razloga ta koncentracija se može promijeniti i dovesti do poremećaja redoks statusa što se naziva oksidativni ili reduktivni stres.

Reaktivne kisikove specije (ROS, od eng. *Reactive Oxygen Species*) su reaktivne molekule i slobodni radikali nastali iz molekularnog kisika. Proizvodnja radikala baziranih na kisiku je nevolja svih aerobnih organizama. Ove molekule, koje imaju potencijal mnogih štetnih učinaka, mogu nastati kao nusprodukti mitohondrijskog transporta elektrona u aerobnom disanju ili putem oksidoreduktaznih enzima i oksidacije katalizirane metalima. Najprije se smatralo da samo fagociti mogu stvarati ROS kao dio obrambenog mehanizma, no istraživanja su pokazala da ROS ima ulogu u staničnoj signalizaciji uključujući apoptozu, gensku ekspresiju i aktivaciju stanične signalne kaskade [18]. Atomi kisika imaju dva nesparena elektrona u različitim orbitalama u vanjskoj elektronskoj ljusci. Zbog toga je podložan stvaranju radikala, a uzastopnom redukcijom nastaje ROS: superoksid, vodikov peroksid, hidroksilni radikal, hidroksilni ion i dušikov monoksid (Slika 1.4.a).



Slika 1.4.a. Reaktivne kisikove specije. Crvena točka predstavlja nesparen elektron (preuzeto iz [18]).

Reaktivne kisikove specije se mogu transformirati jedna u drugu. Uobičajno se molekularni kisik reducira u mitohondrijskom transportu elektrona u kojem nastaje voda. No, uzastopnim dodavanjem jednog elektrona nastaju reaktivne specije (Slika 1.4.b) One mogu biti vezane ili uklonjene različitim tipovima antioksidanasa, ili mogu ući u interakciju sa staničnim i izvanstaničnim komponentama [17].



Slika 1.4.b. Putevi metabolizma kisika u organizmu (preuzeto iz [17]).

1.4.1. Stvaranje reaktivnih kisikovih specija

Manje od 10 % unesenog kisika se reducira dodavanjem jednog elektrona što dovodi do pojave ROS-a. Koenzim Q i kompleks III su najvjerojatnije glavna mjesta u mitohondrijskom transportu elektrona gdje elektroni „pobjegnu“ i dolaze u interakciju s molekularnim kisikom dajući superoksidni anion [19]. Lanac transporta elektrona u endoplazmatskom retikulumu je drugi najvažniji izvor ROS-a [20]. Katabolizam staničnih i stranih kemikalija preko citokroma P450 uključuje redoks reakcije i odgovoran je za stvaranje ROS-a u endoplazmatskom retikulumu. Određene količine se još stvaraju u citosolu i peroksisomima uz pomoć različitih oksidaza, npr. triptofan dioksidaze, ksantin oksidaze, citokrom P450 reduktaza te oksidaze aminokiselina. Autooksidacija određenih staničnih komponenti i ksenobiotika, kao i katekolamini i druge tvari koje su prirodno prisutne u organizmu mogu biti važni proizvođači ROS-a u određenim fiziološkim stanjima [17].

Većina organizama posjeduje specifičan sustav koji stvara određene reaktivne specije u kontroliranim uvjetima. Molekularni mehanizam se oslanja na enzimsku oksidaciju NADPH preko NADPH-oksidaze. Ovaj sustav se koristi za napad na invazivne mikroorganizme i moguće za kontrolu stanične razine ROS-a. Slični sustavi imunološke obrane pronađeni su i u

biljkama i u životinjama [21]. Drugi dobro proučeni sustav stvara dušikov monoksid preko specifične NO-sintaze [22].

Prisutnost toksikanata, poput nanomaterijala, metala, aromatskih hidrokarbona, pesticida, polikloriranih bifenila i dioksina može poremetiti uvjete ustaljenog stanja i dovesti do povećanog stvaranja ROS-a što može preopteretiti obrambene kapacitete organizma. Tijekom vremena može doći do inaktivacije nekih enzima, oksidacije proteina, oštećenja DNA i ostalih esencijalnih biomolekula poput lipida [23].

1.4.2. Eliminacija reaktivnih kisikovih specija

Antioksidativni sustav uključuje niskomolekularne i visokomolekularne antioksidanse. Niskomolekularni uključuju u vodi topljive tvari poput reduciranog glutationa (GSH), askorbinske kiseline (vitamin C) te u mastima topljive tvari poput karotenoida (uključujući β -karoten), retinola (vitamin A) i α -tokoferola (vitamin E). Oni rade kao skupljači slobodnih radikala [17,24]. No, postoje i drugi mehanizmi koji mogu koristiti navedene molekule. Npr. glutation može koristiti kao kofaktor enzimima poput glutation-ovisne peroksidaze i glutation-S-transferaze.

Visokomolekularne antioksidativne grupe čine specifični ili nespecifični proteini. U specifičnu grupu ulaze antioksidativni enzimi superoksid dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1), katalaza (KAT, EC 1.11.1.6), selen-ovisna glutation peroksidaza (GPx, EC 1.11.1.9), DT-diaforaza (EC 1.6.99.2) te skupine koje daju potrebne kofaktore – glutation reduktaza (GR, EC 1.6.4.2) i glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (G6PDH, EC 1.1.1.49). Nespecifični visokomolekularni antioksidansi su proteini koji spriječavaju oštećenje inducirano ROS-om tako što vežu ione tranzicijskih metala (najčešće željezo i bakar) poput metalotioneina i feritina [23].

Stanična antioksidativna obrana ovisi o redukcijskom potencijalu elektronskih nosača i o redukcijskom kapacitetu povezanih redoks parova u matriksu mitohondrija (NADH/NAD⁺ i FADH₂/FAD) i citoplazmi [25]. Do određene granice, mitohondrijski i stanični antioksidativni sustavi mogu neutralizirati višak ROS-a. Jaki stanični stres može inducirati proizvodnju ROS-a koja nadilazi kapacitet antioksidativnih enzima, tako da je ukupno nastajanje ROS-a povećano.

1.4.3. Određivanje reaktivnih kisikovih specija

Većina novijih studija na stvaranju mitohondrijskih ROS-ova koriste ili unutarmatriksne fluorescentne indikatore 2',7'-diklorofluorescein (DCF) ili fluorescentnu tehniku Amplex Red/peroksidaza iz hrena kako bi odredili vodikov peroksid koji se oslobodio ili konvertirao u puferskom okruženju mitohondrija. Zbog velike katalitičke aktivnosti Mn-SOD i Cu,Zn-SOD, većina superoksida se brzo prevodi u H₂O₂ koji lako prolazi kroz unutarnju membranu mitohondrija. Zbog toga su mjerenja unutarmatriksnih i izvanmatriksnih generiranih superoksida indirektna i nepotpuna uslijed brze dismutacije H₂O₂ [26].

U izoliranom tkivu postoje druge opcije određivanja ROS-a. Jedn od načina je određivanje pomaka apsorbancije s redukcijom citokroma C sa superoksidom. Druge tehnike se temelje na oslobađanju fotona iz kemiluminescentnih proba, poput luminola ili lucigenina, nakon reakcije s ROS-om [27]. Dihidroetidij (DHE), također poznat kao hidroetidij, je prilično specifičan fluorescentni marker superoksida. Superoksid neenzimatski prevodi DHE u 2-hidroetidij (EOH) ili u prekursore koji brzo nastaju, labilni su i fluoresciraju na nešto nižoj valnoj duljini od peroksidaznog produkta oksidacije etidija koji interkalira s DNA. Zato EOH signal fluktuiraju sa stvorenim superoksidom u stanici. Potreban je oprez pri radu s DHE i drugim probama zbog oksidacije etidija s citokromom c u odsutnosti ROS-a.

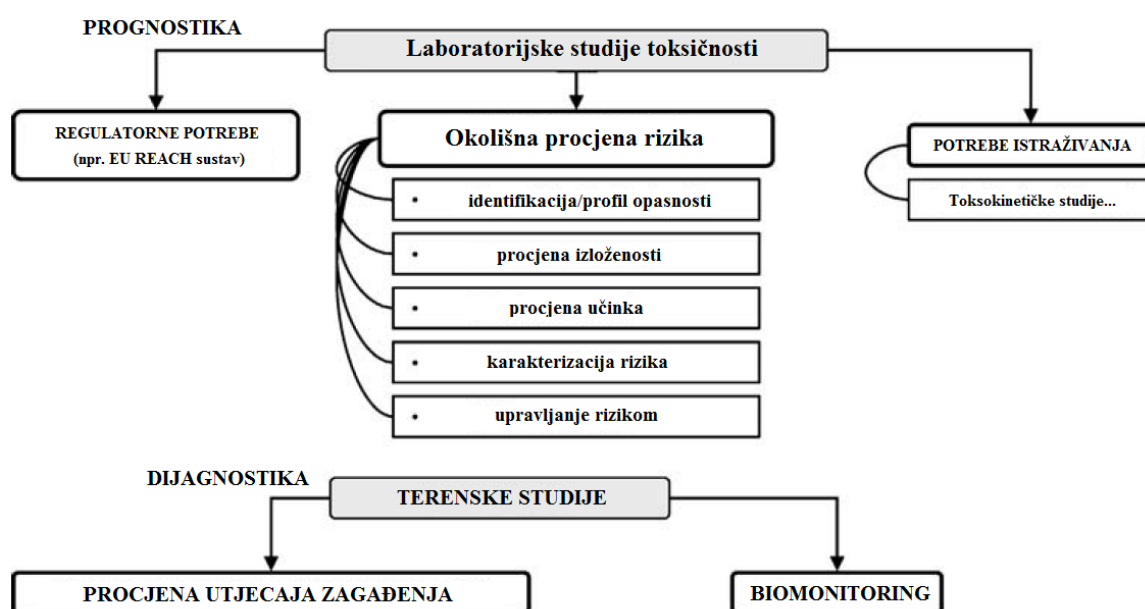
1.5. Biomarkeri u ekotoksikologiji

Biokemijski biomarkeri se smatraju dobrim oruđem za ekotoksikološku primjenu. Budući da primjena biokemijskih biomarkera može identificirati uzročne mehanizme potencijalno odgovorne za učinke na višim razinama organizacije, oni se općenito smatraju osjetljivijim pokazateljem u odnosu na odgovore cijelih organizama. , Neki od kriterija koji biomarkeri moraju zadovoljavati za primjenu u studijama okolišnih onečišćenja su sljedeći [28]:

- uspostavljena veza između biomarkera različitih organizacijskih razina organizma, npr. promjene koje nastaju na sub-staničnoj razini trebaju biti značajne kod promjena primjećениh na razini organizma
- uspostavljena veza između biomarkera različitih razina bioloških organizacija (između organizma i populacije, zajednice, ekosustava), npr. nakon promjena koje se događaju na

razini organizma trebaju uslijediti promjene primjećene na razini populacije ili ekosustava

- biomarkeri moraju biti dovoljno osjetljivi da detektiraju rane učinke i sustave ranog upozorenja
- određena veza između odgovora biomarkera i razine izloženosti
- jasnost/jednostavnost interpretacije
- dobro razumljivi učinci kontradiktornih ne-kemijskih (abiotičkih, biotičkih) faktora na odgovor biomarkera; dobro poznata interindividualna varijabilnost odgovora biomarkera
- vremenska ovisnost odgovora biomarkera mora biti razumljiva
- metodološka razmatranja: analiza biomarkera mora biti ekonomična, jednostavna za izvedbu i pouzdana



Slika 1.5. Predložena primjena biokemijskih biomarkera u okolišnim studijama zagađenja (preuzeto iz [28]).

Evaluacija biomarkera oksidativnog stresa je ključno pitanje kod istraživanja oksidativnog stresa u organizmima. U nekim slučajevima, razina ROS-a može se pratiti direktnim ili indirektnim metodama. Iako je direktno mjerenje ROS-a jako koristan pristup, praktički ih je nemoguće mjeriti *in vivo* zbog tehničkih razloga. Umjesto toga je češći pristup mjerenja ROS-induciranih produkata i modifikacija staničnih komponenti ili specifičnih tvari. Zbog niske

koncentracije i visoke nestabilnosti ROS-a, sporno bi bilo reći da ima idealne metode ili skupine metoda koje bi mogle okarakterizirati sve aspekte oksidativnog stresa tako da su potrebne mjere predostrožnosti. Nema idealnog biomarkera, tako da bi ih se trebalo pratiti barem nekoliko [23].

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

Jedinstvena i poželjna fizičko-kemijska svojstva srebrnih nanočestica čine ih korisnima zarazne industrijske i biomedicinske primjene. Međutim, kontaminacija okoliša nanočesticama srebra putem industrijskog otpada ili ispiranjem iz različitih proizvoda raste s porastom njihove primjene i upotrebe.. Zbog toga je procjena rizika nanočestica srebra nužna korištenjem odgovarajućih testnih organizama. Iako je objavljeno mnoštvo znanstvenih podataka o toksičnim učincima nanočestica srebra u različitim živim, posebice vodenim vrstama, još uvijek je količina i vrsta informacija nedostatna za jasnu sliku o sigurnosti primjene i upotrebe nanosrebra [29,30]. Do sada nema objavljenih podataka o jasnoj uzročno-posljedičnoj vezi između oksidativnog stresa u *Daphnia magna* i izloženosti nanosrebru.

Glavni cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi izazivaju li nanočestice srebra oksidativni stres u vodenom organizmu vrste *Daphnia magna*, a u svrhu utvrđivanja pogodnih biomarkera za procjenu ekotoksičnosti metalnih nanomaterijala. Vrsta *Daphnia magna* ili vodenbuha odabrana je kao standardni testni organizam koji se koristi za praćenje utjecaja različitih kemikalija na vodeni okoliš. Biološki učinak srebrnih nanočestica uspoređen je s učincima ionskog srebra kako bi se mogao odrediti doprinos otopljenog srebra ukupnoj toksičnosti. Provedena su ispitivanja izazivaju li i u kojoj dozi srebrne nanočestice akutnu toksičnost vrste *Daphnia magna*. Osim određivanja parametara akutne toksičnosti, praćena su tijekom testa akutne toksičnosti četiri biomarkera oksidativnog stresa: razina ROS-a, razina reduciranog glutaciona te aktivnosti enzima katalaze i superoksid dismutaze.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Priprema nanočestica srebra

3.1.1. Sinteza

Srebrne nanočestice (nanoAg) su sintetizirane prema metodi opisanoj u literaturi [31].

Pripremljene su vodene otopine kemikalija vaganjem odgovarajuće mase na analitičkoj vagi (M 120, Denver Instruments, SAD) na slijedeći način:

0.40 mM askorbinska kiselina (AA, $C_6H_8O_6$, Mr 176.12; Kemika, Hrvatska) – otapanjem 0.14 mg AA u 2 mL destilirane vode

4 % natrijev citrat ($Na_3C_6H_5O_7$, Mr 294.10; Sigma Aldrich, Njemačka) – otapanjem 2 g tvari u 50 mL destilirane vode

0.24 M srebrov nitrat ($AgNO_3$, Mr 169.87; Sigma Aldrich, Njemačka) – otapanjem 2.04 mg tvari u 50 mL destilirane vode

200 μ L vodene otopine 0.4 mM AA dodano je u 197 mL kipuće destilirane vode uz miješanje. Nakon jedne minute dodano je 2.5 mL smjese natrijevog citrata i $AgNO_3$ koja je pripremljena izmjeničnim dodavanjem u 1 mL vodene otopine 4 wt % Na-citrata i 0.25 mL vodene otopine 0.24 M $AgNO_3$ u 1.25 mL destilirane vode na sobnoj temperaturi (), te je odstajala 5 min.

Konačne koncentracije reagenasa u 200 mL reakcijske otopine su:

0.4 μ M AA

0.02 wt % natrijevog citrata

0.3 μ M srebrovog nitrata

Boja reakcijske otopine se odmah nakon dodavanja smjese natrijevog citrata i srebrovog nitrata promijenila iz bezbojne u žutu. Uz stalno miješanje otopina se zagrijavala tijekom slijedećih sat vremena.

3.1.2. Pročišćivanje

Nakon kemijske reakcije potrebno je produkte pročititi od neiskorištenih reaktanata u smjesi. Nanočestice srebra pročišćene su ultracentrifugiranjem na $15790\times g$ 20 min u RC5C Sorvall ultracentrifugi (DuPont, SAD). Supernatant se odvajao od čestica s dna epruvete pažljivom upotrebom automatske pipete te su se čestice nekoliko puta ispirale s destiliranom vodom. Isprane resuspendirane nanočestice su se pohranile na $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ na tamno do daljnje upotrebe. Uklanjanjem kemikalija na ovaj način smanjila se ionska jakost otopine što je povećalo debljinu električnog dvosloja na površini nanočestica i stabiliziralo pripremljeno nanoAg.

3.1.3. Karakterizacija

3.1.3.1. Atomska apsorpcijska spektroskopija

Ukupna koncentracija srebra u pripremljenim koloidima određivana je odgovarajućim razrjeđivanjem kolodine otopine nanosrebra u zakiseljenoj otopini (0.5% HNO_3) koristeći atomski apsorpcijski spektrofotometar Aanalyst 600 (Perkin Elmer, SAD). Valna duljina apsorbirane svjetlosti je 328.1 nm , koncentracije standarada su bile između 0.5 i $20\text{ }\mu\text{g/L}$, a u Tablici 3.1.3.1. je prikazan program spaljivanja:

Tablica 3.1.3.1. Program spaljivanja nanočestica srebra kod određivanja koncentracije na atomskom apsorpcijskom spektrofotometru.

Temperatura/ $^{\circ}\text{C}$	Vrijeme postizanja temperature/s	Trajanje temperature/s
110	1	30
130	15	30
550	10	20
20	1	5
1700	0	4
2400	1	3

Atomska apsorpcijska spektroskopija se temelji na kvantifikaciji količine svjetlosti rezonantne valne duljine koja se apsorbira prolaskom kroz oblak atoma. Što je veći broj atomiziranih čestica, svjetlost prolazi dulji put i proporcionalno tome se povećava količina apsorbirane svjetlosti. Korištenjem posebnih izvora svjetlosti i pažljivim odabirom valne duljine moguće je specifično kvantificirati pojedine elemente [32].

3.1.3.2. Metode dinamičkog i elektroforetskog raspršenja svjetlosti

Veličina i distribucija veličine, te površinski naboj nanočestica srebra određen je metodama dinamičkog i elektroforetskog raspršenja svjetlosti korištenjem Zetasizer Nano ZS instrumenta (Malvern, UK) opremljenog sa zelenim laserom (532 nm). Pri tome su pripravljene koloidne otopine nanosrebra koncentracije 1 mg/L pod različitim eksperimentalnim uvjetima. Cilj je bio odrediti hoće li doći do agregacije ili aglomeracije ovisno o vremenu u destiliranoj vodi, te u mediju u kojem su se uzgajale vodenbuhe. Intenzitet raspršenog svjetla detektiran je pod kutem od 173° . Hidrodinamički promjer (d_H) i distribucija veličina nanočestica dobivene su iz distribucije volumena. Obrada podataka provedena je uz pomoć programskog paketa Zetasizer software 6.32 (Malvern instruments). Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost 10 mjerenja. Površinski naboj srebrnih nanočestica određen je mjerenjem elektroforetskog ζ potencijala korištenjem istog instrumenta. ζ potencijal nanočestica izračunat je iz izmjerene elektroforetske pokretljivosti prema Henryjevoj jednadžbi koristeći Smoluchowskijevu aproksimaciju ($f(Ka) = 1.5$). Rezultati su prikazani kao prosječna vrijednost 5 mjerenja. Sva su mjerenja provedena na 25°C .

Dinamičko raspršenje svjetlosti (DLS, od eng. *Dynamic Light Scattering*) je fizikalna tehnika koja se koristi za određivanje distribucije veličina malih čestica u suspenziji. Svjetlost se može raspršiti kada prolazi kroz medij koji je polarizabilan ili nema jedinstvenu dielektričnu konstantu. Svjetlost je u interakciji s elektronima vezanim u materijalima koji ponovno zrače tu svjetlost kao raspršenu. Prema Rayleighovoj teoriji čestice koje su manje od valne duljine svjetlosti λ imaju sve dijelove pod istim električnim poljem tako da su raspršeni valovi koji su proizvedeni dipolnim oscilacijama vezanih elektrona u istoj fazi. Inducirani dipoli paralelni su s ravninom polarizacije i ako se raspršena svjetlost gleda u ravnini okomitoj od ravnine polarizacije ona neće imati kutne distribucije pošto je ona jednostavno sumacija svih doprinosa pojedinih dipola koji se konstruktivno dodaju [33].

DLS se primijenjuje u određivanju Brownianovih nanočestica u koloidnim suspenzijama u nano i submikrometarskom rasponu. Kada su čestice raspršene u tekućini one se stalno nasumično kreću što se zove Brownianovo kretanje u kojem čestica prolazi nasumične promjene položaja u vremenu. Difuzija sferičnih čestica može se opisati Stokes-Einsteinovom jednačinom:

$$D = \frac{k_B T}{3\pi\eta d}$$

gdje je k_B Boltzmanova konstanta, T je apsolutna temperatura, η je viskoznost otapala, D je koeficijent difuzije čestica i d je promjer čestice.

Protokol za određivanje veličine čestica primjenom DLS-a uključuje procjenu reproducibilnosti DLS mjerenja, promjenu veličine sekundarnih nanočestica tijekom perioda testa *in vitro* toksičnosti i razlike u veličini sekundarnih nanočestica [15].

3.1.3.3. Transmisijska elektronska mikroskopija (TEM)

Srebrne nanočestice prikazane u ovom radu vizualizirane su korištenjem TEM mikroskopa (Zeiss 902A). Mikroskop je radio u svjetlom polju pri naponu ubrzanja od 80 kV. Slike su snimljene Canon PowerShot S50 kamerom spojenom na mikroskop. TEM uzorak pripremljen je stavljanjem kapi suspenzije uzorka na bakrenu rešetku obloženu Formavarom. Uzorak je osušen na zraku na sobnoj temperaturi.

Elektronski mikroskopi koriste snopove elektrona umjesto zraka vidljive svjetlosti. Mala valna duljina elektrona omogućuje elektronskim mikroskopima veću razlučivost i veće optičko povećanje. Postoje transmisijski i pretražni elektronski mikroskopi, ovisno o tome stvaraju li sliku elektroni koji prolaze kroz uzorak ili oni koji se odbijaju od njegove površine. U TEM-u snop elektrona prolazi kroz tanki sloj tvari i dolazi u interakciju s tvari što stvara sliku. Slika se povećava i fokusira na fluorescentnom zaslonu, na sloju fotografskog filma ili se detektira kamerom.

3.1.3.4. Elektrokemijsko određivanje slobodnih Ag⁺ iona

Određivanje oksidacije odnosno otpuštanja slobodnih Ag⁺ iona s površine nanočestica pri različitim uvjetima provedeno je elektrokemijskom metodom uz primjenu ion-selektivne elektrode. Ion-selektivne elektrode su senzori koji aktivitet specifičnog iona otopljenog u otopini u električni potencijal koji se može mjeriti voltmetrom ili pH metrom. Srebro/sulfid elektrode sadrže opažajući element koji kada je u kontaktu s otopinom koja sadrži ili srebrove ili sulfidne ione razvija elektrodni potencijal. Taj potencijal, koji ovisi o koncentraciji slobodnih srebrovih ili sulfidnih iona, mjeri se u odnosu na konstantni referentni potencijal digitalnim pH/mV metrom. Izmjereni potencijal može se opisati Nernstovom jednadžbom [34]:

$$E = E_0 + S \times \log(A)$$

E = izmjereni elektrodni potencijal, E₀ = referentni potencijal, A = aktivitet iona u otopini, S = nagib pravca elektrode

Aktivitet iona je efektivna koncentracija slobodnih iona u otopini koja je povezana s koncentracijom iona preko aktivitetnog koeficijenta γ :

$$A = \gamma \times C_f$$

Moguće otpuštanje Ag⁺ iona u ultračistoj vodi ili u mediju u kojem se se uzgajale vodenbuhe određeno je korištenjem elektrode Orion 9616BNWP Sure-Flow™ Combination Silver/Sulfide (Thermo Scientific, SAD) spojenom na Seven Easy ISE konduktometar (Mettler–Toledo, Švicarska) tijekom 24 h. Elektroda je prije svakog eksperimenta bila uronjena u otopinu 0.01 M Ag⁺ tijekom 3 h kako bi se postigla stabilnost mjerenja. Koncentracije Ag⁺ izračunate su iz dobivenog potencijala koristeći linearnu kalibracijsku krivulju s četiri standarda koji su se nalazili u koncentracijskom rasponu očekivanom za uzorak, a koji su bili pripremljeni iz standardne otopine srebra koncentracije 10 mg/L. Kalibracijski pravac je imao nagib 59.3 mV/log [Ag⁺]. Za mjerenje AgNP suspenzija, razrijeđenje originalne suspenzije je pripremljeno u rasponu od 1:10 do 1:100. Koncentracija Ag⁺ je izračunata iz dobivenih potencijala koristeći kalibracijski pravac.

3.2. Testni organizam – *Daphnia magna*

Prema europskoj REACH regulativi se za kemikalije/nanomaterijale koji se na godišnjoj razini proizvode u količinama većim od jedne tone nužno je procijeniti njihov potencijalni učinak na vodene ekosustave [6]. Preporuka je u tu svrhu primjeniti uključivati akutni (48 h) test toksičnosti koristeći ljuskare (preferirano *Daphniju magnu*, OECD 2004., *Organisation for Economic Cooperation and Development*) i 72-satnu inhibiciju rasta vodenih biljaka (preferirano alge, OECD 2011.). Dodatno je potreban akutni (96 h) test toksičnosti na ribama (OECD 1992.) ako je godišnja proizvodnja iznad 10 tona. Iz raznih literaturnih izvora se vidi da su te testne vrste podobne za okolišnu procjenu rizika u nanoekotoksikološke svrhe [35,36].

Daphnia magna, poznatija kao vodenbuha, je mali ljuskar reda Cladocera [37] i njihovo stanište su slatke vode diljem svijeta [38]. Kada imaju dovoljno hrane razmnožavaju se aseksualno procesom partenogeneze što olakšava brzo kolonijalno širenje. Pod stresom im se reprodukcija mijenja u seksualnu i ona također može biti pod utjecajem toksikanata i zbog toga se rutinski uzima za procjenu potencijalne toksičnosti mnogih tvari [39]. *Daphnia* je poželjan organizam za ekotoksikološku procjenu rizika zbog brojnih razloga. Lako ih je uzgajati u laboratoriju, a mala veličina i kratak životni ciklus čini ih financijski isplativim [23]. Zbog neobičnog načina reprodukcije također povećavaju reproducibilnost redukcijom biološke varijabilnosti [40]. Ekstenzivna su testiranja na *Daphnijama* već bila rađena i poznato je da su one komparativno osjetljive na mnoge tvari uključujući teške metale. Te karakteristike su razlog što je ovaj organizma postao jedan od standardnih testnih vrsta u ekotoksikološkim procjenama [41].



Slika 3.2. *Daphnia magna* (preuzeto iz [42]).

Loza *Daphnije magne* korištena u ovom radu je kupljena od kompanije MicroBio-Tests Inc. (Mariakerke, Belgija). Organizmima se rukovalo prema protokolu HRN EN ISO 6341:2013 i prema OECD smjernicama. Uzgajani su u standardnom mediju za kulture (SM) koji je sadržavao 294 mg/L $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 123.25 mg/L $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 64.75 mg/L NaHCO_3 i 5.75 mg/L KCl pri pH 7.8 ± 0.5 . Temperatura medija je održavana između 19 i 21 °C.

Životinje su se izlagale nanočesticama srebra i ionskom srebru 72 do 84 h nakon što su se izlegne, dakle, tretirali su se neonati *Daphnije magne*.

3.3. Akutni test toksičnosti

U akutnom testu toksičnosti testni organizmi su bili izloženi različitim koncentracijama nano i ionskog srebra. Primjenjene su koncentracije nanoAg od 0.1, 0.5, 1, 3, 5, 10, 15, 20 i 25 $\mu\text{g/L}$, te AgNO_3 od 0.01, 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 5, 10, 15, 20 i 25 $\mu\text{g/L}$. Grupe od 5 neonata *D. magne* (starosti 72-84 h) stavljene su u epruvete koje su sadržavale 10 mL medija u kojem je bilo otopljeno nanoAg ili Ag^+ . Neonati su tim uvjetima bili izloženi 24 i 48 h za svaku pojedinu koncentraciju. Tijekom perioda izlaganja neonati nisu dobivali ni hranu ni suplemente. Njihova imobilizacija i abnormalnosti u ponašanju su procijenjene vizualno nakon 24 i 48 h inkubacije. Test je proveden 4 puta u 4 replikata. Analiza linearne regresije je korištena kako bi se odredio EC_{50} – efektivna koncentracija koja dovodi do 50 %-tne smrtnosti testne populacije.

3.4. Biomarkeri oksidativnog stresa

3.4.1. Metode detekcije biomarkera

Biomarkeri oksidativnog stresa određeni su pomoću UV-Vis i fluorescentne spektroskopije.

3.4.1.1. UV-Vis spektrofotometrija

Svaka kemijska struktura može apsorbirati svjetlost različitih valnih duljina zbog karakterističnih elektronskih struktura (elektronskih distribucija). Ekscitirani elektroni mogu se vratiti u osnovno stanje preko vibracijske tranzicije. Dio energije se izgubi u sudaranju s molekulama otapala. Fenomen apsorpcije se može kvantificirati Beer-Lambertovim zakonom:

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

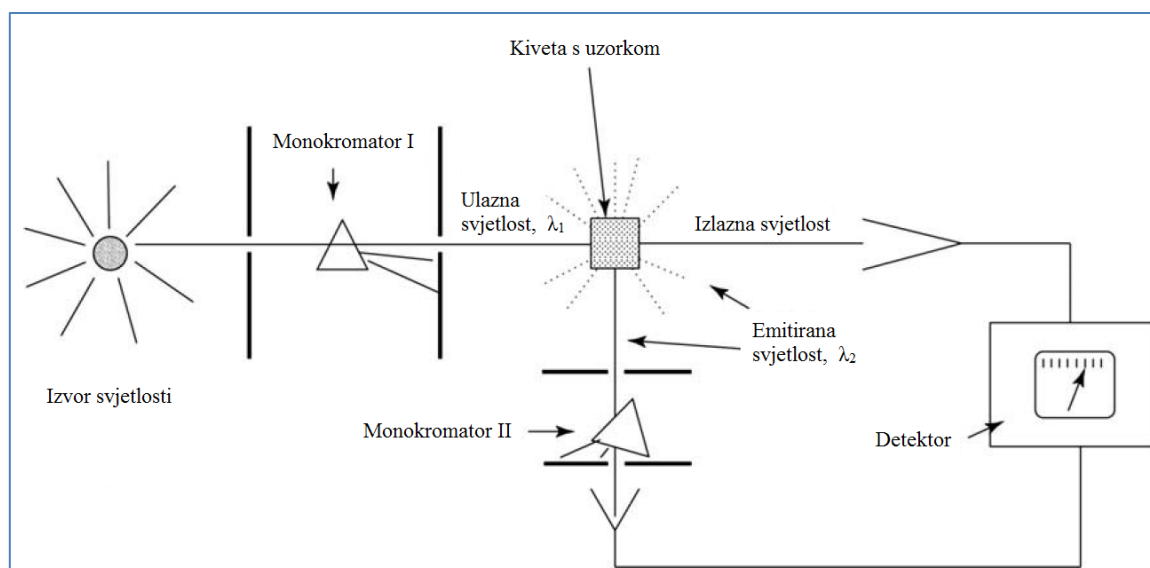
gdje je I_0 intenzitet ulazne svjetlosti, I je intenzitet izlazne svjetlosti, c je molarna koncentracija, l je duljina puta svjetlosti, a ε je molarni ekstinkcijski koeficijent. Izraz $[\log I_0/I]$ je apsorbanacija A_λ na određenoj valnoj duljini λ .

Kako je apsorbanacija izravno ovisna o koncentraciji može poslužiti za njezino mjerenje ako imamo standardne otopine tvari. Točnost kvantifikacije se smanjuje kod visokih apsorbanacija, tako da je linearnost mjerenja u rangu 0-1.0.

Apsorpcijski spektar se mjeri spektrofotometrom. Elektromagnetsko zračenje, tj. izvor svjetlosti se dobiva iz volfram-halogene (290-900 nm) i deuterijeve lampe (210-370 nm). Ovakva svjetlost ima valove različitih valnih duljina tako da je potreban monokromator koji će razložiti svjetlost na pojedine valne duljine. Monokromatska svjetlost prolazi kroz uzorak i detektira se fotodetektorom (fotomultiplikatorske cijevi ili fotodioda). Za mjerenja u vidljivom svjetlu koriste se staklene ili plastične kivete, no kako one mogu apsorbirati ultraljubičasto zračenje za UV područje se koriste kvarcne kivete [43].

3.4.1.2. Fluorimetrija

Fluorescencija je fenomen u kojem kromofora nakon apsorbirane svjetlosti emitira svjetlost veće valne duljine, tj. manje energije. Te kromofore imaju specifičnu valnu duljinu apsorpcije i drugačiju valnu duljinu emisije što može poslužiti za osjetljivo mjerenje koncentracije takvih molekula. Mjerenja se provode na spektrofluorimetru. Ulazna zraka određene valne duljine prolazi kroz uzorak, a emitirano zračenje se detektira fotomultiplikatorskom cijevi. Glavna razlika fluorimetrije u odnosu na spektrofotometriju jest u prisutnosti drugog monokromatora koji odabire valnu duljinu emitiranog zračenja pod kutem od 90° u odnosu na ulazno zračenje. Pošto je fluorescencija emitirana u svim smjerovima, ovakav dizajn isključuje neželjenu detekciju ulaznog zračenja [43].

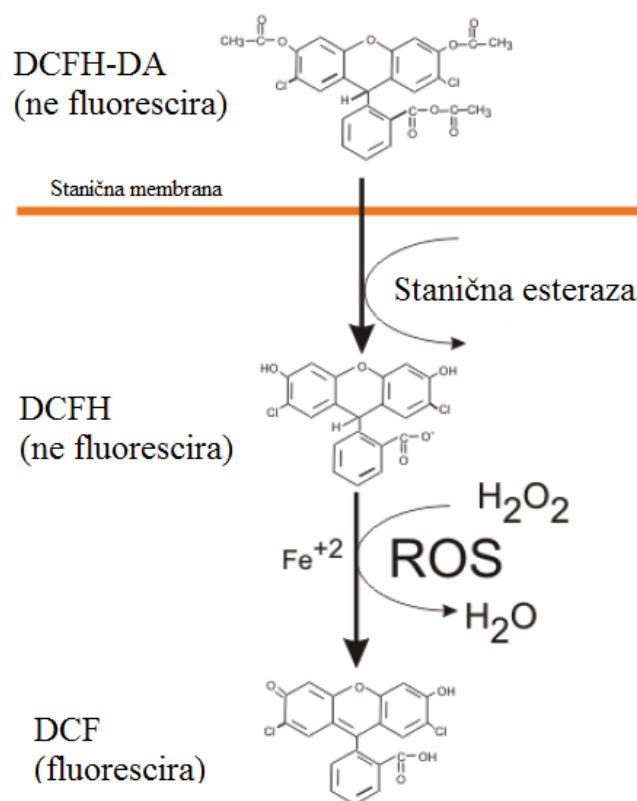


Slika 3.4.1.2. UV-Vis spektrofluorimetar (preuzeto iz [43]).

3.4.2. Priprema testnih organizama

Nakon 48-satnog izlaganja mediju koji je sadržavao nanoAg ili Ag^+ , preživjeli neonati su se dalje koristili za enzimske analize. Svaki uzorak u kojem se određivao jedan od parametara oksidativnog stresa pripremljen je od preživjelih neonata izloženih određenoj koncentraciji nanoAg ili Ag^+ . Sveukupno je pripremljeno 2 do 3 uzorka po koncentraciji. Staklenom pipetom su neonati preneseni u Eppendorf epruvete, a višak testne otopine je uklonjen. Zatim su životinje oprezno ispirane tri puta s 50 mM fosfatnim puferom (PB, pH 7.4) koji je sadržavao 5 mM EDTA (Sigma Aldrich, Njemačka). Nakon zadnjeg ispiranja neonati su stavljeni u 1 mL PB-a te su homogenizirani sonifikatorom Soniprep 150 (MSE Ltd, UK) tijekom 40 sekundi u ledenoj kupelji. Enzimske aktivnosti su izmjerene iz svježe pripremljenih homogenata za svaki uzorak u triplikatu.

Ispiranje viška kemikalija s površine životinja i sonifikatora je važna mjera predostrožnosti kako bi se izbjegli mogući *in vitro* efekti i interferencije prouzročene interakcijom nano i ionskog srebra, zaostalih iz medija u kojem su neonati tretirani, s kemikalijama korištenim u biokemijskim testovima [44].

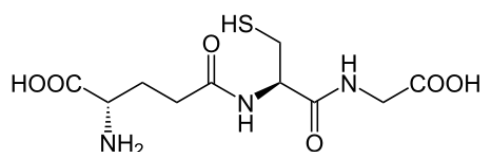


Slika 3.4.3.b. Oksidacija DCFH-DA (preuzeto iz [18]).

Nakon tretmana sa nano ili ionskim oblikom srebra, po 10 preživjelih neonata iz iste vrste tretmana prebaćeno je u mikrotitarsku pločicu s 24 bunarića. U svakom bunariću nalazio se 1 mL 50 mM PB pH 7.4. Kako bi se minimizirale interferencije nanoAg s fluorescentnim mjerenjima, uobičajeni protokol testa s DCFH-DA i s DHE je modificiran te je medij za tretiranje uklonjen, a životinje su isprane tri puta s PB pH 7.4 prije inkubacije s fluorescentnim probama. Zatim su neonati inkubirani ili s 10 μM DCFH-DA ili s 20 μM DHE 30 min na 37 °C. Poslije toga su neonati isprani od boje s PB pH 7.4, te su homogenizirani sonificiranjem. Razina ROS-ova se u tako pripremljenim homogenatima odredila mjerenjem razine fluorescencije primjenjenih fluorescentnih proba koristeći čitaču mikrotitarskih pločica VictorTM (Perkin Elmer, Massachusetts, SAD). Rezultati su izraženi kao postotak fluorescencije u odnosu na kontrolu.

3.4.4. Reducirani glutation

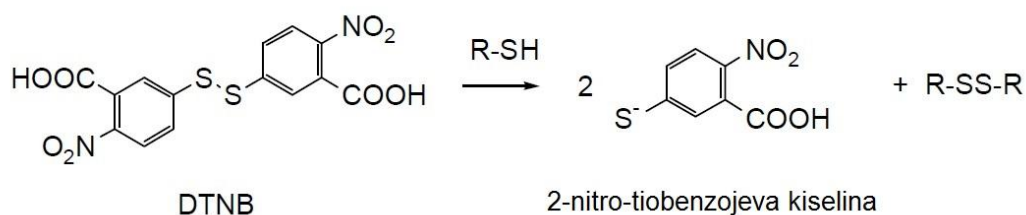
Glutation (GSH, γ -L-glutamyl-L-cisteinilglicin, Mr 307.32) je najobilniji neproteinski tiol u stanicama. On štiti stanice od egzogenih i endogenih toksina, uključujući ROS-ove. Takve specije se uklonjenjaju iz stanice neenzimatskom redukcijom s GSH, dok uklanjanje hidroperoksida zahtijeva enzimsku katalizu s glutacion peroksidazom. Obje reakcije dovode do glutacion disulfida (GSSG, oksidirani glutacion) koji se natrag reducira u GSH uz glutacion reduktazu i NADPH. Glutacion također modificira proteinske sulfhidrilne skupine [46].



Razina reduciranog glutaciona je određena prema metodi iz literature [47].

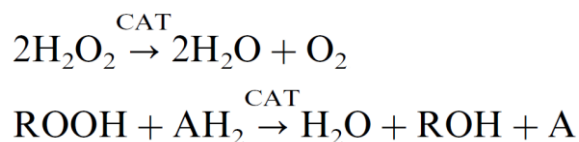
Metoda određivanja razine GSH u stanicama i tkivima se temelji na spektrofotometrijskom određivanju produkta redukcije 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzojeve kiseline) (DTNB). Naime, GSH reducira DTNB u 2-nitro-5-tiobenzojevu kiselinu čije se nastajanje može pratiti spektrofotometrijski na 412 nm.

U ovom istraživanju, DTNB otopljen u u 100 mM PB pH 7.4 je dodan homogenatima neonata tako da je konačna koncentracija DTNB-a bila 0.3 mM. Ova smjesa je dobro promiješana i apsorbancija je izmjerena na 412 nm unutar 2-3 min nakon dodatka DTNB-a na UV-Vis spektrofotometaru CARY 300 (Varian Inc., Australija). Koncentracija GSH u homogenatima određena je primjenom kalibracijske krivulje koja je izrađena pomoću točno određenih koncentracija GSH standarda (Alfa Aesar, Njemačka). Količina GSH je izražena kao μg GSH/mg vlažnog tkiva.



3.4.5. Katalaza

Katalaza (KAT, 1.11.1.6, 240 kDa) je tetramerni enzim koji ima četiri feriprotoporfirinske skupine po molekuli. Katalaza je vrlo efikasna i ne može se zasiti supstratom vodikovim peroksidom koji konvertira u vodu i molekularni kisik. Također reagira s H-donorima (metanol, etanol, formijatna kiselina, fenol...) koristeći 1 mol peroksida u obliku peroksidazne aktivnosti. H_2O_2 se enzimatski katabolizira u aerobnim organizmima katalazom i peroksidazama. Također, KAT štiti stanice od stvaranja H_2O_2 unutar njih. Iako nije esencijalna za neke stanične tipove u normalnim uvjetima, igra važnu ulogu u stvaranju tolerancije na oksidativni stres u adaptivnom staničnom odgovoru [48].



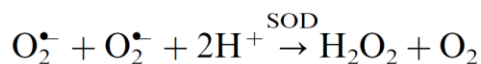
Aktivnost katalaze je određena prema metodi iz literature [49].

50 μL homogenata je dodano u 160 μL H_2O_2 pripremljenog u 50 mM PB pH 7.4. Konačna koncentracija H_2O_2 je bila 150 mM. Reakcija je praćena spektrofotometrijski tijekom 2 min na 25°C mjerenjem promjene apsorbancije na 240 nm koristeći UV-Vis spektrofotometar (CARY 300, Varian Inc., Australija). Aktivnost katalaze je izražena u jedinicama. Jedna jedinica KAT razgradi 1 μmol H_2O_2 u 1 minuti.

3.4.6. Superoksid dismutaza

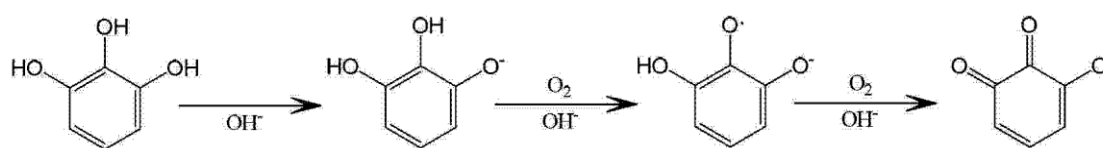
Superoksid dismutaza (SOD, EC 1.15.1.1) je enzim koji uništava slobodni radikal superoksid prevodeći ga u peroksid koji potom može biti razgrađen katalazom. Druga funkcija SOD-a je zaštita dehidrataza (fumaraza A i B) od inaktivacije superoksidima. SOD također katalizira dismutaciju tranzicijskih metalnih iona u aktivnom mjestu ping-pong mehanizmom tako što ih sukcesivno oksidira i reducira. Četiri klase SOD-a su identificirane ovisno o sadržaju dinuklearnog bakra-cinka ili mononuklearnog željeznog, manganovog ili

niklovog kofaktora. U ljudi postoje tri forme SOD: citosolna Cu,Zn-SOD, mitohondrijska Mn-SOD i izvanstanična SOD [48].



Aktivnost superoksid dismutaze određena je metodom autooksidacije pirogalola koja je dostupna iz literature [50].

Pirogalol (Sigma, Njemačka) brzo autooksidira u vodenom ili alkalnom mediju, a SOD inhibira tu autooksidaciju. Otopina prvo postaje žuto-smeđa sa spektrom koji ima maksimum apsorpcije između 400 i 425 nm. Nakon nekoliko minuta boja postaje zelena i nakon nekoliko sati pojavljuje se žuta boja. U radu je autooksidacija praćena na početku reakcije i brzina je određena iz linearnog porasta apsorpcije na 420 nm nakon induksijskog perioda od 10 s. Tkivni homogenat je razrijeđen u 50 mM Tris-HCl puferu pH 8.5 s 1 mM EDTA, a reakcija je pokrenuta dodavanjem svježe pripremljene otopine pirogalola tako da je konačna koncentracija pirogalola u mjernoj otopina bila 0.26 mM. Brzina porasta apsorpcije na 420 nm praćena je tijekom 2 min (od 1 min 30 s do 3 min 30 s) koristeći UV-Vis spektrofotometar (CARY 300, Varian Inc., Australija). Vrijeme zaostajanja od 1 min 30 s od početka reakcijekorišteno je za dobivanje ustaljenog stanje autooksidacije pirogalola što doprinosi reproducibilnosti mjerenja. Jedna jedinica SOD-a je određena kao količina enzima potrebna da inhibira autooksidaciju 50 % po mL reakcijske smjese. Rezultati su izraženi kao postotak aktivnosti SOD u odnosu na kontrolu.



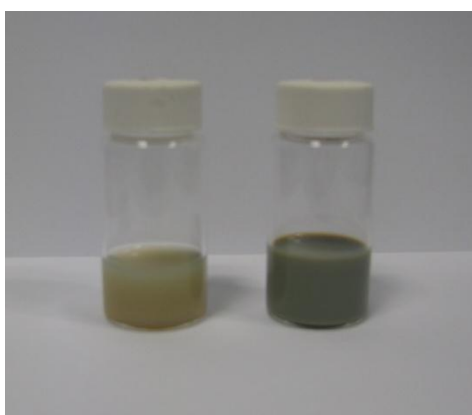
3.4.7. Statistička obrada

Testovi su provedeni u najmanje tri replikata i podaci su izloženi kao prosječna vrijednost \pm standardna devijacija (SD). Korišten je software STATISTICA v10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, SAD). Analiza podataka kod usporedbe tretmana nanoAg i Ag^+ na odgovor biokemijskih biomarkera provedena je koristeći studentov *t*-test. Značajna razlika je ustanovljena kod $p \leq 0.05$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Karakterizacija nanočestica srebra

U svrhu ovog istraživanja pripravljene su nanočestice srebra obložene i stabilizirane citratom. Citrat je najčešće korišteni stabilizirajući agens srebra, ima svojstvo da se slabo veže za površinu nanočestica i time im pruža dugotrajnu stabilnost.



Slika 4.1.a. Nepročišćene (lijevo) i pročišćene (desno) nanočestice srebra obložene citratom.

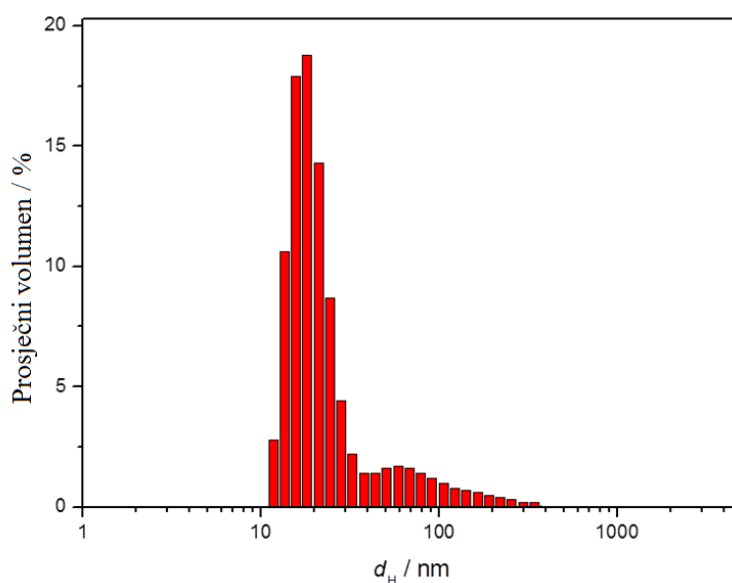
Karakterizacija i stabilnost kojicitratno obloženih nanoAg su određene za pročišćene nanočestice u destiliranoj vodi (DV) i u mediju za uzgoj vodenbuha (SM).

U tablici 4.1. nalaze se podaci o hidrodinamičkom promjeru (d_H), polidisperzijskom indeksu (PdI) i ζ potencijalu nanočestica obloženih citratom. Pokazano je da prevladavaju dvije populacije nanočestica. Dominantna populacija čini čestice veličine 18.2 ± 10.1 nm, dok manja populacija čini veće čestice hidrodinamičkog promjera 101.4 ± 48.3 nm u UPW-u. Negativni ζ potencijal ukazuje na elektrostatsku stabilizaciju nanočestica zbog ionizacije polarnih karboksilnih skupina citrata na njihovoj površini.

Tablica 4.1. Hidrodinamički promjer, ζ potencijal i polidisperzijski indeks sintetiziranih nanočestica u UV i SM.

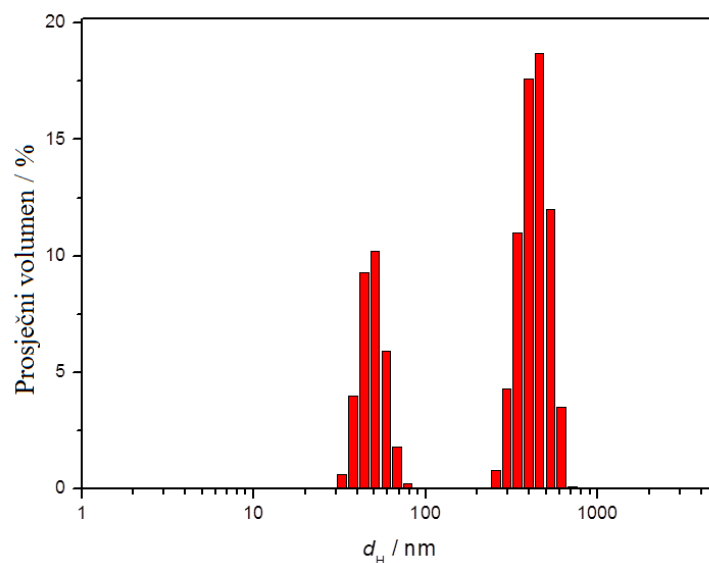
Medij	Pik I		Pik II		ζ potencijal, mV	PdI
	d_H , nm	Prosječni volumen, %	d_H , nm	Prosječni volumen, %		
UV	18.2 ± 10.1	85.3	101.4 ± 48.3	12.4	-19.6 ± 0.8	0.39
SM	46.2 ± 23.8	49.3	395.7 ± 264.7	53.8	-18.1 ± 0.4	0.58

Stabilnost čestica u vodenom sustavu je važan parametar u nanotoksikologiji [51]. Kako je primjećeno da sastav medija utječe na stabilnost [52-54], procijenjena je agregacija 1 mg/L nanoAg nakon 0, 1, 4, 24 i 48 h. Nanočestice srebra su bile stabilne tijekom 48 h u destiliranoj vodi gdje nisu primjećene promjene u hidrodinamičkom promjeru d_H (Slika 4.1.b).



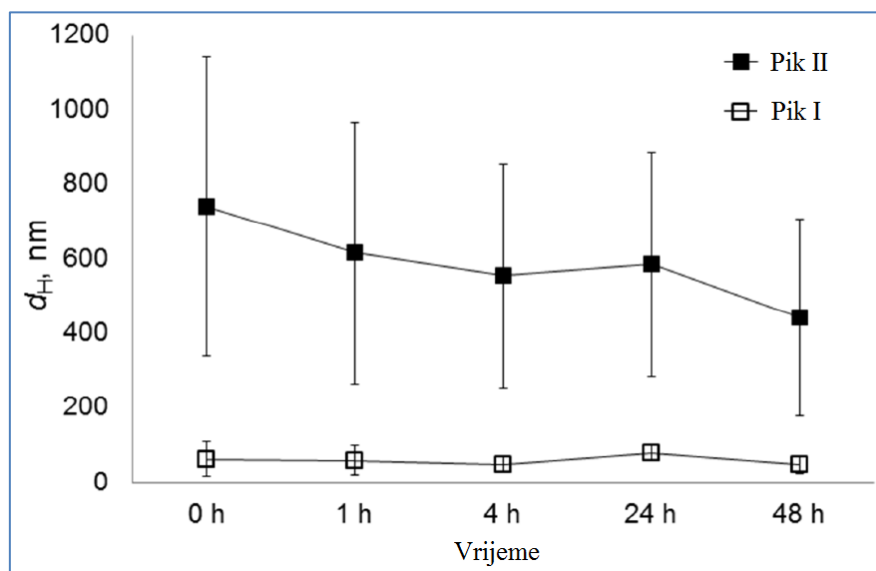
Slika 4.1.b. Dijagram distribucije veličina AgNPs u UV nakon 48 h.

Nakon dodavanja nanočestica u SM dolazi do njihove agregacije s bimodalnom distribucijom veličina (Slika 4.1.c). Manje čestice (pik I) su se udvostručile, promjer u mediju im je 46.2 ± 23.8 nm te im se brojnost smanjila. Promjer većih čestica (pik II) povećao se na 395.7 ± 264.7 nm nakon 48 h.



Slika 4.1.c. Dijagram distribucije veličina AgNPs u SM nakon 48 h.

Relativno velika standardna devijacija i smanjenje prosječnog d_H većih čestica (pik II) primijećeni su s prolaskom vremena vjerojatno zbog pojave agregacije u SCM (slika 4.1.d).



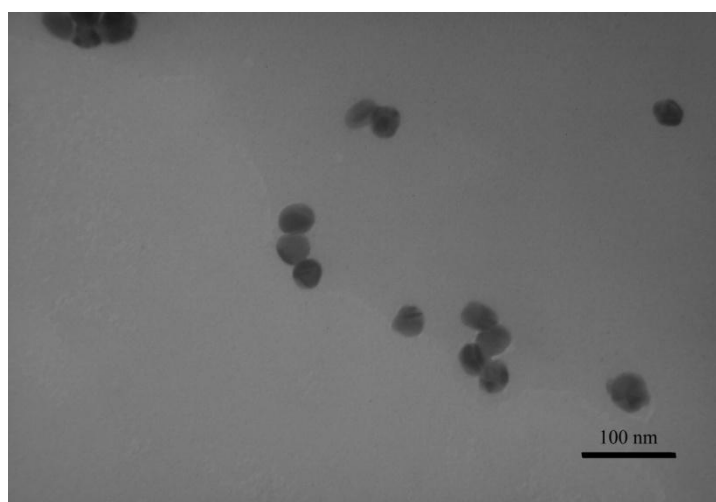
Slika 4.1.d. Agregacija nanočestica srebra tijekom 48 h u SM.

Brzina agregacije ovisi o urušavanju difuznog sloja suprotno nabijenih iona oko čestice i učestalosti interakcija između čestica kao posljedica visoke koncentracije. Zbog toga

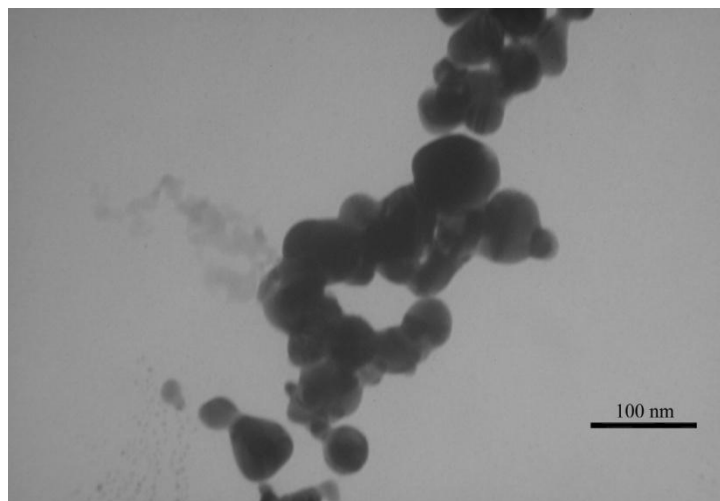
suspencije nanoAg na nižim koncentracijama, koje su korištene u ovom istraživanju mogu manje agregirati nego suspencije većih koncentracija koji se koriste u DLS mjerenjima. Nažalost, većina analitičke opreme ne može točno okarakterizirati AgNPs u suspenziji kod toksikološki važnih koncentracija (1-100 $\mu\text{g/L}$) [55], a koloidna stabilnost nanočestica u vodenom testnom sustavu je važan faktor kod reaktivnosti koja dovodi do toksičnosti. Ta korelacija je već utvrđena u prijašnjim radovima koji pokazuju značajnu toksičnost metalnih nanočestica prema slatkovodnim algama [51,56].

Agregacijski profil nanočestica u SM korištenih u ovom radu jasno pokazuje značajno povećanje veličine nanočestica kako se povećala ionska jakost medija (slika 4.1.d), no stabilnost je ostala ista. Ovaj zaključak je podržan rezultatima mjerenja ζ potencijala u UV i SM (Tablica 4.1.). Primjećena je samo mala promjena ζ potencijala nakon suspenzije nanoAgNP u SM u odnosu na izmjerene vrijednosti u UV. Vrijednost ζ potencijala je stoga korisna za razumijevanje i predviđanje interakcija između čestica u suspenziji, pošto je povezan sa svojstvima površinskog naboja i stabilnosti nanočestica [56].

TEM analizom dodatno je potvrđena veličina nanočestica dobivena DLS mjerenjima (slika 4.1.e). Na Slici 4.1.f. se jasno vide agregati nanočestica srebra koji su nastali nakon dispergiranja nanoAg čestica u SM.



Slika 4.1.e. TEM slika nanočestica srebra u UV.



Slika 4.1.f. TEM slika agregiranih nanočestica srebra u SM.

Osim veličine čestica, površinske funkcionalizacije i kristaličnosti nanočestica, priroda imerzijskog medija (npr. prisutnost soli ili biomolekula) je važan faktor kod otapanja nanočestica [57,58]. Provjera otopljene količine Ag^+ korištenjem srebrove ion-selektivne elektrode pokazala je da slobodan udio Ag^+ iona čini od 0.1 do 0.5 % ukupnog srebra u suspenziji nanoAgNP u UV, dok nije bilo nikakve promjene u elektrodnom potencijalu kod suspenzije nanoAg u SM nakon 48 h. To ukazuje da se u SM ili nije dogodilo otpuštanja Ag^+ iona ili je otpuštanje bilo ispod razine detekcije (do 10^{-7} M) za korištenu metodu. Koncentracijski doseg nanoAg korištenih u toksikološkom ispitivanju je 1000 puta manji od koncentracije korištene kod evaluacije stabilnosti. Na temelju ovih rezultata može se zaključiti da uopće nema otapanja nanočestica u SM. No, moguće je da se oslobođeni Ag^+ vezao za prisutne makromolekule u SM ili se istaložio u obliku srebrovog klorida ili srebrovog fosfata [59].

4.2. Akutni test toksičnosti

Postoji veliki broj podataka o toksičnom utjecaju metalnih nanočestica na *Daphniju magnu* [60]. Nekoliko studija tvrdi da nanočestice srebra induciraju toksičnost, unos i akumulaciju u *D. magni* [60-63]. U ovom radu je potvrđena toksičnost i na razini organizma i na biokemijskoj razini. Imobilizacija i posljedična smrtnost *Daphnije magne* ovisile su o koncentraciji srebra i o vremenu izlaganja. Nakon 24 h sve su životinje preživjele do

koncentracije nanoAg od 7 µg/L, dok je preživljenje od 40, 38 i 26 % bilo kod koncentracija redom 15, 20 i 25 µg/L. Nakon 48 h sve su životinje preživjele do koncentracije nanoAg 5 µg/L, dok je preživljenje od 98, 86, 34, 28 i 20 % bilo kod koncentracija redom 7, 10, 15, 20 i 25 µg/L.

Za Ag⁺ je primijećeno preživljenje 60 i 16 % kod koncentracija 5 i 10 µg/L nakon 24 h. Nakon 48 h su određena preživljenja od 75, 38 i 15 % kod koncentracija Ag⁺ od 1, 3 i 5 µg/L.

EC₅₀ nakon 48 h je za nanoAg određen za koncentraciju 12.4 µg/L, a za Ag⁺ za koncentraciju 2.6 µg/L. Jasno se vidi da su Ag⁺ značajno toksičniji u odnosu na srebrne nanočestice. Manja toksičnost različitih nanočestica srebra kod dafnida u usporedbi s topljivim srebrovim solima prikazana je u drugim radovima [64-69]. Kako bi se otkrila uloga Ag⁺ iona u ukupnoj toksičnosti nanoAg, potrebno je kvantificirati otapanje nanoAg. Trenutno su analitičke metode za detekciju i kvantifikaciju otapanja nanoAg u kompleksnom matriksu ograničene [70]. U koncentracijskom dosegom 1-10 mg/L nanoAg količina otopljenog Ag⁺ iz citratom obloženih nanočestica određena je da se nalazi u rasponu između 0.3 i 0.5 % u UV, dok nisu detektirani slobodni Ag⁺ ioni u suspenziji nanočestica u SM. Ako je za pretpostaviti da bi svojstva otapanja nanočestica ostala ista bez obzira na korištenu koncentraciju, tada se može zaključiti da nema slobodnih Ag⁺ iona u SM nakon 48 h.

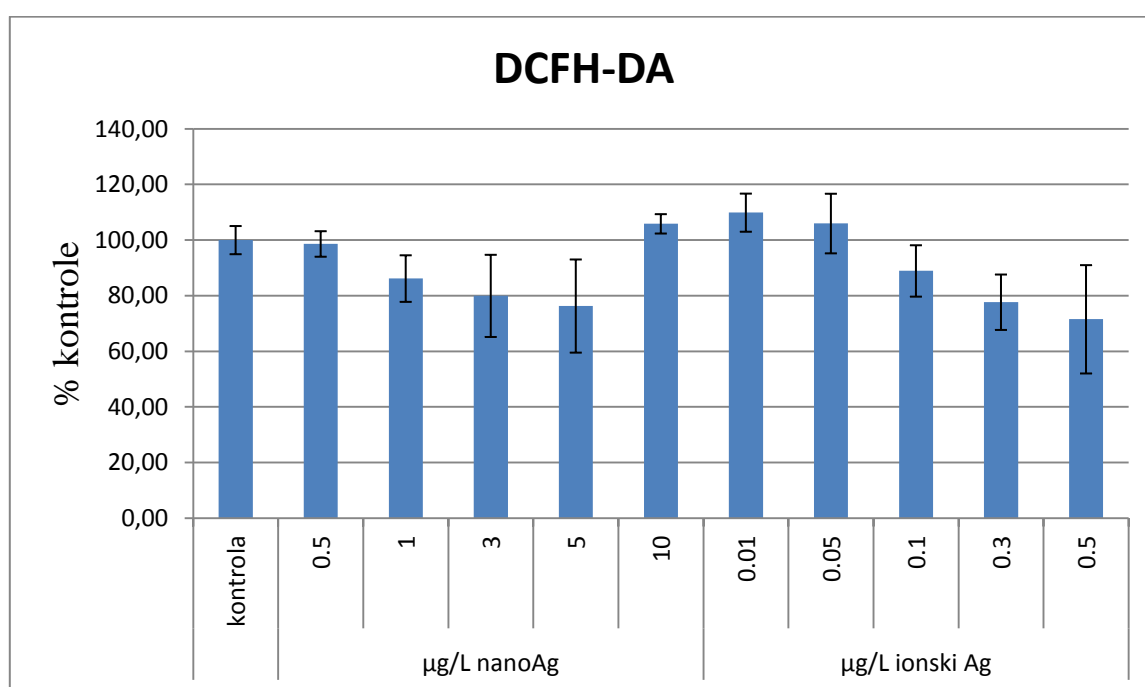
Kompleksni kemijski i biološki procesi koji stalno mijenjaju Ag specijacije tijekom testa, te različiti putevi izlaganja organizma nanočesticama, čine analizu udjela Ag⁺ u ukupnoj toksičnosti nanočestica jako kompliciranom [71]. Usto, ingestija i ekskrecija nanočestica srebra te adhezija agregata na vanjsku površinu testnih organizama (npr. egzoskelet ljuskara) tijekom testa može promijeniti specijaciju srebra [72].

4.3. Biomarkeri oksidativnog stresa

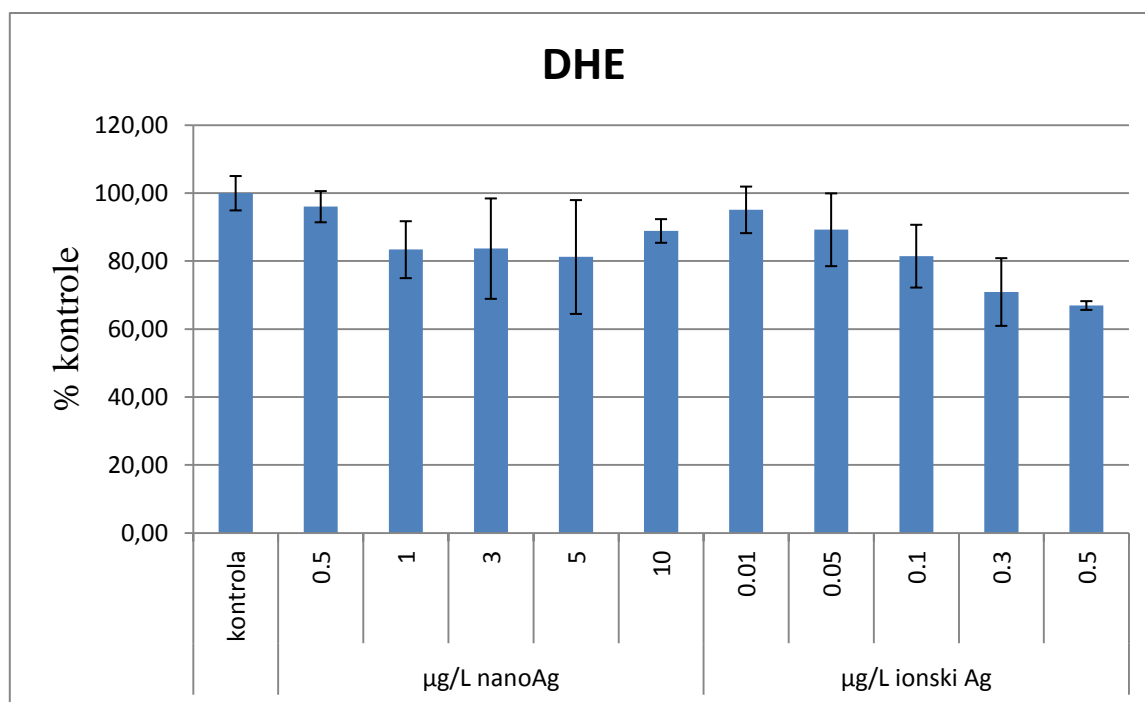
Vjeruje se da je glavni mehanizam toksičnosti nanočestica pojava oksidativnog stresa koji je induciran ROS-om koji dalje oštećuje lipide, ugljikohidrate, proteine i DNA [15]. U ovom istraživanju analizirani su biomarkeri oksidativnog stresa: aktivnosti SOD i CAT, razina GSH, razina unutarstaničnih ROS-ova. Također ima mnogo radova u kojima se razina ROS-a pratila direktno korištenjem fluorescentnih proba [73-75]. Direktna mjerenja obično koriste

spektrofluorimetriju, protočnu citometriju ili spektrofotometriju kako bi se pratilo stvaranje inducirano ROS-om fluorescentnih produkata fluoresceina – DCFH-DA i DHE.

Rezultati razine ROS-a u neonatime vrste *Daphnia magna* izloženih različitim koncentracijama nanoAg i Ag⁺ dobiveni u ovom istraživanju prikazani su na Slikama 4.3.a i 4.3.b. Ti rezultati pokazuju značajno smanjenje razine ROS-a nakon tretmana s Ag⁺, dok je pad intenziteta fluorescencije kod nanoAg vidljiv do koncentracije 5 µg/L. Fluorescencija oksidiranih proba DCF i EOH je izravno proporcionalna sa stvaranjem unutarstaničnog ROS-a. Superoksidni radikal je izmjeren korištenjem DHE bojenja i rezultati su pokazali sličan trend kao i za DCFH-DA test. Fluorescencija EOH koja nastaje oksidacijom DHE, smanjila se 20 do 30 % nakon izlaganja nanočesticama srebra i Ag⁺ ukazujući na smanjenje razine prooksidanta superoksida u neonatima *D. magne* s disfunkcionalnim mitohondrijima.



Slika 4.3.a. In vivo utjecaj nanoAg i Ag⁺ na oksidativni stres induciran u neonatima vrste *Daphnia magna* nakon akutnog izlaganja tijekom 48 h. Razina ROS-a izmjerena pomoću DCFH-DA.



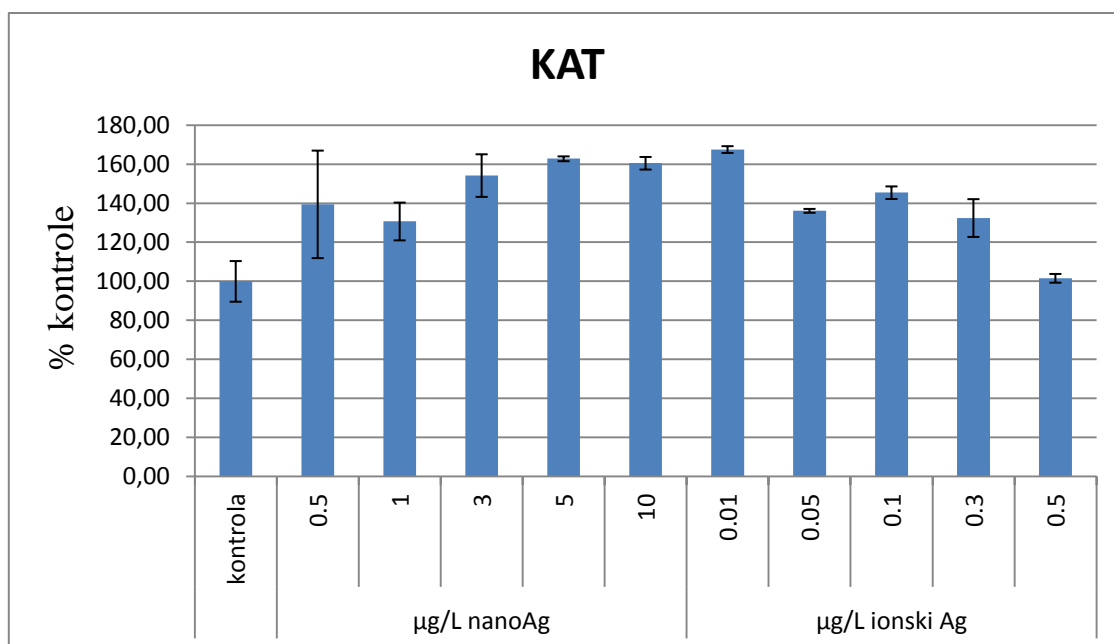
Slika 4.3.b. *In vivo* utjecaj AgNP i Ag⁺ na oksidativni stres inducirani u neonatima vrste *Daphnia magna* nakon akutnog izlaganja tijekom 48 h. Razina ROS-a izmjerena pomoću DHE.

Ovakvi rezultati ne znače da do stvaranja ROS-a nije došlo u *Daphnije magne* nakon izlaganja srebru. Nekoliko enzimskih obrambenih mehanizama poput SOD i KAT aktiviraju se prilikom nastajanja ROS-a te aktivno sudjeluju u smanjenju njihove razine, smanjujući istovremeno i njihovoštetno djelovanje. Osjetljivost enzimatskih odgovora ovisi o funkciji svakog enzima. Katalaza, enzim koji sadrži mangan ili skupinu hem, dismutira kako bi iz H₂O₂ nastala voda i elementarni kisik. SOD igra ključnu antioksidativnu ulogu u dismutaciji superoksid radikala. Metabolizam povezan s GSH je glavni mehanizam za zaštitu stanica od oksidativnog stresa, pošto ne pruža zaštitu samo protiv ROS-a, nego i protiv njihovih toksičnih produkata [76].

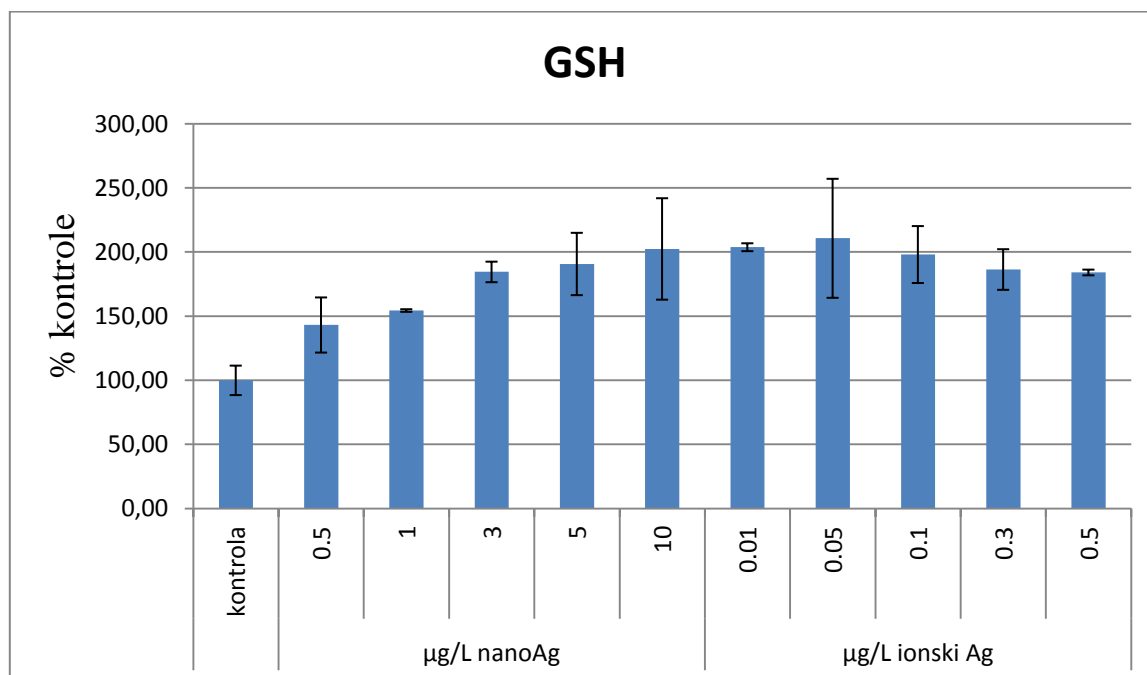
Na slici 4.3.c. i 4.3.d. prikazan je antioksidativni enzimatski odgovor u neonatima vrste *Daphnia magna* nakon akutnog izlaganja nanoAg ili Ag⁺ tijekom 48 h. Aktivnost KAT i razina GSH su se povećale s povećanjem koncentracije nanoAg što ukazuje da su se ovi enzimi aktivirali zbog povećane proizvodnje ROS-a koju se inducirale nanočestice. Značajan porast GSH primijećen je već kod 0.5 µg/L nanoAg dok je daljnje povećanje koncentracije nanoAg praćeno i rastom razine GSH. Ovakav rezultat je u skladu rezultatima dobivenim za fluorescentne probe DCFH-DA i DHE. Naime, povećanjem koncentracije nanoAg od 0.5 do 5

$\mu\text{g/L}$ smanjenjuje se intenzitet fluorescencije DCF i EOH (Slike 4.3.a i 4.3.b). To ukazuje da su se aktivirali obrambeni mehanizmi GSH i KAT koji su spriječili nakupljanje i smanjili razinu ROS-a. Organizmi se mogu prilagoditi povećanju ROS-a tako da povećaju antioksidativnu obranu poput povećane aktivnosti antioksidativnih enzima [77]. Osim enzima izravno povezanih sa stvaranjem i uklanjanjem ROS-a, nekoliko drugih staničnih „puferskih“ sustava pokazuju da smanjuju ukupnu unutarstaničnu proizvodnju ROS-a i posljedično interferiraju s utjecajima oksidativnog stresa [78]. Jedan od tih „puferskih“ jest GSH kao glavni izvor staničnog tiola [78]. GSH je posebno aktivan u mitohondrijima gdje se većina nastalog ROS-a u tim organelama uklanja GSH-ovisnim redoks sustavom [79]. Tako mogu povećane rezerve unutarstaničnog reduciranog GSH predstavljati glavni događaj koji snižava razinu ROS-a. Sličan je uzorak primijećen kod životinja izloženih Ag^+ (Slika 4.3.d). Kod koncentracije nanoAg od $10 \mu\text{g/L}$ u odnosu na $5 \mu\text{g/L}$ dolazi do porasta fluorescencije primjenom DCFH-DA i DHE boja uz blagi pad aktivnosti KAT, što ukazuje da nanoAg pri koncentraciji od $10 \mu\text{g/L}$ već izaziva znatniji porast ROS-a koje počinju inhibirati enzim KAT.

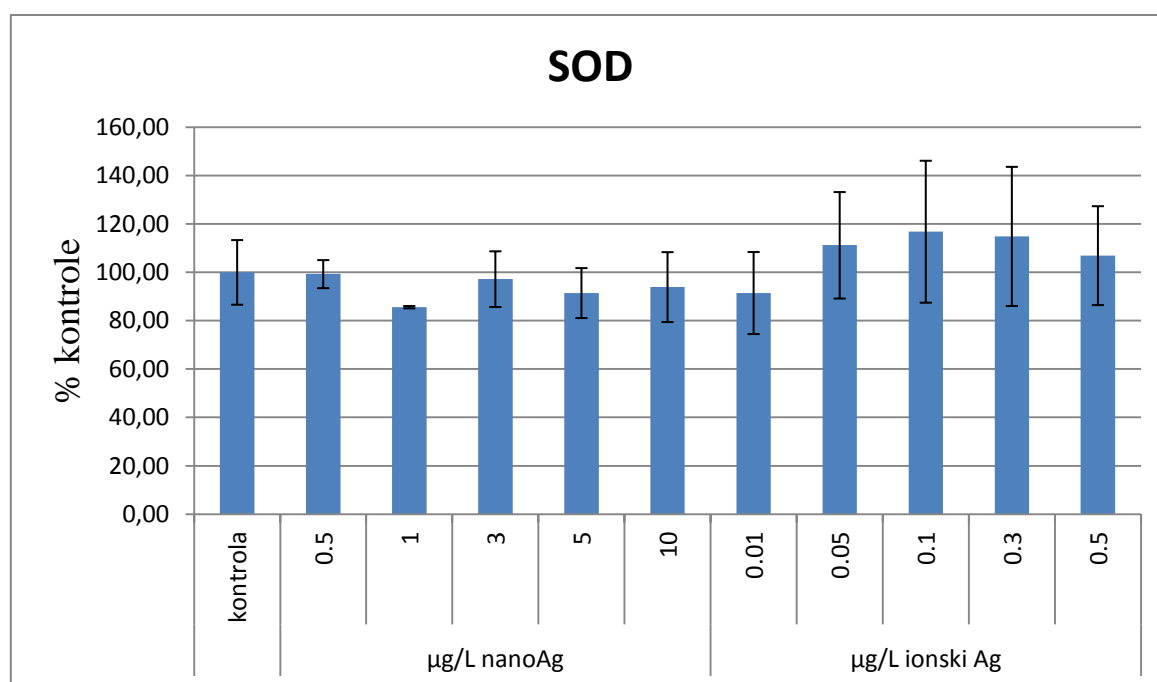
Značajan porast razine GSH i aktivnosti KAT pojavljuje se kod Ag^+ pri koncentraciji od $0.01 \mu\text{g/L}$, a daljnjim povećanjem Ag^+ koncentracija se aktivnost KAT i razina GSH počinju smanjivati uz istovremeni pad fluorescencije DCF i HE. Razlog tomu bi moglo biti stvaranje hidroksilnog radikala nakon tretiranja s Ag^+ što dovodi do trošenja unutarstaničnog GSH i brze inaktivacije KAT uzrokovane visokom koncentracijom H_2O_2 [80].



Slika 4.3.c. In vivo utjecaj AgNP i Ag⁺ na oksidativni stres induciran u Daphnije magne nakon akutnog izlaganja. Razina KAT.



Slika 4.3.d. In vivo utjecaj AgNP i Ag⁺ na oksidativni stres induciran u Daphnije magne nakon akutnog izlaganja. Razina GSH.



Slika 4.3.e. In vivo utjecaj AgNP i Ag⁺ na oksidativni stres induciran u *Daphniji magne* nakon akutnog izlaganja. Razina SOD.

Aktivnost SOD u neonatima *Daphnimagne* izloženima nanoAg nije se promijenila u odnosu na kontrole, dok je ta aktivnost malo, ali ne statistički značajno porasla nakon tretiranja s Ag⁺ (Slika 4.3.e). DHE bojanje detektira superoksidge, a SOD je enzim odgovoran za dismutaciju superoksidge, tako da su razlike u aktivnosti SOD kod tretiranih životinja i kod kontrole očekivane. Iako nije primijećena promjena u aktivnosti SOD, moguće je da je sniženje DHE posljedica drugih zaštitnih mehanizama koji mogu biti enzimatski i neenzimatski (poput askorbinske kiseline, α -tokoferola i GSH) [81].

5. ZAKLJUČAK

Može se zaključiti da su srebrne nanočestice pokazale toksičnost i inducirale oksidativni stres u 10 puta većim koncentracijama u odnosu na ionsko srebro što potvrđuje veću toksičnost ionskog srebra na vrstu *Daphnia magna*. Biokemijske analize pokazale susmanjenje razine reaktivnih kisikovih specija, povećanje razine glutationa i aktivnosti katalaze, dok nije bilo promjene aktivnosti superoksid dismutaze nakon izlaganja neonata vrste *Daphnia magna* citratom obloženim nanočesticama srebra. Ovakve promjene mogu ukazivati na mitohondrijska oštećenja. Subletalni tretman s ionskim srebrom nije pokazao jednaki odgovor. Kako se Ag^+ može otopiti iz AgNPs, ove dvije vrste srebra mogu djelovati komplementarno i dovesti do toksičnijeg odgovora.

U ovo radu su prikazani jasni dokazi o oksidativnom mehanizmu toksičnosti nanosrebra, koji upućuju na činjenicu da su metalni nanomaterijali značajno toksični za vodene organizme. Obzirom da mnogi okolišni zagađivači pokazuju toksične efekte izazivanjem oksidativnog stresa, preporuka je rabiti biokemijske biomarkere u kombinacijama s ostalim biomarkerima kao rane indikatore toksičnog stresa vodene biote. Primjećena značajno visoka toksičnost nanočestica srebra (u koncentracijama na razini $\mu\text{g/L}$) na vrstu *Daphnia magna* ukazuje da su ti organizmi osjetljivi dio vodenog hranidbenog lanca. Zbog toga otpuštanje biocidnih nanomaterijala u površinske vode predstavlja rizik vodenim vrstama koje žive u tom okruženju. Usto, složeni kemijski i biološki procesi koji mijenjaju oblik srebra u stvarnim okolišnim sredinama, kao i različiti putevi unosa srebra u organizam trebaju biti uzeti u obzir. Ovaj dio životnog ciklusa nanomaterijala može se kontrolirati na razini sigurnijeg dizajna ili ako je moguće reguliranim odlaganjem.

6. ZAHVALE

Zahvaljujem se svojoj neposrednoj voditeljici dr. sc. Ivani Vinković Vrček na povjerenju i strpljenju, za pruženo znanje i iskustvo. Zahvalna sam njezinoj spremnosti da unatoč svojim obavezama pronađe vrijeme za pomoć pri izradi ovog rada.

Zahvaljujem se svojoj voditeljici prof. dr. sc. Ireni Žuntar na pruženoj prilici za izradu ovog rada te na savjetovanju i konstruktivnim kritikama.

Zahvaljujem se Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada te Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu na pruženim sredstvima i prostoru za izradu ovog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Lei Ulm iz Hrvatskog zavoda za javno zdravstvo „Dr. Andrija Štampar“ na pomoći u radu s testnim organizmima, dr. sc. Goranu Šinku s IMI-a na pomoći u radu s UV-Vis spektrofotometrom, dr. sc. Dariji Jurašin s Instituta „Ruđer Bošković“ na pomoći u radu s DLS-om i doc. dr. sc. Mariji Ćurlin s Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na izradi TEM slika.

7. LITERATURA

1. Lux Research. Nanomaterials State of the Market Q3. Stealth Success, Broad Impact. Report; 2008. Dostupno na:
https://portal.luxresearchinc.com/research/document_excerpt/3735
2. Bondarenko O, Juganson K, Ivask A, Kasemets K, Mortimer M, Kahru A. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. *Arch Toxicol.* 2013; 87:1181-1200.
3. El-Badawy D, Feldhake R, Venkatapathy R. State of the Science Literature Review: Everything Nanosilver and More. 2010; EPA/600/R-10/084.
4. Klaine SJ, et al.: Paradigms to Assess the Environmental Impact of Manufactured Nanomaterials. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 2012; 31(1):3-14.
5. Piccinno F, Gottschalk F, Seeger S, Nowack B. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials for Europe and the world. *J Nanopart Res.* 2012; 14:1109–1120.
6. European Parliament and European Council, Directive 2006/121/EC. *Off. J. Eur. Union* 561(L396):850; 2006.
7. European Commission, Enterprise and Industry [Internet]. [citirano 1. travnja 2015.]. Dostupno na:
http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/reach/nanomaterials/index_en.htm
8. Height MJ. Nanosilver in Perspective. Expert Workshop „Nanosilver“, „Health Risk Assesment of Nanosilver“. Federal Institute for Risk Assesment (BfR) – Berlin Marienfelde; 2011.
9. Feldmann C, Goesmann H. Nanoparticulate Functional Materials. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010; 49:1362–1395.
10. Plavšić F, Žuntar I. Uvod u analitičku toksikologiju. Zagreb: Školska knjiga; 2006.
11. Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives.* 2005; 113(7):823-839.
12. Seetharam RJ, Sridhar KR. Nanotoxicity: Threat posed by nanoparticles. *Current Science.* 2007; 93(6):769-770.
13. Meng et al. Toxicological Paradigm for the Safety Assessment of Nanomaterials. *ACS Nano.* 2009; 3(7): 1620-1627.

14. Maynard AD. Safer handling of Nanotechnology. *Nature*. 2006; 444(16): 267-269.
15. Horie M, et al. In Vitro Evaluation of Cellular Response Induced by Manufactured Nanoparticles. *Chem. Res. Toxicol.* 2012; 25:605–619.
16. Net et al. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. *Science*. 2006; 311:622-627.
17. Lushchak VI. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*. 2011; 101:13-30.
18. Held P. An Introduction to Reactive Oxygen Species - Measurement of ROS in Cells. Vermont: BioTek Instruments, Inc.; 2015.
19. Demin OV, Kholodenko BN, Skulachev VP. A model of O₂-generation in the complex III of the electron transport chain. *Mol. Cell. Biochem.* 1998; 184:21– 33.
20. Malhotra JD, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid. Redox Signaling*. 2007; 9:2277–2293.
21. Foyer CH, Noctor G. Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxid. Redox Signaling*. 2009; 11:861–905.
22. Agnisola C. Role of nitric oxide in the control of coronary resistance in teleosts.
23. Mwaanga P, Carraway ER, van den Hurk P. The induction of biochemical changes in *Daphnia magna* by CuO and ZnO nanoparticles. *Aquatic Toxicology*. 2014; 150:201-209.
24. Livingstone DR. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 2001; 42:656– 666.
25. Aon MA, Cortassa S, Maack C, O'Rourke B. Sequential opening of mitochondrial ion channels as a function of glutathione redox thiol status. *J Biol Chem*. 2007; 282:21889-21900.
26. Stowe DF, Camara AKS. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Excitable Cells: Modulators of Mitochondrial and Cell Function. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2009; 11(6):1373-1414.
27. Dikalov S, Griendling KK, Harrison DG. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. *Hypertension*. 2007; 49:717-727.
28. Jemec A, Drobne D, Tišler T, Sepčić K. Biochemical biomarkers in environmental studies—lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environ Sci Pollut Res*. 2010; 17:571-581.
29. Kahru A, Dubourguier HC. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology*. 2010; 269:105–119.
30. Fabrega J, Luoma SN, Tyler CR, Galloway TS, Lead JR. Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environ. Int.* 2011; 37:517–531.

31. Li H, Xia H, Wang D, Tao X. Simple synthesis of monodisperse, quasi-spherical, citrate-stabilized silver nanocrystals in water. *Langmuir*. 2013; 29:5074–5079.
32. Beaty D, Kerber JD. *Concepts, Instrumentation and Techniques in Atomic Absorption Spectrophotometry*. Norwalk, CT, SAD: The Perkin-Elmer Corporation; 1993.
33. Marvern Instruments Ltd.: *Zetasizer Basic*; 1997.
34. Thermo Scientific: *Silver/Sulfide Ion Selective Electrode User Guide*; 2007.
35. Kahru A, Dubourguier HC. From ecotoxicology to nanoeco toxicology. *Toxicology*. 2010; 269(2–3):105–119.
36. Crane M, Handy RD, Garrod J, Owen R. Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. *Ecotoxicology*. 2008; 17(5):421–437.
37. Tatarazako N, Oda S. The water flea *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera) as a test species for screening and evaluation of chemical with endocrine disrupting effects on crustaceans. *Ecotoxicology*. 2007; 16(1):197–203.
38. Ślusarczyk M, Pietrzak B. To sink or float: the fate of dormant offspring is determined by maternal behaviour in *Daphnia*. *Freshwater Biology*. 2008; 53:569–576.
39. Oda S, Tatarazako N, Watanabe H, Morita M, Iguchi T. Genetic differences in the production of male neonates in *Daphnia magna* exposed to juvenile hormone analogs. *Chemosphere*. 2006; 63:1477–1484.
40. Haap T, Köhler H. Cadmium tolerance in seven *Daphnia magna* clones is associated with reduces hsp70 baseline levels and induction. *Aqua Toxicol*. 2009; 94: 131–137.
41. Tsui MTK, Wang FWX. Biokinetics and tolerance development of toxic metals in *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem*. 2007; 26(5):1023–1032.
42. Pakrashi S, Dalai S, Humayun A, Chakravarty S, Chandrasekaran N, Mukherjee A. *Ceriodaphnia dubia* as a Potential Bio-Indicator for Assessing Acute Aluminum Oxide Nanoparticle Toxicity in Fresh Water Environment. *PloS ONE*. 2013; 8(9):e74003.
43. Sheehan D. *Physical Biochemistry: Principles and Applications*. 2. izdanje. Irska: Wiley-Blackwell; 2009.
44. Šinko G, Vinković Vrček I, Goessler W, Leitinger G, Dijanošić A, Miljanić S. Alteration of cholinesterase activity as possible mechanism of silver nanoparticle toxicity. *Environ. Sci. Pollut. Res*. 2013; 21:1391–1400.
45. Hoffman A, Spetner LM, Burke M. Ramifications of a Redox Switch within a Normal Cell; its Absence in a Cancer cell. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008; 45:265–268.
46. Roth G, Valet G. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *J. Leukoc. Biol*. 1990; 47:440–411.

47. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959; 82(1):70–77.
48. Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology.* 2000; 153:83-104.
49. Jemec A, Tišler T, Drobne D, Sepčić K, Jamnik P, Roš M. Biochemical biomarkers in chronically metal-stressed daphnids. *Comp. Biochem. Physiol. part C.* 2008; 147:61–68.
50. Marklund SL, Marklund G. Involvement of the superoxide anion 574 radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 1974; 47(3):469.
51. Pakrashi S, Dalai S, Humayun A, Chakravarty S, Chandrasekaran N, Mukherjee A. *Ceriodaphnia dubia* as a potential bio-indicator for assessing acute aluminum oxide nanoparticle toxicity in fresh water environment. *PLoS ONE.* 2013; 8(9):e74003.
52. Badawy AME, Luxton TP, Silva RG, Scheckel KG, Suidan MT, Tolaymat TM. Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environmental Science & Technology.* 2010; 44:1260–1266.
53. Römer I, Gavin AJ, White TA, Merrifield RC, Chipman JK, Viant MR, Lead JR. The critical importance of defined media conditions in *Daphnia magna* nanotoxicity studies. *Toxicology Letters.* 2013; 223:103–108.
54. Römer I, White TA, Baalousha M, Chipman K, Viant MR, Lead JR. Aggregation and dispersion of silver nanoparticles in exposure media for aquatic toxicity tests. *Journal of Chromatography A.* 2011; 1218:4226–4233.
55. Lushchak VI. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology.* 2011; 101:13–30.
56. Dalai S, Pakrashi S, Chandrasekaran N, Mukherjee A. Acute toxicity of TiO₂ nanoparticles to *Ceriodaphnia dubia* under visible light and dark conditions in a freshwater system. *PLoS ONE.* 2013; 8(4):e62970.
57. Auffan MV, Rose J, Wiesner MR, Bottero JY. Chemical stability of metallic nanoparticles: a parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environ Poll.* 2009; 157:1127–1133.
58. Christian P, Von der Kammer F, Baalousha M, Hofmann T. Nanoparticles: preparation properties and behaviour in environmental media. *Ecotoxicology.* 2008; 17:326–343.
59. Choi O, Clevenger TE, Deng B, Surampalli RYL, Ross J, Hu Z. Role of sulfide and ligand strength in controlling nanosilver toxicity. *Water Res.* 2009; 43:1879–1886.

60. Bondarenko O, Juganson K, Ivask A, Kasemets K, Mortimer M, Kahru A. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. *Arch. Toxicol.* 2013; 87(7):1181–200.
61. Gaiser BK, Biswas A, Rosenkranz P, Jepson MA, Jamie R, et al. Effects of silver and cerium dioxide micro- and nano-sized particles on *Daphnia magna*. *Journal of Environmental Monitoring.* 2011; 13:1227–1235.
62. Pokhrel LR, Dubey B, Scheuerman PR. Impacts of select organic ligands on the colloidal stability, dissolution dynamics, and toxicity of silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 2013; 47(22):12877–12885.
63. Stensberg MC, Madangopal R, Yale G, Wei Q, Ochoa-Acuna H, Wei A, Mclamore ES, Rickus J, Porterfield DM, Sepúlveda MS. Silver nanoparticle-specific mitotoxicity in *Daphnia magna*. *Nanotoxicology.* 2014; 8(8):833–842.
64. Asghari S, Johari SA, Lee JH, Kim YS, Jeon YB, Choi HJ, et al. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. *J. Nanobiotechnol.* 2012; 10:14.
65. Hoheisel SM, Diamond S, Mount D. Comparison of nanosilver 616 and ionic silver toxicity in *Daphnia magna* and *Pimephales promelas*. *Environ. Toxicol. Chem.* 2012; 31:2557–2563.
66. Navarro E, Baun A, Behra R, Hartmann NB, Filser J, Miao AJ, et al. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology.* 2008; 17:372–386.
67. Allen HJ, Impellitteri CA, Macke DA, Heckman JL, Poynton HC, Lazorchak JM, Govindaswamy S, Roose DL, Nadagouda MN. Effects from filtration, capping agents, and presence/absence of food on the toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 2010; 29:2742–2750.
68. Griffitt RJ, Luo J, Gao J, Bonzongo JC, Barber DS. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environ Toxicol Chem.* 2008; 27:1972–1978.
69. Zhao CM, Wang WX. Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 2011; 30:885–892.
70. Weinberg H, Galyean A, Leopold M. Evaluating engineered nanoparticles in natural waters. *Trend. Anal. Chem.* 2011; 30:72–83.

71. Kennedy AJ, Hull MS, Bednar AJ, Goss JD, Gunter JC, Bouldin JL, Vikesland PJ, Stevens JA. Fractionating nanosilver: importance for determining toxicity to aquatic test organisms. *Environ. Sci. Technol.* 2010; 44(24):9571–9577.
72. Blinova I, Niskanen J, Kajankari P, Kanarbik L, Käkinen A, Tenh H, Penttinen OP, Kahru A. Toxicity of two types of silver nanoparticles to aquatic crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2013; 20:3456–3463.
73. Chen J, Rogers SC, Kavdia M. Analysis of kinetics of dihydroethidium fluorescence with superoxide using xanthine oxidase and hypoxanthine assay. *Ann. Biomed. Eng.* 2013; 41(2):327–337.
74. Chen X, Zhong Z, Xu Z, Chen L, Wang Y. 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein as a fluorescent probe for reactive oxygen species measurement: forty years of application and controversy. *Free Radic. Res.* 2010; 44(6):587–604.
75. Love SA, Maurer-Jones MA, Thompson JW, Lin YS, Haynes CL. Assessing nanoparticle toxicity. *Ann. Rev. Anal. Chem.* 2012; 5:181–205.
76. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, New York; 1998.
77. Barata C, Varo I, Navarro JC, Arun S, Porte C. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 2005; 140(2):175–186.
78. Mehlen P, Kretz-Remy C, Prévile X, Arrigo AP. Human hsp27, *Drosophila* hsp27 and human α B-crystallin expression-mediated increase in glutathione is essential for the protective activity of these proteins against TNF α -induced cell death. *EMBO Journal.* 1996; 15(11):2695–2706.
79. Goossens V, Grooten J, De Vos K, Fiers W. Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92:8115–8119.
80. Aebi H. *Methods of Enzymatic Analysis*. In Catalase; Bergmeyer HU Eds.; Academic Press: London 1974; 671–684.
81. Fan WH, Wang XL, Cui MM, et al. Differential oxidative stress of octahedral and cubic Cu₂O micro/nanocrystals to *Daphnia magna*. *Environmental Science and Technology.* 2012; 46:10255–10262.
82. Barata C, Markich SJ, Baird DJ, Taylor G, Soares AMVM. Genetic variability in sublethal tolerance to mixtures of cadmium and zinc in clones of *Daphnia magna* Straus. *Aqua. Toxicol.* 2002; 60:85–99.

8. SAŽETAK

Oksidativni stres u slatkovodnom račiću *Daphnia magna* nakon izlaganja nanočesticama srebra

Tea Crnković

Nanočestice srebra (nanoAg) su najzastupljenije metalne nanočestice u proizvodnji i upotrebi nanomaterijala zbog svojih katalitičkih, antimikrobnih i plazmonske svojstava. Mogu se naći u raznim proizvodima poput antimikrobnih zavoja, prevlaka za katetere i bezmirisnih tkanina za odjeću. Kao posljedica njihove široke upotrebe velika je mogućnost izlaganja okoliša nanočesticama srebra što može dovesti do toksičnih učinaka na organizme koji se u njemu nalaze. Zbog toga su nužna ekotoksikološka istraživanja novih nanomaterijala korištenjem odgovarajućih standardnih protokola na testnim organizmima. Slatkovodni račić, *Daphnia magna*, standardizirani vodeni testni organizam u toksikologiji, služio je u ovom istraživanju kao modelni organizam za ispitivanje mogućih toksičnih učinaka srebrnih nanočestica. U istraživanju su određivani biomarkeri oksidativnog stresa u *Daphnia magna* nakon izlaganja različitim koncentracijama nanočestica srebra i ionskog srebra. Praćena su četiri biomarkera: razina reduciranog glutationa (GSH), stvaranje reaktivnih kisikovih specija (ROS), te aktivnosti antioksidativnih enzima katalaze (KAT) i superoksid dismutaze (SOD). Biokemijski rezultati su pokazali da se razina ROS-a smanjila, razina GSH se povećala kao i aktivnost KAT, a aktivnost SOD-a se nije statistički značajnije promijenila u tretiranih u odnosu na kontrolne *Daphnia magna*. Iz dobivenih rezultata se vidi značajno različita toksičnost nano i ionskog oblika srebra u vodenom sustavu s pokazanom većom toksičnošću ionskog srebra. Ovaj rad jasno ukazuje na oksidativni mehanizam toksičnosti ionskog i nano oblika srebra, te da metalni nanomaterijali mogu toksično djelovati na vodene organizme.

Ključne riječi: oksidativni stres, biomarkeri, srebrne nanočestice, *Daphnia magna*, toksičnost

9. SUMMARY

Oxidative stress in freshwater crustacean *Daphnia magna* after the exposure to silver nanoparticles

Tea Crnković

Silver nanoparticles (Ag NPs) are one of the most widely used metal-based nanoparticles due to their catalytic, antimicrobial, and plasmonic properties. They can be found in many products, such as antimicrobial dressings and coatings of catheters, and odor free fabrics used in clothing. As a consequence of their widespread use, there is a great chance for environmental exposure to Ag NPs leading to possible toxic effect on living organisms. Because of that, there is a need for environmentally relevant toxicity testing using the appropriate test species. *Daphnia magna*, a standardized aquatic test organism in toxicology, was used for determining oxidative stress biomarkers induced by exposure to various concentrations of Ag NPs and Ag⁺. Four biomarkers were measured: the level of reduced glutathione (GSH), the production of reactive oxidative species (ROS), and the activities of antioxidant enzymes catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD). The biochemical results revealed decreased ROS level, increased GSH level and CAT activity, but the change in the activity of SOD was insignificant after the exposure of *D. magna* to Ag NPs. Obtained data showed significantly different toxicity of nano and ionic form of silver in the aquatic system, with Ag⁺ being more toxic. This study provided strong evidence of the antioxidative mechanism and suggested that introduced nanomaterials can significantly affect the toxicity of nanoparticles on aquatic organisms.

Keywords: oxidative stress, biomarkers, silver nanoparticles, *Daphnia magna*, toxicity

10. ŽIVOTOPIS

Tea Crnković rođena je 1. srpnja 1992. godine u Zagrebu i osnovnoškolsko obrazovanje završila je u OŠ Granešina u Zagrebu s odličnim uspjehom tijekom svih godina školovanja.

2007. godine upisuje XVI. gimnaziju u Zagrebu, dvojezični program na hrvatskom i engleskom jeziku. 2011. godine polaže *General Certificate of Education* Sveučilišta u Cambridgeu iz engleskog jezika i završava srednjoškolsko obrazovanje s odličnim uspjehom.

Iste godine polaže državnu maturu i upisuje diplomski studij medicinske biokemije Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta u Zagrebu. Sudjelovala je na Twin projektima sa Srbijom 2013. (tema projekta: Dijagnostika malignih oboljenja) i 2014. (tema projekta: Medicinski biokemičar u 21. stoljeću). Na X. Susretu mladih kemijskih inženjera (SMLKI) sudjeluje s posterskim priopćenjem na temu „Ispitivanje akutne toksičnosti nanočestica srebra na *Daphnia magna* Straus“ te na 11. Međunarodnom znanstvenom kongresu studenata biomedicinskog područja (CROSS11) „Oxidative stress response of *Daphnia magna* exposed to silver nanoparticles“. Na 1. Simpoziju studenata kemičara (SISK) održala je usmeno izlaganje na temu „Primjenjivost *in vitro* testova citotoksičnosti za procjenu bioloških utjecaja srebrnih nanočestica“.