

Fitotoksični učinci nanočestica srebra stabiliziranih različitim omotačima na fiziološke procese u odraslim biljkama duhana (*Nicotiana tabacum* L.)

Košpić, Karla

Doctoral thesis / Doktorski rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:949744>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-28**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

Karla Košpić

**FITOTOKSIČNI UČINCI NANOČESTICA
SREBRA STABILIZIRANIH RAZLIČITIM
OMOTAČIMA NA FIZIOLOŠKE PROCESSE U
ODRASLIM BILJKAMA DUHANA
(*Nicotiana tabacum* L.)**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Karla Košpić

**PHYTOTOXIC EFFECTS OF SILVER
NANOPARTICLES STABILIZED WITH
DIFFERENT COATINGS ON
PHYSIOLOGICAL PROCESSES IN ADULT
TOBACCO PLANTS
(*Nicotiana tabacum* L.)**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2023.

Ovaj je doktorski rad izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u okviru projekta Fitotoksičnost nanosrebra: mehanizmi akcije i interakcije u stanicama duhana (NanoPhytoTox), financiranog od strane Hrvatske zaklade za znanost, pod vodstvom prof. dr. sc. Biljane Balen, u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

INFORMACIJE O MENTORICI

Prof. dr. sc. Biljana Balen studij biologije, smjer molekularna biologija, na PMF-u Sveučilišta u Zagrebu završila je 1996. godine pod mentorstvom akademkinje Sibile Jelaska. Iste godine zaposlila se na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka PMF-a. Magistarski rad obranila je 2002. godine pod mentorstvom prof. dr. sc. Marijane Krsnik-Rasol, a doktorsku disertaciju izradila je pod dvojnim voditeljstvom prof. dr. sc. Jasne Peter-Katalinić sa Sveučilišta u Münsteru, Njemačka i prof. dr. sc. Marijane Krsnik-Rasol i obranila 2005. godine. U znanstveno-nastavno zvanje docent izabrana je 2007. godine, a 2013. godine u zvanje izvanredne profesorice. Od 2018. godine radi kao redovita profesorica na istoj instituciji. Usavršavala se u više navrata na znanstvenim institucijama u inozemstvu (Njemačka, Italija, Indija, Izrael). Voditeljica je i su-voditeljica kolegija Stanična i molekularna biologija, Biologija stanice i Metode istraživanja proteina na preddiplomskim studijima BO te kolegija Uvod u proteomiku na diplomskom studiju molekularne biologije, koji se svi izvode i na engleskom jeziku. Na zajedničkom diplomskom studijskom programu Bioindustrijske tehnike Sveučilišta u Orleansu i Sveučilištu u Zagrebu bila je su-voditeljica kolegija Biljno inženjerstvo, dok na doktorskom studiju izvodi nastavu iz kolegija Organizacija i funkcija stanice. Bila je voditeljica tri doktorske disertacije, 20-tak diplomskih radova, 30-tak završnih radova preddiplomskih studija te dva studentska rada nagrađena Rektorovom nagradom. Ko-autorica je jednog sveučilišnog priručnika, jednog poglavlja u knjizi Metode u molekularnoj biologiji te triju sveučilišnih skripata za praktikumsku nastavu na hrvatskom i engleskom jeziku. Bavi se istraživanjem odgovora biljaka na različite oblike abiotičkog stresa (salinitet, povišena temperatura, teški metali, nanočestice metala). Bila je voditeljica tri znanstvena projekta (HRZZ, MZOS i Sveučilište u Zagrebu), a aktivno je sudjelovala u izvedbi nekoliko domaćih i međunarodnih znanstvenih projekata. Do danas je objavila 42 rada u znanstvenim časopisima i četiri poglavlja u znanstvenim knjigama. Na domaćim i inozemnim stručnim i znanstvenim skupovima sudjelovala je s više od 70 usmenih i posterskih priopćenja. Članica je više strukovnih udruga i predsjednica Hrvatskog društva za biljnu biologiju.

Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Biljani Balen na prilici da pod njenim vodstvom izradim doktorsku disertaciju. Zahvalna sam na njenom usmjeravanju i svojoj pomoći u proteklim godinama, a posebice sam zahvalna na prijedlozima, komentarima i strpljivim ispravcima.

Zahvaljujem kolegama iz Laboratorija za elektroforezu proteina, a posebice kolegici dr. sc. Renati Biba i Brunu Komazecu koji su uvijek bili tu da pomognu i s kojima sam dijelila većinu radnog vremena, kao i ideja i komentara.

Posebice zahvaljuem kolegicama dr. sc. Petri Cvjetko, izv. prof. dr. sc. Petri Peharec Štefanić, prof. dr. sc. Mirti Tkalec, te dr. sc. Ilse-Letofsky-Papst i kolegama prof. dr. sc. Danielu Lyonsu, prof. dr. sc. Mariu Cindriću, Davidu Vondrášku i dr. sc. Danielu Hadrabi bez čije stručnosti u specifičnim područjima i metodama ne bi bilo moguće izraditi ovako multidisciplinarno istraživanje. Prof. dr. sc. Danielu Lyonsu zahvaljujem na pomoć i prenošenje znanja o sintezi i karakterizaciji AgNP, kolegici dr. sc. Petri Cvjetko zahvaljujem za pomoć pri provedbi i analizi rezultata komet testa, izv. prof. dr. sc. Petri Peharec Štefanić za snimanje i analizu TEM-mikrografija i pomoć u pripremi uzoraka za MS, te prof. dr. sc. Mariu Cindriću za snimanje MS spektara. Posebice zahvaljujem prof. dr. sc. Mirti Tkalec bez koje ispitivanje utjecaja tretmana na proces fotosinteze nebi bilo moguće.

Zahvaljujem kolegama sa Zavoda za molekularnu biologiju posebice mojim kolegama i prijateljima iz svjetlarnika dr. sc. Damjanu Mitiću i Adeli Jurković, te članovima kviz tima Pauli Gršković, dr. sc. Marinu Radovčiću i prof. dr. sc. Ivani Ivančić Baće za ugodnu radnu atmosferu, sve znanstvene i neznanstvene rasprave, sve kave i druženja bez kojih bi sve bilo puno teže.

Na posljetku zahvaljujem svojoj obitelji, mami, tati, bratu, baki, djedu i teti na bezuvjetnoj podršci tijekom cijelog studiranja.

Fitotoksični učinci nanočestica srebra stabiliziranih različitim omotačima na fiziološke procese u odraslim biljkama duhana (*Nicotiana tabacum* L.)

Karla Košpić

Zavod za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta,
Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb

Nanočestice srebra (AgNP) bilježe sve veću primjenu zbog čega su rastući ekološki problem. Kako bi se spriječila njihova agregacija i disocijacija pri sintezi im se dodaju stabilizirajući omotači koji mogu modulirati toksični učinak. U ovom radu istražen je utjecaj AgNP stabiliziranih omotačima polivinilpirolidon (PVP) i cetiltrimetilamonij bromid (CTAB) na fiziološke procese u korijenu i listu biljaka duhana. Napravljena je i usporedna analiza izlaganjem AgNO₃ i kombiniranim tretmanima AgNP ili AgNO₃ s cisteinom. Oba organa pokazala su mobilizaciju antioksidacijskog sustava koja je bila izraženija nakon tretmana s oba tipa AgNP u odnosu na AgNO₃. Jači antioksidacijski odgovor zabilježen je u listu u odnosu na korijen, s aktivacijom određenih komponenti specifičnih za biljni organ i tip omotača. Smanjenje fotosintetske učinkovitosti praćeno je smanjenom ekspresijom fotosintetskih proteina, a promjene u ekspresiji pokazali su i proteini uključeni u odgovor na stres i sintezu proteina. Cistein je ublažio učinak svih tretmana, pokazujući da toksičnost AgNP djelomično potječe od iona Ag⁺. Veća toksičnost AgNP-CTAB u usporedbi s AgNP-PVP pokazuje da fizikalno-kemijska svojstva omotača moduliraju toksične učinke.

(211 stranica / 57 slika / 9 tablica / 356 literaturnih navoda / jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: *Nicotiana tabacum*, L. nanočestice srebra, fitotoksičnost, stabilizirajući omotači, oksidacijski stres, fotosinteza, ekspresija proteina

Mentor: prof. dr. sc. Biljana Balen

Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Petra Peharec Štefanić

prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

Phytotoxic effects of silver nanoparticles stabilized with different coatings on physiological processes in adult tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.)

Karla Košpić

Division of Molecular Biology, Faculty of Science,
Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb

With increasing silver nanoparticles (AgNP) use comes a growing concern for the environment. To prevent aggregation and dissociation, stabilisers are used in their synthesis that can modulate their toxic effects. In this work, effects of AgNP stabilised with polyvinylpyrrolidone (PVP) and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) on physiological processes in roots and leaves of tobacco plants were investigated. A comparative analysis included treatments with AgNO₃ and combined treatments of AgNP or AgNO₃ with cysteine. In both organs, mobilisation of antioxidant system was more pronounced after both types of AgNP treatments compared with AgNO₃. A stronger antioxidant response was observed in leaf compared with root, while activation of specific components was organ- and coating-dependent. Reduced photosynthetic efficiency correlated with decreased expression of photosynthetic proteins, while proteins involved in stress response and protein synthesis also showed changes in expression. Cysteine attenuated effects of all treatments, suggesting that AgNP toxicity is partly due to Ag⁺ ions. The higher toxicity of AgNP-CTAB compared with AgNP-PVP suggests that coating physicochemical properties play a role in modulating the toxic effects.

(211 pages / 57 figures / 9 tables / 356 references / original in Croatian)

Keywords: *Nicotiana tabacum*, L. silver nanoparticles, phytotoxicity, stabilising coatings, oxidative stress, photosynthesis, protein expression

Supervisor: Prof. Biljana Balen, PhD

Reviewers: Assoc. prof. Petra Peharec Štefanić, PhD

Prof. Željka Vidaković-Cifrek, PhD

Prof. Daniel Mark Lyons, PhD

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Nanotehnologija i nanomaterijali	4
2.1.1. Nanočestice metala.....	5
2.1.2. Nanočestice srebra.....	5
2.1.2.1. Sinteza i stabilizacija AgNP.....	7
2.1.2.2. Stabilnost i transformacije AgNP u okolišu i eksperimentalnom mediju	9
2.2. Unos AgNP i translokacija u biljkama	11
2.3. Mehanizmi odgovora biljaka na stres uzrokovan AgNP	13
2.3.1. Pojava oksidacijskog stresa	15
2.3.2. Oksidacijsko oštećenje biomolekula	17
2.3.2.1. Oštećenje lipida.....	17
2.3.2.2. Oštećenje molekule DNA	18
2.3.2.3. Oštećenje proteina.....	18
2.3.3. Mobilizacija antioksidacijskog sustava	19
2.3.3.1. Antioksidacijski enzimi.....	19
2.3.3.2. Sustav neenzimskih antioksidansa.....	22
2.4. Istraživanje rane pojave oksidacijskog stresa <i>in situ</i>	24
2.5. Utjecaj AgNP na proces fotosinteze	25
2.6. Utjecaj AgNP na biljni proteom	28
2.7. Usporedba utjecaja AgNP i iona Ag ⁺	29
2.8. Duhan kao modelni organizam.....	30
3. MATERIJALI I METODE	32
3.1. Sinteza AgNP	32
3.2. Fizikalno-kemijska karakterizacija AgNP	32
3.2.1. UV/Vis spektrofotometrija	32
3.2.2. Određivanje distribucije veličina i naboja.....	33
3.2.3. Mjerenje koncentracije srebra u matičnim otopinama AgNP	34
3.2.4. Određivanje veličine i oblika AgNP	34
3.3. Uzgoj biljnih kultura i tretmani	34
3.4. Mjerenje stabilnosti AgNP-PVP i AgNP-CTAB u podlozi ½ MS.....	35
3.4.1. Spektrofotometrijsko određivanje stabilnosti.....	35
3.4.2. Određivanje promjene veličine i naboja.....	36
3.5. Analiza AgNP u tkivu korijena i lista duhana	36

3.5.1.	Određivanje sadržaja srebra	36
3.5.2.	Detekcija i lokalizacija AgNP	37
3.6.	Mjerenje parametara oksidacijskog stresa	38
3.6.1.	Ekstrakcija ukupnih topivih proteina u kalij-fosfatnom puferu	38
3.6.2.	Određivanje sadržaja ROS <i>in vitro</i>	38
3.6.2.1.	Fluorimetrijsko određivanje sadržaja O ₂ ⁻	38
3.6.2.2.	Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja H ₂ O ₂	39
3.6.3.	Mjerenje oštećenja biomolekula.....	39
3.6.3.1.	Mjerenje sadržaja MDA.....	39
3.6.3.2.	Mjerenje oštećenja molekule DNA komet testom	40
3.6.3.3.	Mjerenje sadržaja proteinskih karbonila	41
3.6.4.	Spektrofotometrijsko mjerenje aktivnosti antioksidacijskih enzima.....	42
3.6.4.1.	Mjerenje aktivnosti SOD	42
3.6.4.2.	Mjerenje aktivnosti CAT	43
3.6.4.3.	Mjerenje aktivnosti APX	43
3.6.4.4.	Mjerenje aktivnosti pirogalol peroksidaze (PPX).....	44
3.6.5.	Mjerenje sadržaja neenzimskih antioksidansa.....	45
3.6.5.1.	Mjerenje sadržaja prolina.....	45
3.6.5.2.	Mjerenje sadržaja GSH	46
3.6.6.	Određivanje aktivnosti različitih izoformi antioksidacijskih enzima.....	46
3.6.6.1.	Razdvajanje proteina poliakrilamidnom gel elektroforezom u nativnim uvjetima	46
3.6.6.2.	Određivanje aktivnosti izoformi antioksidacijskih enzima.....	47
3.6.7.	Analize ekspresije proteina	48
3.6.7.1.	Ekstrakcija proteina fenolom	48
3.6.7.2.	Elektroforetsko razdvajanje proteina	50
3.6.7.3.	Vizualizacija proteina bojom <i>Coomassie Brilliant Blue</i>	50
3.6.7.4.	Vizualizacija proteina srebrovim nitratom.....	51
3.6.8.	Imunodetekcija antioksidacijskih enzima	51
3.6.8.1.	SDS-PAG elektroforeza i prijenos proteina na membranu	51
3.6.8.2.	Obrada membrana antitijelima i detekcija	52
3.7.	Analiza ranog fiziološkog odgovora <i>in situ</i> i detekcija AgNP u tkivu primjenom fluorescencijske konfokalne mikroskopije	52
3.8.	Ispitivanje utjecaja AgNP na parametre fotosinteze.....	55
3.8.1.	Mjerenje fluorescencije klorofila <i>a</i>	55
3.8.2.	Određivanje sadržaja fotosintetskih pigmenata.....	56

3.8.3.	Analize ultrastrukture kloroplasta	56
3.9.	Analiza diferencijalne ekspresije proteina dvodimenzionalnom elektroforezom	56
3.9.1.	Prva dimenzija - IEF.....	57
3.9.2.	Druga dimenzija - SDS-PAGE.....	57
3.9.3.	Analiza gelova i odabir proteinskih mrlja za daljnu analizu	58
3.10.	Identifikacija proteina spektrometrijom masa.....	58
3.10.1.	Priprema uzoraka za digestiju u gelu	58
3.10.2.	Digestija proteina u gelu.....	58
3.10.3.	Ekstrakcija peptida iz gela.....	59
3.10.4.	Pročišćavanje peptida	59
3.10.5.	Analiza peptida spektrometrijom masa	60
3.10.6.	Analiza podataka i identifikacija proteina.....	61
3.11.	Statistička analiza podataka	61
4.	REZULTATI.....	62
4.1.	Svojstva matičnih suspenzija AgNP-PVP i AgNP-CTAB	62
4.1.1.	Uspješnost sinteze AgNP	62
4.1.2.	Veličina i oblik AgNP	63
4.1.3.	Veličina i naboj AgNP	64
4.2.	Stabilnosti AgNP u podlozi ½ MS	65
4.2.1.	Apsorpcijski spektri AgNP.....	65
4.2.2.	Promjena veličine i naboja AgNP	73
4.3.	AgNP u tkivu korijena i lista biljke duhana.....	75
4.3.1.	Sadržaj akumuliranog srebra	75
4.3.2.	Detekcija i lokalizacija AgNP	77
4.4.	Utjecaj AgNP na pojavu oksidacijskog stresa	79
4.4.1.1.	Korijen	79
4.4.1.2.	List	79
4.4.2.	Aktivnost antioksidacijskih enzima	82
4.4.2.1.	Korijen	84
4.4.2.2.	List	84
4.4.3.	Sadržaj neenzimskih antioksidansa	88
4.4.3.1.	Korijen	88
4.4.3.2.	List	90
4.4.4.	Detekcija izoformi antioksidacijskih enzima u gelu	92
4.4.4.1.	Korijen	92

4.4.4.2.	List	94
4.4.5.	Ekspresija antioksidacijskih enzima.....	98
4.4.5.1.	Korijen	98
4.4.5.2.	List	98
4.5.	Rani fiziološki odgovor <i>in situ</i> i detekcija AgNP u tkivu.....	101
4.5.1.	Korijen.....	103
4.5.2.	List.....	103
4.6.	Utjecaj AgNP na proces fotosinteze	108
4.6.1.	Fluorescencija klorofila <i>a</i>	111
4.6.2.	Sadržaj fotosintetskih pigmenata	113
4.6.3.	Promjene u ultrastrukturi kloroplasta	115
4.7.	Utjecaj AgNP na promjene u proteomu.....	117
4.7.1.	Promjene u proteomu korijena	117
4.7.2.	Identifikacija i kategorizacija diferencijalno eksprimiranih proteina u korijenu	121
4.7.3.	Promjene u proteomu lista.....	132
4.7.4.	Identifikacija i kategorizacija diferencijalno eksprimiranih proteina u listu....	136
5.	RASPRAVA	145
5.1.	Utjecaj fizikalno-kemijskih svojstava na stabilnost i biodostupnost AgNP.....	145
5.2.	Utjecaj stabilnosti AgNP u podlozi na unos i akumulaciju srebra	147
5.3.	Utjecaj AgNP na pojavu oksidacijskog stresa	150
5.4.	<i>In situ</i> ispitivanje ranog fiziološkog odgovora duhana na tretman s AgNP ili AgNO ₃	158
5.5.	Utjecaj AgNP na proces fotosinteze	161
5.6.	Utjecaj AgNP na promjene u proteomu.....	164
6.	ZAKLJUČAK	175
7.	POPIS LITERATURE	177
8.	ŽIVOTOPIS	205
9.	PRILOZI	207

POPIS KRATICA I SIMBOLA

AA	akrilamid
AAS	atomska apsorpcijska spektroskopija
AgNO ₃	srebrov nitrat
AgNP	nanočestice srebra
APS	amonijev peroksodisulfat
APX	askorbat peroksidaza
ATP	adenozin trifosfat
Bis	bisakrilamid
BFB	bromfenol plavo
bPEI	razgranati polietilenimin
BSA	albumin goveđeg seruma
CAT	katalaza
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue (CBB)</i>
CHAPS	3-[(3-kolamidopropil) dimetilamonijev]-2-hidroksi-1-propansulfonat
CHCA	α -cijano-4-hidroksi-cimetna kiselina
CTAB	cetiltrimetilamonijev bromid
2D-E	dvodimenzionalna elektroforeza
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DHE	dihidroetidij
DLS	dinamičko raspršenje svjetlosti
H ₂ DCF-DA	2',7'-diklorofluorescein-diacetat
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazin
deH ₂ O	destilirana voda
DTT	ditiotritol
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EDX	detektor energetske disperzivne rendgenske spektroskopije
ELS	elektroforetsko raspršenje svjetlosti
ETR	etilen-osjetljivi transkripcijski faktor
FLIM	modul za mjerenje života fluorescencije

<i>F_m</i>	maksimalna fluorescencija
<i>F_m'</i>	maksimum fluorescencije
<i>F_s</i>	fluorescencije ravnotežnog stanja
GA	polimer arapska guma
GAPDH	gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza
GR	glutation reduktaza
GSH	reducirani glutacion
HRP	peroksidaza iz hrena
ICP-MS	masena spektrometrija s induktivno spregnutom plazmom
IEF	izoelektrično fokusiranje
MALDI	matricom potpomognuta ionizacija uz desorpciju laserskim zračenjem
MAPK	mitogen aktivirane protein kinaze
MCB	monoklorobiman
MDA	malondialdehid
MS	spektometrija masa
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NBT	<i>nitroblue tetrazolium</i> (NBT)
NM	nanomaterijali
NP	nanočestice
<i>NPQ</i>	nefotokemijsko gašenje
PAGE	poliakrilamid gel elektroforeza
PBS	otopina fosfatnih soli
PEG	polietilen glikol
PI	propidij jodid
PMSF	fenilmetilsulfonil fluorid
PPX	pirogalol peroksidaza
PR proteini	proteini povezani s patogenezo
PS	fotosustav
PVP	polivinilpirolidon
<i>qP</i>	fotokemijsko gašenje
RCS	reaktivne karbonilne vrste

RNS	reaktivne dušikove vrste
RSS	reaktivne sumporne vrste
ROS	reaktivne kisikove vrste
RP-S	kolona za tekućinsku kromatografiju obrnutih faza
RuBisCo	ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza
SDS	natrijev dodecil sulfat
SOD	superoksid dismutaza
SPR	rezonancija površinskih plazmona
TBA	tiobarbituratna kiselina
TBS	Tris pufer
TCA	trikloroetena kiselina
TEM	transmisijska elektronska mikroskopija
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletildiamin
TFA	trifluoroetena kiselina
TOF	vrijeme leta
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
UV/VIS	ultraljubičasto zračenje /vidljiva svjetlost
XANES	<i>X-ray absorption near-edge structure</i>
Φ_{PSII}	Efektivni kvantni prinos PSII

UVOD

1. UVOD

Porast proizvodnje različitih nanomaterijala i njihova upotreba u industriji i proizvodima za široku potrošnju povećava zabrinutost glede njihovog utjecaja na okoliš i ljudsko zdravlje (Vance i sur. 2015). Male dimenzije nanočestica (eng. *nanoparticles*, NP), s barem jednom dimenzijom između 1 i 100 nm, rezultiraju jedinstvenim fizikalno-kemijskim svojstvima, a veliki omjer površine i volumena te velika katalitička aktivnost daju im poboljšana svojstva u usporedbi s istim tvarima makroskopskih dimenzija, koja već imaju primjene u raznim komercijalnim proizvodima. S druge strane, kompleksna veza između fizikalno-kemijskih svojstava NP i njihove biološke aktivnosti može biti uzrok njihove toksičnosti (Rico i sur. 2011; Tolaymat i sur. 2010). Među različitim NP metala, svojom primjenom posebno se ističu NP srebra (eng. *silver nanoparticles*, AgNP) koje čine gotovo 25% nanomaterijala u potrošačkim proizvodima, a zbog svojih dobro poznatih protubakterijskih i protugljivičnih svojstava rastuću primjenu nalaze u medicini, prehrambenoj industriji i poljoprivredi (Tolaymat i sur. 2010; Vance i sur. 2015). Povećano otpuštanje AgNP u okoliš rezultira njihovim transportom i bioakumulacijom u različite organizme, dok primjena u poljoprivredi, primjerice kao nanopesticida, predstavlja direktni put kontakta s biljkama koje posreduju u daljnoj biodistribuciji AgNP u hranidbeni lanac, predstavljajući tako potencijalni rizik i za ljude (Anand i Bhagat 2019; Rico i sur. 2011). Utjecaj AgNP na biljke ovisi o kombinaciji čimbenika kao što su: vrsta i starost biljke, karakteristike samih NP (veličina, oblik i naboj), stabilnost, odnosno podložnost transformaciji u eksperimentalnom mediju, te duljina i način izlaganja, dok na biološku dostupnost AgNP uvelike utječe sastav medija u kojem se odvija izlaganje (kruta ili tekuća hranjiva podloga, vodena otopina ili tlo) (Tkalec i sur. 2019). Budući da su AgNP relativno sklone kemijskim transformacijama, upotreba različitih omotača pri njihovoj sintezi štiti ih od izravnih interakcija s okolišem te smanjuje mogućnost agregacije i oksidacije elementarnog srebra (Ag^0) u ionski oblik (Ag^+). Međutim, dodatkom omotača mijenjaju se njihova fizikalno-kemijska svojstva, te njihova reaktivnost i topivost, a pokazalo se i da intrinzična svojstva omotača mogu doprinijeti toksičnosti AgNP (Biba i sur. 2022b; Ferdous i Nemmar 2020; Tkalec i sur. 2019). Suspenzije AgNP mogu se stabilizirati elektrostatičkim interakcijama primjenom anionskih i kationskih surfaktanata, najčešće citrata i cetiltrimetilamonijevog bromida (CTAB), ili steričkim interakcijama, primjenom polimernih i neionskih surfaktanata poput polivinilpirolidona (PVP) ili polietilen glikola (PEG) (Pongrac i sur. 2018). Iako su brojna istraživanja ispitivala utjecaj AgNP na biljke i uspoređivala ga s utjecajem iona Ag^+ , samo nekolicina je ispitala utjecaj različitih omotača na doprinos toksičnosti i pokazala da postoje razlike u odgovoru biljaka na AgNP stabiliziranim različitim

omotačima (Biba i sur. 2022a). Rezultati istraživanja provedenih na različitim biljnim vrstama pokazali su da je glavni mehanizam fitotoksičnosti AgNP povećano stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *reactive oxygen species*, ROS), kao što su singletni kisik ($^1\text{O}_2$), superoksidni radikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$), vodikov peroksid (H_2O_2) te hidroksilni radikal (HO^{\cdot}). Neravnoteža u oksidacijskim i antioksidacijskim procesima izaziva oksidacijski stres, uslijed kojeg dolazi do oštećenja staničnih struktura (Parvaiz i sur. 2010; Tkalec i sur. 2019; Yan i Chen, 2019). Osim poremećaja integriteta stanične membrane, do kojeg dolazi uslijed procesa lipidne peroksidacije (Suresh i sur. 2010), povećana razina ROS može izazvati oštećenja biomolekula, pri čemu oksidacijsko oštećenje molekule DNA može dovesti do promjena u diobi stanica i ekspresije gena (Levine i sur. 2017), a karbonilacija proteina do gubitka njihove funkcije (Tola i sur. 2021). Kako bi se obranile od oksidacijskog stresa, biljne stanice povećavaju aktivnost antioksidacijskih enzima i količinu neenzimskih antioksidansa koji prevode ROS u slabije reaktivne oblike i na taj način održavaju redoks homeostazu (Arora i sur. 2002; Mittler, 2017). Neki od značajnijih antioksidacijskih enzima koji sudjeluju u obrani od oksidacijskog stresa su superoksid dismutaza (SOD), koja pretvara $\text{O}_2^{\cdot-}$ u O_2 i H_2O_2 , te katalaza (eng. *catalase*, CAT) i peroksidaze, koje prevode H_2O_2 i organske perokside u molekularni kisik (O_2) i vodu (H_2O) (Parvaiz i sur. 2010). Važnu ulogu u obrani od oksidacijskog stresa imaju i neenzimski antioksidansi poput prolina i glutationa (GSH), koji zbog snažnog redukcijskog potencijala mogu izravno ukloniti ROS, ali su ujedno i prekursori u sintezi ostalih antioksidansa (de Pinto i De Gara 2004; Parvaiz i sur. 2010). Većina dosadašnjih istraživanja fitotoksičnosti AgNP provedena je na razini cijele biljke i to nakon izlaganja kroz period dovoljno dug da izazove ozbiljna oštećenja na staničnoj razini (Tkalec i sur. 2019). Međutim, malo se pažnje pridalo ispitivanju ranog fiziološkog odgovora biljke *in situ* na stres uzrokovan AgNP. Budući da su nastanak i razgradnja ROS u stanici dinamički procesi, te da su ROS relativno kratkoživuće molekule (Schmitt i sur. 2014), za njihovo praćenje u uvjetima *in vivo* mogu se koristiti probe koje iskazuju svojstvo fluorescencije uslijed interakcije s unutarstaničnim ROS (McLennan i Esposti, 2000), uz primjenu konfokalne fluorescencijske mikroskopije (Mai i sur. 2013; Ortega-Villasante i sur. 2005). Osim promjena na staničnoj razini, AgNP imaju negativne utjecaje i na fiziološkoj razini biljke, što se očituje u smanjenju sadržaja fotosintetskih pigmenata i poremećaja u fotosintezi, te smanjenju transpiracije i promjenama u koncentraciji biljnih hormona (Sun i sur. 2017; Durgesh K. Tripathi i sur. 2017; Yan i Chen 2019). Smanjenje količine fotosintetskih pigmenata uglavnom je u korelaciji sa smanjenjem intenziteta fluorescencije klorofila *a*, što ukazuje na poremećaj u transportu elektrona unutar fotosustava II (eng. *photosystem II*, PSII), a promjene u ultrastrukturi kloroplasta koje su zabilježene uslijed

izlaganja biljaka AgNP dodatno ukazuju na inhibiciju fotosintetske učinkovitosti (Biba i sur. 2021a; Tkalec i sur. 2019). Stres uzrokovan AgNP utječe i na ekspresiju određenih gena te posljedično može dovesti do promjene u sastavu proteina (Biba i sur. 2021a; Yan i Chen 2019). Malobrojne studije koje su ispitivale promjene u biljnom proteomu pokazale su da uslijed tretmana s AgNP najčešće dolazi do promjene u ekspresiji proteina uključenih u primarni metabolizam, prvenstveno onih uključenih u fotosintezu, te proteina uključenih u odgovor na stres, a kao potencijalni biomarkeri toksičnosti nanosrebra izdvojili su se antioksidacijski enzimi (Biba i sur. 2022b; Mirzajani i sur. 2014; Peharec Štefanić i sur. 2018; Vannini i sur. 2013).

Unatoč brojnim istraživanjima na temu fitotoksičnosti AgNP, mehanizam njihovog štetnog djelovanja još uvijek je nedovoljno razjašnjen. Posljedice izlaganja biljaka nanosrebru mogu se pripisati djelovanju srebra u nanočestičnom obliku, ali i oksidiranom srebru koji se s AgNP otpušta u obliku iona Ag^+ (Biba i sur. 2021b; Cvjetko i sur. 2018; Navarro i sur. 2008b; Peharec Štefanić i sur. 2019). Dodatak snažnog liganda srebra, kao što je aminokiselina cistein, tretmanima s AgNP mogao bi pomoći u razlučivanju utjecaja samih AgNP od iona Ag^+ . Naime, ako toksični učinak AgNP u većoj mjeri potječe od disociranih iona Ag^+ , cistein bi njihovim vezanjem pomogao ublažiti štetno djelovanje, što su i potvrdila neka istraživanja (Biba i sur. 2020; Gondikas i sur. 2012; Navarro i sur. 2015, 2008b). Novije studije ukazuju i na važnost omotača primijenjenog za stabilizaciju AgNP u mehanizmu toksičnosti (Barbasz i sur. 2018; Biba i sur. 2022b; Peharec Štefanić i sur. 2021). Stoga su potrebna daljnja istraživanja kako bi se što bolje razlučio utjecaj AgNP od iona Ag^+ , te ispitao utjecaj stabilizirajućih omotača na njihovu fitotoksičnost.

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati fiziološke odgovore biljaka duhana na izloženost česticama AgNP stabiliziranim omotačima PVP i CTAB, te otkriti sudjeluje li oksidacijski stres u mehanizmu toksičnosti i dolazi li prilikom izlaganja AgNP do promjena u učinkovitosti fotosinteze i sastavu proteina. Kako bi se utvrdilo jesu li karakteristike omotača jedna od odrednica toksičnosti AgNP i u kojoj mjeri toksični učinci potječu od samih AgNP u odnosu na otpuštene ione Ag^+ , provedene su i usporedne analize biljaka tretiranih s AgNP ili AgNO_3 u kombinaciji s cisteinom. Hipoteza istraživanja bila je da AgNP stabilizirane različitim omotačima u različitoj mjeri, a potencijalno i različitim mehanizmima, izazivaju fitotoksičnost, koja je barem djelomično posljedica otpuštanja iona Ag^+ , ali i karakteristika djelovanja samih omotača.

LITERATURNI PREGLED

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Nanotehnologija i nanomaterijali

Nanoznanost je relativno nova grana znanosti koja se bavi istraživanjem jedinstvenih svojstava materijala čije su dimenzije manje od 100 nm (Sim i Wong 2021), dok se termin nanotehnologija koristi za primjenu tih istraživanja u svrhu razvijanja, sinteze, karakterizacije i primjene takvih materijala s ciljem izrade novih materijala, uređaja ili sustava s poboljšanim svojstvima (Kalkidan Mamo i sur. 2021; Kolahalam i sur. 2019; Sim i Wong 2021). Nanotehnologija je multidisciplinarna znanost koja obuhvaća područja kemije, biologije i fizike, a primjenu pronalazi u gotovo svim granama znanosti i tehnologije (Kolahalam i sur. 2019). Nanomaterijali (NM) zbog svojih malih dimenzija, a velikog omjera površine i volumena, iskazuju jedinstvena optička, električna i magnetska svojstva, zbog čega iskazuju poboljšane fizikalno-kemijske karakteristike u odnosu na iste materijale čije dimenzije odgovaraju makroskali (Kolahalam i sur. 2019; Sim i Wong 2021). NM imaju barem jednu dimenziju unutar nanoskale (između 1 i 100 nm), a mogu biti različitih oblika, veličina i dimenzija; nula-dimenzionalni NM imaju sve tri dimenzije unutar nanoskale i nazivaju se nanočestice (eng. *nanoparticles*, NP) (Wang i sur. 2020); jedno-dimenzionalni, nanoštapići ili nanocjevčice, imaju jednu dimenziju veću od 100 nm; dok se dvo-dimenzionalni, s dvije dimenzije veće od 100 nm, nazivaju filmovi ili listovi (Kolahalam i sur. 2019). Prema načinu postanka, NM mogu biti: prirodni, nastali putem biogeokemijskih procesa na Zemlji poput vulkanskih erupcija i trošenja stijena (Shalan i sur. 2019). Antropogeni NM, nastali su djelovanjem čovjeka, najčešće izgaranjem fosilnih goriva (Barhoum i sur. 2022) dok su sintetski, nastali umjetnim putem (Albalawi i sur. 2021).

Ne postoji jedinstvena definicija NM, no legislative Europske Unije (EU) i Sjedinjenih Američkih Država (SAD) daju donekle slična objašnjenja. Prema Europskoj komisiji, NM su prirodni ili proizvedeni materijali koji su sačinjeni od nevezanih, agregiranih ili aglomeriranih čestica dimenzija između 1 i 100 nm. Slično objašnjenje daju i Američka agencija za zaštitu okoliša (*U.S. Environmental Protection Agency*, EPA) i Američka agencija za hranu i lijekove (*U.S. Food and Drug Administration*, FDA), dok Međunarodna organizacija za standardizaciju (*International Organization for Standardization*, ISO) opisuje NM kao materijale s bilo kojom vanjskom dimenzijom ili unutarnjom površinskom strukturom dimenzija na nanoskali (Jeevanandam i sur. 2018). U 2014. godini na tržištu je zabilježeno oko 1814 potrošačkih proizvoda koji sadrže NM, a komercijalno su dostupni u preko 20 zemalja, od čega je čak 37% proizvoda sadržavalo NP metala ili metalnih oksida (Vance i sur. 2015).

2.1.1. Nanočestice metala

Prvi znanstveni zapis o sintezi NP metala datira iz 1857. godine, kada je M. Faraday objavio postupak sinteze koloidne otopine nanočestica zlata (AuNP), pritom otkrivši da AuNP imaju različita optička svojstva u odnosu na ishodišnu otopinu. Danas je poznato da NP metala imaju značajno poboljšana svojstva u odnosu na ishodišne materijale u vidu veće izdržljivosti, provodljivosti i čvrstoće, a osim toga mogu rezultirati i nekim novim korisnim svojstvima, poput protumikrobnih i krioprotekcijskih (Jeevanandam i sur. 2018).

NP metala uglavnom se dobivaju kemijskim ili fotokemijskim metodama iz otopina metalnih soli koje sadrže dvovalentne ili trovalentne ione metala. Primjenom reducirajućih agensa, ioni metala reduciraju u nenabijeni oblik te formiraju NP, koje imaju veliku površinu i mogućnost vezanja manjih molekula (Kolahalam i sur. 2019). Danas, najveću primjenu imaju NP titanijevog dioksida (TiO₂NP), srebra (AgNP), cinkovog oksida (ZnONP), cerijevog dioksida (CeO₂NP) i silicijevog dioksida (SiO₂NP), a implementirane su u kozmetičke i farmaceutske proizvode, elektroničke uređaje, herbicide i razne aditive u prehrambenoj industriji. Primjerice, godišnje se proizvede približno 3000 tona TiO₂NP, od čega je preko 50% primijenjeno u proizvodima za osobnu njegu poput krema za sunčanje. Sličnu primjenu u kozmetičkim preparatima imaju i ZnONP, koji se osim toga dodaju i u razne boje i lakove. Nadalje, jedinstvena magnetska, katalitička i optička svojstva cerija (Ce), koja su poboljšana kad je primijenjen u obliku NP, razlog su primjene CeO₂NP u tehnologiji poliranja, gorivnim člancima, kozmetičkim pripravcima i raznim drugim proizvodima (Ma i sur. 2015). Jedinstvena svojstva SiO₂NP poput kemijske inertnosti, toplinske stabilnosti i kontroliranog poroziteta, razlog su njihove primjene u prehrambenoj tehnologiji, obradi otpadnih voda, pretvorbi i pohrani energije te biomedicinskim uređajima i isporuci lijekova (Nayl i sur. 2022). Ipak, jedan od najzastupljenijih i najbolje istraženih NP su AgNP, s udjelom od preko 25% na globalnom tržištu NM (Vance i sur. 2015).

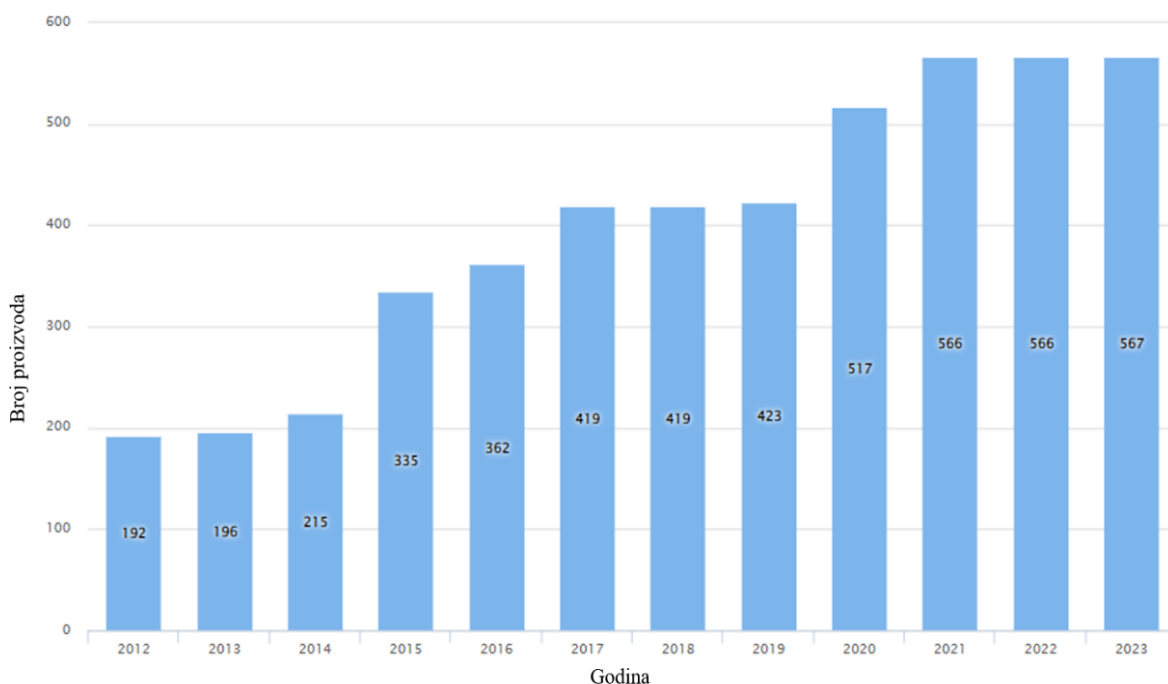
2.1.2. Nanočestice srebra

Srebro se već tisućama godina koristi za dezinfekciju i u medicinske svrhe, još otkad je njegova protumikrobna svojstva prvi opisao Hipokrat 400. godina pr. Kr. (Owens, 2013; Tolaymat i sur. 2010), no srebro u obliku NP otkriveno je mnogo kasnije. Prvi zabilježen zapis o sintezi AgNP datira iz 1889. godine, kad je M.C. Lea sintetizirao AgNP stabilizirane citratom, što je ujedno i prvi spomen stabilizacije AgNP upotrebom druge kemikalije kao omotača (Lea, 1889). Godine 1897. na tržište je izašao proizvod komercijalnog naziva "Collargol" koji sadrži

AgNP stabilizirane proteinima, a koristi se kao antiseptik (Nowack i sur. 2011), dok je 2003. godine Samsung predstavio novu protubakterijsku tehnologiju „Silver Nano™“, koju je implementirao u klima uređaje, hladnjake, perilice rublja te usisavače, a temelji se na protumikrobnim svojstvima AgNP (Jeevanandam i sur. 2018).

Upravo zbog dobro poznatih protubakterijskih i protugljivičnih svojstava srebra, te povećane reaktivnosti kada se nalazi u obliku NP, AgNP danas pronalaze sve veću implementaciju u raznim potrošačkim proizvodima, pakiranjima hrane i lijekova, tekstilu (posebno sportskoj odjeći), dezinfekcijskim sredstvima, igračkama, kućanskim aparatima, kozmetici, medicinskim proizvodima (zavoji, kateteri, kirurški pribor) (Bruna i sur. 2021; Ferdous i Nemmar 2020; Yan i Chen 2019). U medicini, AgNP se primjenjuju i za ciljano i kontrolirano usmjeravanje lijekova (Bruna i sur. 2021), te u dijagnostici za označavanje i snimanje stanica tumora (Takáč i sur. 2023). Nadalje, AgNP primjenu nalaze i u elektroničkim uređajima te tretmanima za obradu otpadnih voda zbog svoje dobre električne vodljivosti i fotokemijskih svojstava. U poljoprivredi, AgNP se primjenjuju u nanopesticidima i nanofungicidima te kao stimulatori rasta i sazrijevanja plodova, što predstavlja direktan put za unos AgNP u biljke koje posreduju u daljnoj biodistribuciji AgNP u hranidbeni lanac, predstavljajući tako potencijalni rizik i za ljude (Rico i sur. 2011; Yan i Chen 2019).

Procjena je da se godišnje proizvede oko 320 tona AgNP (Gherasim i sur. 2020; Siddiqi i sur. 2018), koji su kao aktivne komponente prisutni u preko 560 proizvoda (Slika 1.) (The Nanodatabase, pristupljeno 21.03.2023.). Zbog rastuće proizvodnje i implementacije AgNP raste i problem zagađenja kao posljedice njihovog otpuštanja u okoliš. Koncentracija ukupnog srebra u različitim ekosustavima procijenjena je na razine ng L^{-1} u vodenom okolišu te mg L^{-1} u tlu i sedimentima (Blaser i sur. 2008). Matematičkim modeliranjem dobivene su procjene koncentracija AgNP u površinskim vodama koje za SAD iznose između 0,09 i 0,43 ng L^{-1} , dok su za Europu vrijednosti između 0,59 i 2,16 ng L^{-1} (Blaser i sur. 2008; Gottschalk i sur. 2009; Nowack i sur. 2011).

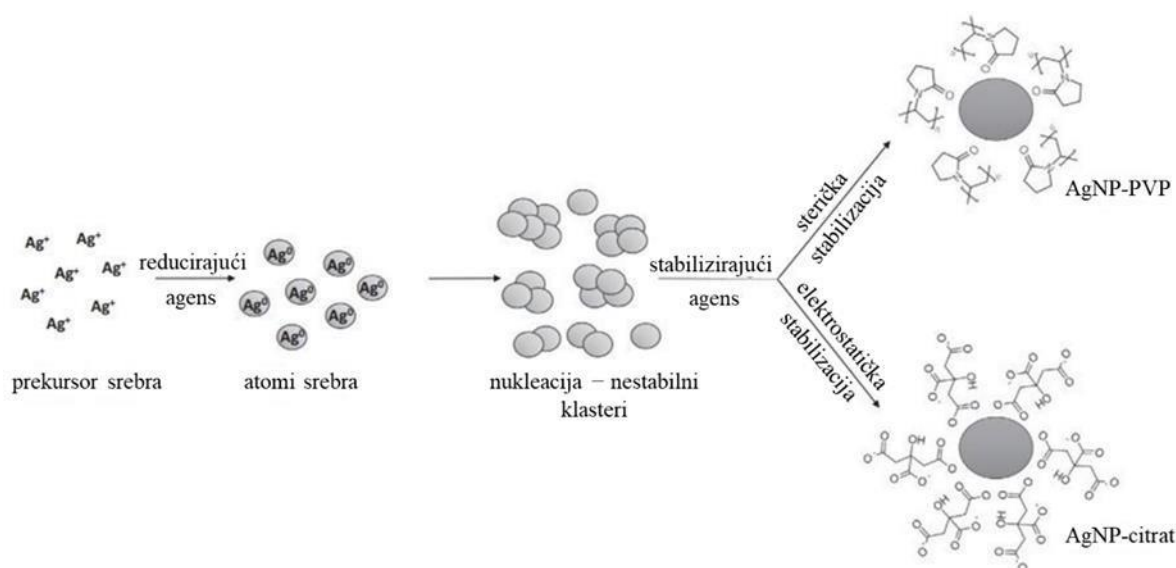


Slika 1. Porast upotrebe AgNP u proizvodima široke potrošnje na globalnom tržištu u razdoblju od 2012. do 2023. godine. Preuzeto i prilagođeno s <https://nanodb.dk/en/analysis/consumer-products/#chartHashsection>.

2.1.2.1. Sinteza i stabilizacija AgNP

Distribucija veličina AgNP te morfologija u najvećoj su mjeri odrednice njihovih fizikalno-kemijskih svojstava, a na iste je moguće utjecati moduliranjem brzine miješanja, temperature, vrijednosti pH i izbora reducensa tijekom sinteze (Vega-Baudrit i sur. 2019). Među sintetskim postupcima dobivanja AgNP razlikujemo fizikalne, biološke i kemijske metode. Fizikalne metode uključuju postupke poput pirolize ili električnog pražnjenja, dok biološke obuhvaćaju primjenu mikroorganizama ili viših organizama poput biljaka koje djelovanjem alkaloida, terpena i fenola reduciraju ione Ag^+ iz otopina srebrovih soli, primjerice srebrovog nitrata (AgNO_3), srebrovog klorida (AgCl) ili srebrovog sulfida (Ag_2S) (Xu i sur. 2020). Najčešće se za sintezu AgNP primjenjuju kemijske metode koje se temelje na redukciji otopina srebrovih soli primjenom odgovarajućeg kemijskog reducirajućeg agensa (Slika 2.), a moguća je, iako rjeđa, i primjena elektrokemijskih ili fotokemijskih postupaka redukcije (Behra i sur. 2013). Atomi Ag^0 , dobiveni redukcijom iona Ag^+ , međusobno stupaju u interakcije formirajući klastere u procesu koji nazivamo nukleacija (Slika 2.). Aglomerirane čestice rastu dok ne dostignu kritični promjer pri kojem su NP najstabilnije, dok na brzinu procesa te veličinu i oblik čestica utječu temperatura, vrijednost pH i koncentracija ishodišne otopine te reducirajuća jakost primijenjenog reducensa (Vega-Baudrit i sur. 2019). Jača reducirajuća

sredstva poput natrijevog borhidrida (NaBH_4) ili hidrazin hidrata ($\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$) rezultiraju sintezom čestica manjeg promjera, dok slabiji reducenski poput askorbinske kiseline ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) i trinatrijevog citrata ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) uvjetuju sintezu većih čestica (Chen i Schluesener, 2008; Vega-Baudrit i sur. 2019). Dodatak stabilizirajućeg agensa tijekom sinteze sprječava daljnji rast i aglomeraciju AgNP te ih štiti od izravnih kontakata s okolišem i time sprječava oksidaciju u ione Ag^+ ili adsorpciju makromolekula (Lee i Jun 2019; Vega-Baudrit i sur. 2019). Odabir omotača ovisi o primjeni za koju se AgNP sintetiziraju, budući da se vezanjem omotača mijenjaju njihova fizikalno-kemijska svojstva, reaktivnost i topivost, a dosadašnja istraživanja pokazuju da intrinzična svojstva omotača mogu modulirati toksičnost AgNP (Biba i sur. 2022a; Ferdous i Nemmar 2020).



Slika 2. Shematski prikaz sinteze AgNP kemijskom metodom i primjenom steričke (PVP kao stabilizirajući agens, AgNP-PVP) ili elektrostatske (citrata kao stabilizirajući agens, AgNP-citrat) stabilizacije. Preuzeto i prilagođeno prema Biba i sur. (2021).

Stabilizacija AgNP uglavnom se temelji na adsorpciji ili kovalentnom vezanju organskih spojeva elektrostatskim, steričkim ili elektrosteričkim interakcijama između AgNP i omotača (Slika 2.). Elektrostatska stabilizacija postiže se vezanjem kationskih ili anionskih surfaktanata, čije nabijene ionske skupine stvaraju električni dvosloj na površini NP. AgNP su stabilizirane kada naboj odbojnih elektrostatskih sila nadjača Van der Waalsove privlačne sile između čestica (De Leersnyder i sur. 2019; Levard i sur. 2012). Primjer elektrostatskih omotača su negativno nabijeni $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ i natrijev dodecil sulfat (eng. *sodium dodecyl sulfat*, SDS) te pozitivno nabijeni CTAB i didecildimetilamonijev bromid (DDAB) (Biba i sur. 2021a). Sterička stabilizacija postiže se vezanjem polimernih nenabijenih makromolekula na površinu

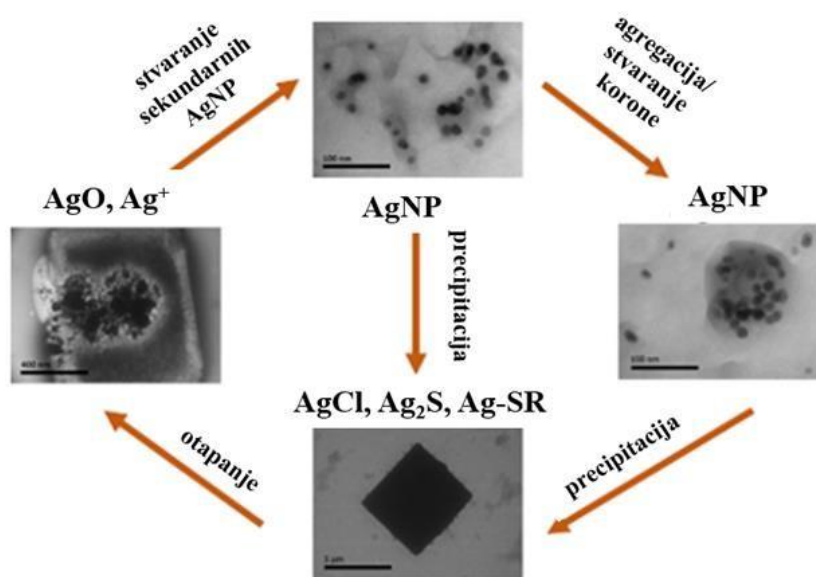
NP, pri čemu se stvaraju steričke odbojne sile koje umanjuju interakciju između NP i sprječavaju agregaciju. Kao sterički omotač najčešće se koristi PVP zbog kemijske inertnosti, hidrofilnosti i netoksičnosti, a osim njega primjenjuju se i polimerni alkoholi poput polivinil alkohola (PVA) i polietilen glikola (PEG) te arapska guma (eng. *gum arabic*, GA), prirodni polisaharidni polimer (De Leersnyder i sur. 2019; Koczur i sur. 2015; Sharma i sur. 2014). Polimerne makromolekule s nabijenim skupinama (polielektroliti), kao što je razgranati polietilen imin (eng. *branched polyethylenimine*, BPEI), omogućuju hibridni mehanizam stabilizacije putem elektrosteričkih odbojnih sila (De Leersnyder i sur. 2019).

2.1.2.2. Stabilnost i transformacije AgNP u okolišu i eksperimentalnom mediju

Porast proizvodnje i upotrebe AgNP rezultira njihovim nereguliranim otpuštanjem u vodeni i kopneni okoliš različitim putevima, bilo prilikom sinteze i ugradnje u proizvode ili rukovanja, recikliranja i odlaganja istih, zbog čega raste zabrinutost glede utjecaja AgNP na okoliš (McGillicuddy i sur. 2017; Yan i Chen 2019). Pri procjeni potencijalnog rizika koje AgNP predstavljaju za okoliš i žive organizme, važno je uzeti u obzir njihovu podložnost transformacijama u okolišu koje im modificiraju svojstva (Levard i sur. 2012; Yu i sur. 2013).

Dosadašnja istraživanja pokazala su da su nakon ispuštanja u okoliš AgNP podložne različitim kemijskim i fizikalnim transformacijama poput agregacije, te oksidacije i otpuštanja iona Ag^+ , a mogu i reagirati sa sulfidima, kloridima i organskim spojevima (Slika 3.) (Levard i sur. 2012, 2011) te adsorbirati različite polimere i proteine (Behra i sur. 2013; Sharma i sur. 2014). Modifikacije AgNP mogu imati velik utjecaj na njihova ishodišna svojstva te time utjecati na njihovu biodostupnost, reaktivnost i toksičnost (Reidy i sur. 2013). Nadalje, intrinzična svojstva omotača, kao što su čistoća, površinska napetost, konformacija, kemijska struktura i molekulska masa, također utječu na stabilizaciju AgNP kao i na njihovo ponašanje i transformacije u okolišu (Levard i sur. 2012). Biološki sustavi imaju kompleksan kemijski sastav jer se sastoje od različitih organskih i anorganskih tvari, zbog čega mogu imati različite ionske jakosti i vrijednosti pH. Velika ionska jakost okoliša destabilizira AgNP, uzrokujući njihovu povećanu agregaciju koja može smanjiti ishodišnu koncentraciju AgNP te na taj način smanjiti njihovu biodostupnost, što posljedično može spriječiti toksični učinak AgNP (Levard i sur. 2012; Reidy i sur. 2013). Osim toga, oksidacija AgNP i otpuštanje iona Ag^+ može dovesti do kompleksacije s ionima iz otopine, prvenstveno kloridnim (Cl^-), sulfidnim (S^{2-}) ili nitratnim (NO_3^{2-}) ionima, ili do stvaranja sekundarnih AgNP (Slika 3.) koje nastaju kemijskom ili foto-induciranom redukcijom (Biba i sur. 2021a). Brzina otpuštanja iona Ag^+ veća je za manje čestice AgNP bez

omotača u mediju bogatom molekulama koje mogu kompleksirati otpuštene ione Ag^+ (Muraleetharan i sur. 2019).



Slika 3. Shematski prikaz transformacija koje AgNP prolaze nakon otpuštanja u okoliš. AgO – srebrni oksid, Ag⁺ – ioni srebra, AgCl – srebrni klorid, Ag₂S – srebrni sulfid, Ag-SR – srebrni tiolati. Preuzeto i prilagođeno prema Pem i sur. (2021).

AgNP bez omotača imaju negativan naboj u rasponu vrijednosti pH koje su uobičajene u okolišu (pH 3 do 9) (El Badawy i sur. 2011), međutim prisutnost iona suprotnog naboja u hranjivoj podlozi ili tlu smanjuje odbojne sile između AgNP i promovira njihovu agregaciju. U istraživanjima utjecaja AgNP na biljke u uvjetima *in vitro*, kao medij za izlaganje biljaka uobičajeno se koriste voda ili tekuće hranjive podloge. AgNP su relativno stabilne u deioniziranoj i ultra-čistoj vodi kroz duži vremenski period (Cañamares i sur. 2008; Capjak i sur. 2018), a iz literature je poznato da je brzina otpuštanja iona Ag^+ u vodi puno manja nego u hranjivoj podlozi (Sharma i sur. 2014; Zook i sur. 2011). Međutim, sama voda bez dodatka hranjivih tvari nije prikladna za uzgoj biljaka i ne predstavlja realan biološki sustav, stoga se analizom stabilnosti AgNP u takvom mediju ne mogu dobiti stvarni podaci o njihovom ponašanju u okolišu. S druge strane, hranjive podloge za uzgoj biljaka u kontroliranim laboratorijskim uvjetima su kompleksne smjese tvari različitih vrijednosti pH i ionskih jakosti te predstavljaju vrlo složene sustave za analizu stabilnosti AgNP i njihove transformacije. Posebice su izazovne krute hranjive podloge, zbog mogućnosti enkapsuliranja AgNP, te tlo, zbog svog kompleksnog sastava, a dodatni problem predstavlja to što trenutno nema dostupnih metoda za analizu stabilnosti AgNP u ovakvim sustavima (Biba i sur. 2021a).

Istraživanja stabilnosti AgNP bez omotača u različitim medijima za uzgoj biljaka pokazala su njihovu značajno veću aglomeraciju i otpuštanje iona Ag^+ u tekućim hranjivim podlogama (Nair i Chung 2014a; Thwala i sur. 2013) i pjeskovitom tlu (Dimkpa i sur. 2013) u odnosu na tretmane u vodi (Barrena i sur. 2009; Patlolla i sur. 2012). Ispitivanja stabilnosti AgNP stabiliziranih omotačima pokazala su da su AgNP s negativno nabijenim omotačem od citrata (AgNP-citrat) izrazito stabilne u vodovodnoj vodi (Pokhrel i Dubey 2013), a nestabilne u medijima veće ionske jakosti, kao što su hranjive podloge za uzgoj biljaka u kulturi tkiva. Primjerice, značajno povećanje hidrodinamičkog promjera (d_H , definira veličinu čestica) AgNP-citrat primijećeno je u tekućoj hranjivoj podlozi Murashige i Skoog (MS; Murashige i Skoog 1962) (Ke i sur. 2018; Peharec Štefanić i sur. 2021) i Hoaglandovoj podlozi (Hoagland i Arnon, 1950) s $\frac{1}{4}$ koncentracije makroelemenata (Geisler-Lee i sur. 2013), što ukazuje na njihovu agregaciju. Slično ponašanje pokazale su i AgNP stabilizirane s pozitivno nabijenim surfaktantom CTAB (AgNP-CTAB), koje su visoku stabilnost imale u ultra-čistoj vodi (Cvjetko i sur. 2017), dok je u tekućoj podlozi MS s polovičnom koncentracijom makroelemenata ($\frac{1}{2}$ MS) došlo do značajne promjene naboja koja je dovela do brze aglomeracije čestica (Peharec Štefanić i sur. 2021). S druge strane, AgNP stabilizirane steričkim interakcijama pokazale su se stabilnima i u ultra-čistoj vodi (Cvjetko i sur. 2017) i u hranjivim podlogama različitih ionskih jakosti. Primjerice, Jiang i sur. (2017) pokazali su da Hoaglandova tekuća podloga s 10% koncentracije makroelemenata nije imala utjecaj na oblik i veličinu AgNP-PVP, a sličan rezultat dobiven je i u Hutnerovoj tekućoj podlozi (Hutner i sur. 1950) s polovičnom koncentracijom makroelemenata (Stegemeier i sur. 2017). Yang i sur. (2019) pokazali su da ioni Cl^- iz hranjive podloge mogu dodatno stabilizirati AgNP-PVP povećavajući ukupni negativni naboj čestica, čime se povećava njihova disperzija. Nadalje, interakcije AgNP sa složenim organskim makromolekulama poput nukleinskih kiselina, proteina i lipida, prisutnih u biološkom mediju, mogu dovesti do stvaranja tzv. korone na površini AgNP (Slika 3.). Stvaranje takvog omotača utječe na naboj AgNP, a ovisno o intrinzičnim svojstvima može djelovati stabilizirajuće ili dovesti do povećane agregacije čestica ili otpuštanja iona Ag^+ (Biba i sur. 2022a).

2.2. Unos AgNP i translokacija u biljkama

Unos AgNP u biljke već je potvrđen u velikom broju istraživanja (Yan i Chen 2019), međutim još uvijek je nejasno njihovo ponašanje i sudbina nakon ulaska (Biba i sur. 2021a). Istraživanja su pokazala da je glavni put ulaska AgNP u biljku kroz pore stanične stijenke epidermalnih stanica korijena, no ako su aplicirane folijarno, AgNP mogu ući u biljku kroz puči i kutikulu. Ipak, veći broj istraživanja ispitivao je unos AgNP putem korijena, a rezultati su

pokazali da unos uvelike ovisi o veličini i obliku čestica te primijenjenoj koncentraciji, a pokazalo se i da AgNP uglavnom ostaju vezane na površinu korijena ili u stanicama korijena, dok se samo u manjoj mjeri translociraju do udaljenijih organa poput izdanaka i listova (Tkalec i sur. 2019).

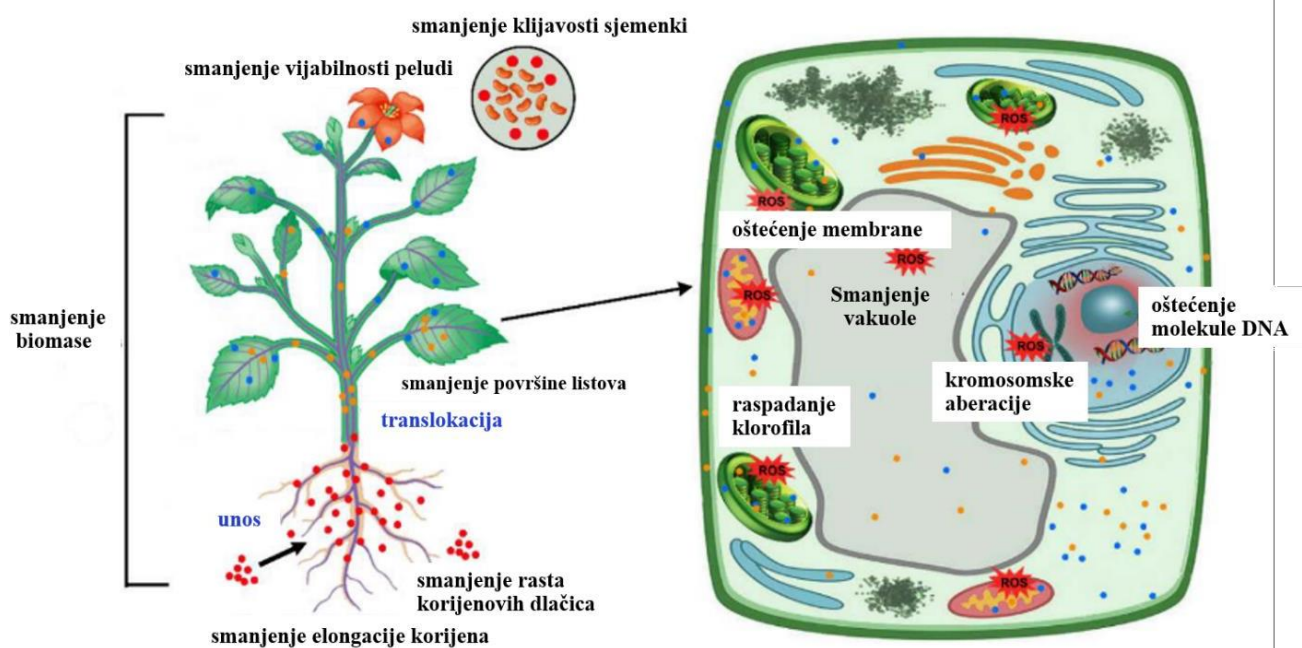
Osim karakteristika samih AgNP i kemijskog sastava medija u kojem se nalaze, na njihovu biodostupnost utječe i sastav rizosfere. Naime, eksudati korijena mogu imati kelatorska svojstva, odnosno, mogu vezati srebro i time smanjiti njegovu dostupnost, a s druge strane mogu potaknuti i redoks promjene koje uzrokuju agregaciju ili disocijaciju AgNP (Lv i sur. 2019; Viehweger, 2014). Yin i sur. (2011) po prvi puta su otkrili djelomično oksidirane oblike srebra u korijenu vrste *Lolium multiflorum* nakon tretmana s AgNP i postavili dvije hipoteze kao moguća objašnjenja: (i) direktan unos AgNP kroz korijen i oksidacija unutar stanica korijena, ili (ii) disocijacija AgNP u blizini površine korijena te unos disociranih iona Ag^+ u stanice korijena. AgNP moraju proći kroz staničnu stijenku i staničnu membranu epidermalnih stanica korijena kako bi ušle u vaskularno tkivo i transportirale se do udaljenijih organa. Stanična stijenka biljaka građena je od kompleksne mreže ugljikohidrata i proteina koja djeluje kao prepreka i molekularno sito. Sastoji se od pora promjera u prosjeku 3-8 nm, kroz koje manje AgNP mogu proći i ući u staničnu membranu zajedno s unosom vode i drugih otopljenih tvari (Khanna i sur. 2021; Ma i sur. 2015, 2010; Navarro i sur. 2008a; Tripathi i sur. 2017; Yin i sur. 2011). Iako sam mehanizam još nije dovoljno razjašnjen, pretpostavka je da ulazak AgNP manjih dimenzija može uzrokovati oštećenja stanične stijenke i inducirati stvaranje novih, većih pora što omogućava prolaz AgNP većih od 5 nm (Navarro i sur. 2008a). Nadalje, AgNP se mogu transportirati kroz stanicu putem plazmodezmija čije su pore promjera 50-60 nm (Concenço i Galon 2011), a koje spajaju susjedne biljne stanice i omogućavaju im komunikaciju i transport tvari (Yan i Chen 2019). U vrsti *Arabidopsis thaliana* zabilježeno je nakupljanje AgNP u plazmodezmijama i u staničnoj stijenci (Geisler-Lee i sur. 2013), što može uzrokovati smetnje u međustaničnoj komunikaciji i transportu hranjivih tvari (Yan i Chen 2019). Nakon prolaska kroz staničnu stijenku, AgNP mogu proći kroz lipidni dvosloj stanične membrane pomoću integralnih transportnih proteina ili putem ionskih kanala (Mueller i Nowack 2008), primarno putem transportera za ione bakra (Cu^+), budući da ioni Ag^+ nose isti naboj kao ioni Cu^+ (Behra i sur. 2013). Drugi potencijalni način unosa je putem endocitoze, što podrazumijeva stvaranje vezikule koja obavlja NP, odvaja se od stanične membrane i unosi AgNP u stanicu (Navarro i sur. 2008a).

Nakon unosa u korijen, AgNP se kroz stabljiku translociraju do udaljenijih organa, uglavnom kroz izvanstanične prostore putem apoplasta, dok ne prodru u vaskularno tkivo kojim se onda mogu transportirati do listova i plodova (Geisler-Lee i sur. 2014; Tkalec i sur. 2019). Bao i sur. (2016) su u poprečnim presjecima korijena biljke *A. thaliana* izložene AgNP veličine 10 nm uočili pojedinačne AgNP u stanicama, ali i nakupine njihovih agregata duž stanične stijenke, središnje lamele, izvanstaničnog prostora i u vakuoli. Međutim, većina istraživanja pokazala je da je transport do nadzemnih organa ograničen i da AgNP uglavnom ostaju akumulirane u korijenu (Kaveh i sur. 2013; Vishwakarma i sur. 2017; Yang i sur. 2019).

2.3. Mehanizmi odgovora biljaka na stres uzrokovan AgNP

Biljke su kao primarni proizvođači vitalan dio svakog ekosustava, zbog čega igraju ključnu ulogu u akumulaciji i biodistribuciji različitih tvari iz okoliša. Budući da su sesilni organizmi, biljke će neizbježno stupiti u interakciju s AgNP iz kontaminirane vode ili tla te na taj način predstavljaju potencijalni put prijenosa AgNP u hranidbeni lanac i neposredno utječu na ljudsko zdravlje (Dietz i Herth 2011; Rico i sur. 2011; Yan i Chen 2019). Različite biljne vrste razvile su različite mehanizme prilagodbe na stres uzrokovan metalnim NP. Prvi korak obrane je strategija izbjegavanja koja se temelji na ograničavanju unosa metala iz tla ili njegovom isključivanju, odnosno sprječavanju ulaska u korijen (Viehweger, 2014). Ovaj način obrane uključuje imobilizaciju metala mikoriznom asocijacijom, sekvestraciju metala ili kompleksaciju s organskim tvarima koje izlučuje korijen (Emamverdian i sur. 2015). Ukoliko metali ipak uđu u biljke, aktiviraju se mehanizmi detoksikacije, pri čemu biljke primarno pokušavaju razviti toleranciju putem aktivnog izbacivanja ili kompartmentalizacije metala, pretežno u vakuoli (Patra i sur. 2004). Drugi način je vezanje metala na staničnu stijenku ili ometanja prijenosa iona metala kroz staničnu membranu. Osim toga, aktivira se sinteza i/ili akumulacija osmolita i osmoprotektanata poput prolina te proteina fitokelatina i metalotioneina, koji keliraju ione metala i pomažu njihovo izlučivanje. Ukoliko se sve navedene mjere pokažu neuspješne i biljka se više ne može nositi sa stresnim uvjetima, aktivira se antioksidacijski sustav kao odgovor na povećanu razinu slobodnih radikala, kako bi se spriječila pojava oksidacijskog stresa i oštećenja na staničnoj razini (Biba i sur. 2022a; Emamverdian i sur. 2015; Tkalec i sur. 2019).

Do sada su na različitim biljnim vrstama zabilježeni uglavnom negativni učinci AgNP na klijanje, rast, morfologiju i fiziologiju (Slika 4.). Pokazalo se da izlaganje biljaka AgNP uzrokuje smanjenje klijavosti sjemenki, inhibiciju rasta korijena i izdanka te smanjenje vijabilnosti peludi, površine listova i biljne biomase (Dimkpa i sur. 2013; Jiang i sur. 2012; Kaveh i sur. 2013; Nair i Chung 2014a; Stampoulis i sur. 2009). Na fiziološkoj razini, AgNP mogu izazvati smanjenje unosa vode i nutrijenata (Zuverza-Mena i sur. 2016), sadržaja klorofila (Qian i sur. 2013; Song i sur. 2013) i transpiracije (Musante i White 2012), te promjene u koncentraciji biljnih hormona (Sun i sur. 2017). Na staničnoj i molekularnoj razini, AgNP mogu uzrokovati promjene u staničnim strukturama, primjerice oštećenja stanične stijenke, smanjenje vakuole ili promjene u ultrastrukturi kloroplasta (Peharec Štefanić i sur. 2021; Pokhrel i Dubey 2013; Yin i sur. 2011). Nadalje, AgNP mogu izazvati poremećaje u diobi stanica, smanjenje mitotskog indeksa i pojavu kromosomskih aberacija (Kumari i sur. 2009; Patlolla i sur. 2012). Ipak, kao glavni mehanizam fitotoksičnosti AgNP navode se oksidacijska oštećenja biomolekula (lipida, proteina i molekule DNA), koje nastaju kao posljedica povećanog stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta (eng. *reactive oxygen species*, ROS) ili njihovog neučinkovitog uklanjanja (Tkalec i sur. 2019; Yan i Chen 2019).



Slika 4. Shematski prikaz unosa, translokacije i glavnih mehanizama fitotoksičnosti AgNP u biljkama. ROS – reaktivne kisikove vrste. Preuzeto i prilagođeno prema Yan i Chen (2019).

S druge strane, nekolicina istraživanja pokazala je da AgNP mogu imati i pozitivne učinke na isključavanje (Fayez i sur. 2017), te stimulirati izduživanje korijena i djelovati na povećanje

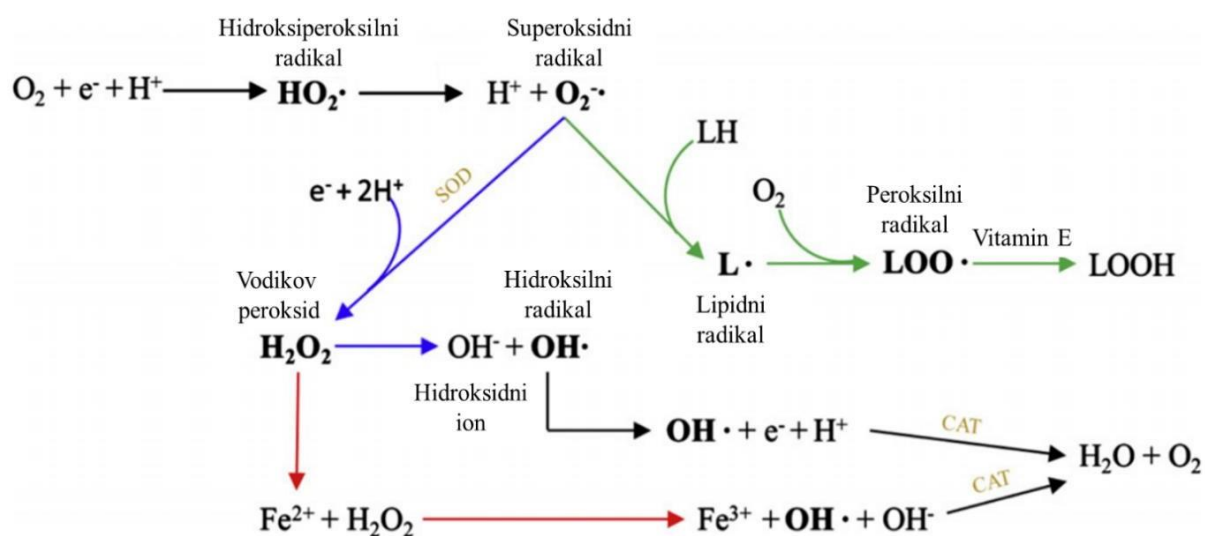
biomase (Almutairi i Alharbi 2015; Pallavi i sur. 2016; Vannini i sur. 2013; Wang i sur. 2013). U nekim vrstama je nakon izlaganja AgNP zabilježeno i povećanje sadržaja klorofila (An i sur. 2008; Sharma i sur. 2012) i povećana učinkovitost fotosinteze (Sharma i sur. 2012).

2.3.1. Pojava oksidacijskog stresa

U normalnim uvjetima u stanicama kao nusproizvod u procesima fotosinteze i staničnog disanja nastaju ROS, slobodni i vrlo nestabilni oblici kisika (Carocho i Ferreira 2013). Najčešći oblici ROS su singletni kisik ($^1\text{O}_2$), superoksidni radikal ($\text{O}_2^{\bullet-}$), vodikov peroksid (H_2O_2) te hidroksilni radikal (HO^{\bullet}). Kada se održavaju na niskoj, bazalnoj razini, ROS imaju važne regulatorne i signalne uloge u stanicama (Carocho i Ferreira 2013; Mittler, 2002). Stvaranje i razgradnja ROS u stanicama su dinamički procesi, a za održavanje njihove optimalne razine s ciljem održavanja homeostaze zadužen je sustav antioksidansa koji ROS prevode u slabije reaktivne oblike (Apel i Hirt 2004). Kao posljedica stresnih uvjeta, proizvodnja ROS može nadmašiti njihovu neutralizaciju putem sustava antioksidansa, što izaziva narušavanje redoks homeostaze u stanicama i dovodi do pojave oksidacijskog stresa (Arora i sur. 2002; Parvaiz i sur. 2010).

Kada dođe do preopterećenja u transportu elektrona, bilo u procesu staničnog disanja ili u procesu fotosinteze, redukcijom O_2 stvara se $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Slika 5.), koji je relativno nestabilan, jaki reducens. Osim što se redukcijom prevodi u druge oblike ROS, $\text{O}_2^{\bullet-}$ djeluje i kao prekursor za stvaranje drugih reaktivnih vrsta poput reaktivnih oblika dušika (eng. *reactive nitrogen species*, RNS), reaktivnih oblika sumpora (eng. *reactive sulfur species*, RSS) i reaktivnih oblika karbonila (eng. *reactive carbonyl species*, RCS) (Carocho i Ferreira 2013; Hayyan i sur. 2016). Iako u animalnim stanicama $\text{O}_2^{\bullet-}$ predominantno nastaje u procesu oksidacijske fosforilacije u mitohondrijima (Tripathy i Oelmüller 2012), u biljnim stanicama, većina $\text{O}_2^{\bullet-}$ nastaje u procesu fotosinteze u tzv. Mehlerovoj reakciji koja određuje direktnu redukciju O_2 komponentama fotosintetskog lanca transporta elektrona (Kozuleva i Ivanov 2016). Primjerice, ukoliko dođe do preopterećenja u transportnom lancu elektrona, elektroni s fotosustava I (eng. *photosystem I*, PSI) prenose se na feredoksin koji reducira O_2 pri čemu nastaje $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Arora i sur. 2002). Enzim superoksid dismutaza (SOD) reducira $\text{O}_2^{\bullet-}$ u slabije reaktivan i stabilniji H_2O_2 (Slika 5.), koji se smatra najvažnijom ROS molekulom u redoks regulaciji staničnih procesa i staničnoj signalizaciji (Carocho i Ferreira 2013; Sies i Jones 2020). H_2O_2 može lako prolaziti kroz akvaporine stanične membrane, a u interakciji s ionima kalcija (Ca^+) i dušikovim (II) oksidom (NO), sudjeluje u regulaciji razvojnih i fizioloških procesa u biljkama, prvenstveno u odgovoru na abiotički stres (Niu i Liao 2016). Redukcijom H_2O_2 u prisutnosti iona željeza (Fe^{2+})

(Fentonova reakcija) dolazi do stvaranja HO^\bullet (Flora, 2009) (Slika 5.), za kojeg se zbog velike reaktivnosti smatra da djeluje isključivo u blizini mjesta nastanka (Sies i Jones 2020). Osim toga, HO^\bullet može nastati i u Haber-Weissovoj reakciji iz H_2O_2 i $\text{O}_2^{\bullet-}$ pri čemu osim HO^\bullet nastaju i OH^- i O_2 (Carocho i Ferreira 2013) (Slika 5.). Nadalje, djelovanjem slobodnih radikala na molekule lipida dolazi do stvaranja lipidnih radikala (L^\bullet) koji se u reakciji s O_2 prevode u jako reaktivne lipidne peroksilne radikale (LOO^\bullet) koji mogu uzrokovati oštećenja lipida u sastavu staničnih membrana (Halliwell i Chirico 1993) (Slika 5.).



Slika 5. Shematski prikaz reakcija stvaranja ROS. Zelene strelice predstavljaju proces lipidne peroksidacije. Plave strelice prikazuju Haber-Weissove reakcije, a crvene strelice prikazuju Fentonove reakcije. LH –lipid, LOOH – lipidni hidroksiperoksid, SOD – superoksid dismutaza, CAT – katalaza. Preuzeto i prilagođeno prema Carocho i Ferreira (2013).

Povišena razina ROS zabilježena je u velikom broju istraživanja na biljkama izloženim AgNP. U vrstama vodene leće *Lemna gibba*, koja je bila tretirana s AgNP bez omotača (Oukarroum i sur. 2013) i *Spirodela polyrhiza*, koja je bila izložena česticama AgNP-PVP i AgNP-GA (Jiang i sur. 2014), sadržaj ROS povećavao se razmjerno povećanju koncentracije AgNP. Sličan rezultat zabilježen je i nakon tretmana korjenčića luka *Allium cepa* nanočesticama AgNP-CTAB i AgNP-PVP (Cyjetko i sur. 2017) te izlaganja vrsta *A. thaliana* (Nair i Chung 2014b) i *Oryza sativa* česticama AgNP stabiliziranim citratom (Nair i Chung 2014a).

2.3.2. Oksidacijsko oštećenje biomolekula

U normalnim uvjetima u stanicama oksidacijski i antioksidacijski sustav su u ravnoteži, međutim kad se biljke nađu u uvjetima stresa, dolazi do neravnoteže između nastanka ROS i

njihove razgradnje, što dovodi do oštećenja na staničnoj i molekularnoj razini (Arora i sur. 2002; Parvaiz i sur. 2010; Yan i Chen 2019).

2.3.2.1. Oštećenje lipida

Lipidna peroksidacija je lančana reakcija oksidacijske razgradnje lipida u kojoj slobodni radikali napadaju dvostruku vezu ugljika (C=C) u okosnici masnih kiselina i zamjenjuju vodik s kisikom. Pri tome nastaje nestabilan lipidni peroksilni radikal (Slika 5.), koji reagira sa sljedećom masnom kiselinom, a reakcija propagira sve dok u reakciji između dva radikala ne dođe do formiranja neradikalnog stabilnog produkta (Anand i Bhagat 2019; Halliwell i Chirico 1993; Yin i sur. 2011). Posebno podložne oksidacijskom oštećenju su polinezasićene masne kiseline (eng. *polyunsaturated fatty acids*, PUFA), koje izgrađuju fosfolipide bioloških membrana, ali mogu biti pogođene i druge lipidne molekule membrana poput kolesterola i glikolipida (Ayala i sur. 2014). Peroksidacija PUFA dovodi do poremećaja integriteta stanične membrane, uslijed povećanja njene permeabilnosti i smanjenja fluidnosti (Halliwell, 2006). Kao jedan od konačnih produkata lipidne peroksidacije nastaje malondialdehid (MDA), dok u manjoj mjeri nastaju i drugi aldehidi, koji svi mogu izazvati ireverzibilna oštećenja proteina ili molekule DNA. Razina MDA u stanicama koristi se kao jedan od parametara za indirektno određivanje integriteta staničnih membrana, ali i kao pokazatelj oksidacijskog stresa u stanicama (Ayala i sur. 2014).

Promjene u sadržaju MDA zabilježene su u biljkama izloženim djelovanju AgNP. Povećani sadržaj MDA zabilježen je u klijancima soje *Glycine max* (Galazzi i sur. 2019) i duhana *Nicotiana tabacum* (Peharec Štefanić i sur. 2018) nakon tretmana česticama AgNP-citrat, te u vrsti *A. thaliana* izloženoj djelovanju AgNP bez omotača (Nair i Chung 2014b). Međutim, nakon izlaganja korjenčića *A. cepa* česticama AgNP stabiliziranim različitim omotačima (AgNP-citrat, AgNP-PVP i AgNP-CTAB), povećanje lipidne peroksidacije zabilježeno je samo nakon tretmana s AgNP-CTAB (Cvjetko i sur. 2017). Sličan rezultat zabilježen je i u vodenoj leći *S. polyrhiza*, gdje su AgNP-GA izazvale povećanje razine MDA, dok tretman s AgNP-PVP nije rezultirao promjenom u njegovom sadržaju (Jiang i sur. 2014).

2.3.2.2. Oštećenje molekule DNA

Istraživanja su pokazala da se NP metala mogu transportirati do jezgre i drugih organela koji sadrže molekule DNA (mitohondriji i kloroplasti), gdje mogu izazvati oštećenja direktno, u reakciji s DNA, ili posredno, putem povećanja razine ROS koji izazivaju oksidacijska oštećenja DNA (Flores-López i sur. 2019; Lovecká i sur. 2021; Parvaiz i sur. 2010).

Genotoksičnost ROS molekula potječe od različitih mehanizama kao što su delecije, modifikacije nukleotidnih baza, pomicanje okvira čitanja, dvolančani lomovi i kromosomske aberacije. Pri tome, najveću reaktivnost pokazuje radikal HO^{*}, a kao najčešća modifikacija nukleotidnih baza zabilježena je oksidacija gvanina u hidroksi-gvanin djelovanjem ¹O₂ (Parvaiz i sur. 2010), koja uzrokuje krivo sparivanje baza što rezultira nastajanjem mutacija (Avkin i Livneh 2002). Mitohondrijska DNA je osjetljivija na oksidacijska oštećenja od jezgrine DNA, najvjerojatnije zbog nedostatka kromatinske organizacije i slabijeg popravljivanja DNA (Yakes i Van Houten 1997). Osim različitih mutacija, oksidacijske promjene molekule DNA mogu dovesti do metilacije citozina te na taj način utjecati na promjene u ekspresiji gena (Halliwell, 2006).

Dosadašnja istraživanja na biljkama pokazala su da AgNP uzrokuju oštećenja molekule DNA. AgNP bez omotača izazvale su genotoksične učinke u stanicama korjenčića i cvjetnih pupova vrste *A. cepa*, koje su zabilježene kao abnormalnosti u mitozu i mejozi (Kumari i sur. 2009), dok je u stanicama korjenčića boba *Vicia faba* pronađeno povećanje broja kromosomskih aberacija, mikronukleusa i smanjenje mitotskog indeksa (Patlolla i sur. 2012). Smanjen mitotski indeks zabilježen je i u korjenčićima luka *A. cepa* nakon izlaganja AgNP-PVP i AgNP-CTAB (Cvjetko i sur. 2017), dok je u istom istraživanju primjenom komet testa (eng. *Comet test*), kojim se određuju jedno- i dvolančani lomovi u lancu molekule DNA (Gichner i sur. 2004), zabilježeno značajno povećanje lomova nakon primjene najviših koncentracija AgNP s obje vrste omotača. Zanimljivo je da u navedenom istraživanju AgNP-citrat nije pokazao genotoksični učinak ni pri jednoj testiranoj koncentraciji (Cvjetko i sur. 2017).

2.3.2.3. Oštećenje proteina

ROS mogu izazvati oksidacijsko oštećenje proteina putem nekoliko mehanizama: (i) oksidacijske modifikacije specifičnog aminokiselinskog ostatka, (ii) cijepanja peptida posredovanog slobodnim radikalima te (iii) unakrsnim umrežavanjem proteina zbog reakcije s produktima lipidne peroksidacije (Lobo i sur. 2010). Postranslacijske modifikacije (PTM) proteina, poput stvaranja disulfidne veze između dvaju cisteinskih ostataka i veze između cisteina i NO ili sumporovodika (H₂S) te nastajanja cistein-sulfonskih kiselina u reakciji cisteina s H₂O₂, mogu dovesti do aktivacije ili deaktivacije ciljanog proteina ili gubitka njegove interakcije s drugim proteinima. Karbonilacija proteina jedna je od najčešćih ireverzibilnih modifikacija uzrokovana djelovanjem ROS, koja pokreće razgradnju proteina u proteasomima (Levine, 2002). Karbonilacija uključuje kovalentno vezanje karbonilne skupine na bočne ogranke lizina, prolina ili treonina u Fentonovoj reakciji, ili posredno, dodavanjem lipidnih

aldehida nastalih procesom peroksidacije na bočne ogranke cisteina, histidina i lizina (Tola i sur. 2021) Uloga karbonilacije proteina u biljnim stanicama još uvijek nije razjašnjena u usporedbi s prokariotima i animalnim stanicama, gdje je ova PTM povezana s prijenosom signala u raznim fiziološkim procesima uključujući antioksidacijski odgovor, staničnu proliferaciju i apoptozu (Tola i sur. 2021).

Za sada nema puno podataka o karbonilaciji proteina u biljkama tretiranim s AgNP. Povećanje sadržaja proteinskih karbonila zabilježeno je u korjenčićima luka *A. cepa* nakon izlaganja česticama AgNP-citrat, AgNP-PVP i AgNP-CTAB i proporcionalno se povećavalo s povećanjem koncentracije sva tri tipa AgNP (Cvjetko i sur. 2017). U klijanacima duhana *N. tabacum* samo je najveća primijenjena koncentracija AgNP-citrat (Peharec Štefanić i sur. 2018) i AgNP-CTAB (Biba i sur. 2022b) izazvala povećanje sadržaja proteinskih karbonila, dok u listovima i korijenu odraslih biljaka ove vrste nije zabilježen učinak AgNP-citrata na karbonilaciju proteina (Cvjetko i sur. 2018).

2.3.3. Mobilizacija antioksidacijskog sustava

Za obranu od oksidacijskog stresa aktivira se sustav antioksidansa koji se sastoji od enzimskih i neenzimskih komponenti. Antioksidansi su tvari koje mogu spriječiti ili usporiti oksidaciju drugih molekula, a od toksičnih učinaka metala mogu zaštititi hvatanjem slobodnih radikala, čime prekidaju lančanu reakciju stvaranja novih radikala, keliranjem iona metala i sprječavanjem reakcije s ROS ili njegovim održavanjem u redoks stanju koje mu onemogućava redukciju O₂ (Flora, 2009). Cilj djelovanja antioksidacijskog sustava je vratiti homeostazu prevodeći ROS u slabije reaktivne oblike kako bi se spriječila njihova interakcija s biomolekulama (Arora i sur. 2002; Mittler, 2017).

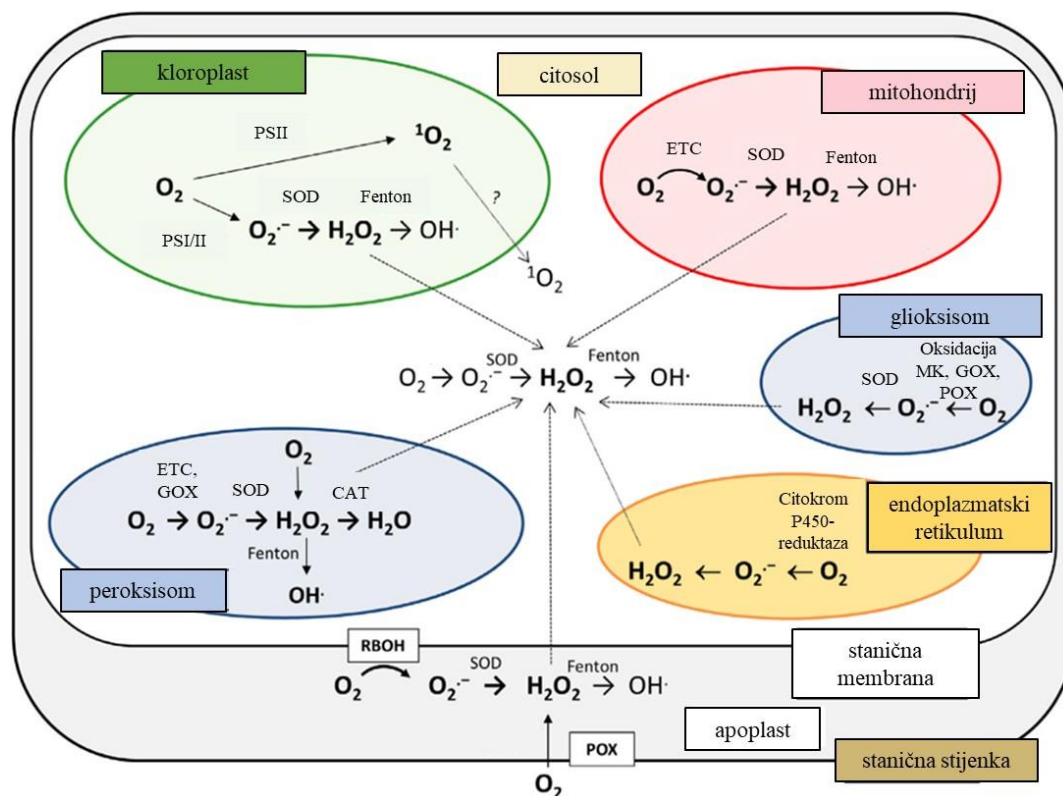
2.3.3.1. Antioksidacijski enzimi

Sustav enzimskih antioksidansa može se podijeliti na primarnu i sekundarnu obranu, a aktivnost pojedinih komponenti specifična je za određene stanične odjeljke (Janku i sur. 2019) (Slika 6.). U primarni sustav ubrajaju se glutation peroksidaza (eng. *glutathione peroxidase*, GPX), katalaza (eng. *catalase*, CAT) i SOD, koji neutraliziraju ROS i sprječavaju stvaranje novih radikala (Carocho i Ferreira 2013; Ighodaro i Akinloye 2018). Sekundarni sustav čine glutation reduktaza (eng. *glutathione reductase*, GPR) i glukoza-6-fosfat dehidrogenaza (eng. *glucose 6-phosphate dehydrogenase*, G-6-PD), koje djeluju kao pomoć enzimima primarnog sustava (Carocho i Ferreira 2013). Nadalje, peroksidaze (eng. *peroxidases*, POX) predstavljaju

sekundarnu liniju obrane od H_2O_2 koja se aktivira u kombinaciji s CAT, a osim anorganskog, kataliziraju i pretvorbu organskih peroksida (Agati i sur. 2012; Rajput i sur. 2021).

Prva linija obrane od ROS je SOD koji katalizira dismutaciju $O_2^{\bullet -}$, pri čemu se kationi metala u aktivnom mjestu enzima naizmjenice oksidiraju i reduciraju (McCord i Fridovich 1969). SOD je obitelj metaloproteina, sastavljena od tri izoenzima koji se razlikuju po metalnom kofaktoru u reakcijskom centru, a kod nekih je biljaka pronađeno čak 6 različitih izoenzima (Carocho i Ferreira, 2013). Izoforma mangan SOD (Mn-SOD) nalazi se pretežno u mitohondrijima i peroksisomima, izoforma bakar/cink SOD (Cu/Zn-SOD) lokalizirana je u citosolu, ali može se pronaći i u kloroplastima i peroksisomima, dok se izoforma željezo SOD (Fe-SOD) pretežno nalazi u kloroplastima (Arora i sur. 2002) Istraživanja su pokazala da je samo Mn-SOD esencijalna za preživljenje stanica, dok Fe-SOD osim antioksidacijske uloge, može imati i kelatorsku ulogu, vezujući katione metala. Sve tri izoforme podložne su inhibiciji putem jednovalentnih aniona, dok se najosjetljivija od njih, Cu/Zn-SOD, pokazala posebno podložna djelovanju fluoridnih (F^-), nitridnih (N_3^-) ili cijanidnih (CN^-) iona (Stephenie i sur. 2020). Enzim SOD sastavljen je od dvije podjedinice, a u nativnoj formi može se naći u obliku homodimera ili -tetramera (Alscher, 2002)

Enzim CAT je tetramer sa Fe kao kofaktorom, koji katalizira pretvorbu H_2O_2 u H_2O i O_2 (Parvaiz i sur. 2010). Nalazi se pretežno u peroksisomima, a različite biljne vrste imaju različit broj izoformi ovog enzima pa su tako dvije izoforme pronađene u ricinusu, tri u duhanu, a čak 6 u vrsti *A. thaliana* (Frugoli i sur. 1996; Rajput i sur. 2021). Smatra se da je CAT enzim s jednom od najvećih brzina obrtaja supstrata, budući da jedna molekula CAT može katalizirati pretvorbu čak 6 milijuna molekula H_2O_2 (Rahman, 2007), a može reagirati i s metanolom, etanolom, formaldehidom i mravljom kiselinom (Parvaiz i sur. 2010). Izoforme CAT se prema mjestu djelovanja svrstavaju u tri skupine: CAT1 su najzastupljenije u kloroplastima i zadužene su za uklanjanje prekomjernog H_2O_2 nastalog fotorespiracijom, CAT2 su uglavnom pronađene u vaskularnom tkivu biljaka i smatra se da imaju ulogu u lignifikaciji, dok su CAT3 najzastupljenije u sjemenkama i klijancima i njihova aktivnost je uglavnom povezana s uklanjanjem viška H_2O_2 proizvedenog tijekom degradacije masnih kiselina (Willekens i sur. 1994).



Slika 6. Shematski prikaz stvaranja i razgradnje ROS u različitim odjeljcima biljne stanice. PSI i PSII – fotosustav I i II (eng. *photosystem*), ETC – transportni lanac elektrona (eng. *electron transport chain*), RBOH – homolozi oksidaze respiratornog praska (eng. *respiratory burst oxidase homologues*), POX – peroksidaze (eng. *peroxidases*), SOD – superoksid dismutaza, CAT – katalaza, GOX – glutation oksidaza (eng. *glutathion oxidase*), MK – masne kiseline, ? – nepoznati mehanizam nastanka. Preuzeto i prilagođeno prema Janku i sur. (2019).

POX su uglavnom monomeri, lokalizirani pretežno u vakuoli i međustaničnim prostorima, ali pronađeni su u gotovo svim organelima. Neki od uobičajenih donora elektrona za reakciju pretvorbe H₂O₂ u dvije molekule H₂O su gvajakol, pirogalol, askorbat i GSH, koji se pritom oksidiraju pa ovisno o supstratu za kojeg imaju afinitet razlikujemo i različite tipove POX (Parvaiz i sur. 2010; Rajput i sur. 2021). Osim uloge u održavanju redoks ravnoteže u stanicama, POX imaju i uloge u rastu i razvoju stanica, sudjelujući u stvaranju stanične stijenke, procesima lignifikacije i suberizacije, te u katabolizmu hormona auksina (Rajput i sur. 2021). GPX su skupina izoenzima iz obitelji peroksidaza koji kataliziraju pretvorbu peroksida, ali i uklanjaju toksične produkte lipidne peroksidacije prevodeći ih u lipidne alkohole (Parvaiz i sur. 2010; Rajput i sur. 2021). Ipak, od navedenih enzima, najveći afinitet za H₂O₂ ima enzim askorbat peroksidaza (eng. *ascorbate peroxidase*, APX), za koju se smatra da ima ulogu i u finoj regulaciji ROS signalizacije. Osim toga, ova hem peroksidaza smatra se i ključnim enzimom u ciklusu askorbat-glutation, važnom metaboličkom putu za uklanjanje H₂O₂ (Noctor

i Foyer 1998). Obitelj APX čini barem pet različitih izoformi, od čega je najnestabilnija kloroplastna, koja se u odsutnosti askorbata degradira za manje od 30 sekundi (Noctor i Foyer 1998).

Dosadašnja istraživanja učinaka AgNP na biljke zabilježila su uglavnom pojačanu aktivnost antioksidacijskih enzima kao posljedicu povećanja razine ROS nakon izlaganja vrsta *Eruca sativa* (Vannini i sur. 2013) i *Ricinus communis* česticama AgNP-PVP (Yasur i Rani 2013), vodene leće *S. polyrhiza* česticama AgNP-GA i AgNP-PVP (Jiang i sur. 2014), te soje *G. max* česticama AgNP-citrat (Galazzi i sur. 2019). AgNP bez omotača potaknule su aktivnost antioksidacijskih enzima u sukulentu *Bacopa monnieri* (Krishnaraj i sur. 2012) i krumpiru *Solanum tuberosum* (Bagherzadeh Homae i sur. 2016). S druge strane, u nekim istraživanjima tretmani s AgNP sa ili bez omotača nisu rezultirali promjenama u aktivnosti antioksidacijskih enzima (Biba i sur. 2022b; Cvjetko i sur. 2018) ili su čak izazvali njihovo smanjenje (Biba i sur. 2022b; Cvjetko i sur. 2018; Hatami i Ghorbanpour 2013).

2.3.3.2. Sustav neenzimskih antioksidansa

Neenzimski sustav obrane od oksidacijskog stresa čine spojevi niske molekulske mase kao što su askorbinska kiselina, GSH, prolin i fenoli, koji su aktivni u vodenoj fazi, te lipofilni spojevi poput α -tokoferola i β -karotena, koji su aktivni u membranama (Parvaiz i sur. 2010; Waškiewicz i sur. 2014). Kao odgovor na povećanu razinu ROS, stanice povećavaju razinu neenzimskih antioksidansa putem dva mehanizma: povećanjem njihove sinteze i putem njihovog redoks recikliranja (Flora, 2009; Waškiewicz i sur. 2014). Osim što štite stanice od oksidacijskog oštećenja, neenzimski antioksidansi imaju i važne uloge u rastu i razvoju stanica te regulaciji ekspresije gena uključenih u odgovor stanica na stres (de Pinto i De Gara 2004).

Askorbinska kiselina je karboksilna kiselina, čiji reducirani oblik askorbat, ujedno i predominantni oblik u stanicama pri fiziološkom pH, djeluje kao antioksidans. Oksidacijom askorbata u nizu reakcija nastaje dehidroaskorbat koji je relativno stabilan i inertan, a ROS se pritom reduciraju u H₂O (Flora, 2009). Smatra se da zbog potencijala za vrlo brзом izmjenom elektrona ima ulogu u inhibiciji procesa lipidne peroksidacije (Flora, 2009). Osim u neutralizaciji ROS, askorbinska kiselina ima regulatornu ulogu u ekspresiji gena, indukciji apoptoze i nekim drugim staničnim procesima (You, 2000).

Spojevi koji sadrže tiolne skupine vrlo su potentni antioksidansi zbog velike reaktivnosti tiola koja potječe od niže energije ionizacije sumpora u odnosu na druge elemente koji izgrađuju organske spojeve. Među njima se ističe aminokiselina cistein kao sastavni dio bioloških tiola,

zatim homocistein, GSH te drugi peptidi koji sadrže disulfidne veze (Miura i sur. 2014). Smatra se da antioksidacijska sposobnost cisteina potječe iz njegove sposobnosti da donira vodik iz tiolne skupine (Elias i sur. 2005), a osim toga, tiolne skupine cisteina djeluju i kao kelatori iona metala (Flora, 2009; Gondikas i sur. 2012; Navarro i sur. 2008b). Nadalje, acetilirani oblik cisteina, N-acetil cistein, djeluje kao stimulator sinteze GSH, jednog od najvažnijih tiolnih antioksidansa (Karoui i sur. 1996). Osim toga, cistein ima bilježi i jaki reducirajući učinak na $O_2^{\cdot-}$ (Suzuki i sur. 1992).

GSH je tripeptid male molekulske mase, sastavljen od aminokiselina glutamata, cisteina i glicina. U stanicama se nalazi u značajno višim koncentracijama u odnosu na ostale tiole, a iako je prisutan u gotovo svim organelima, najveću koncentraciju ima u kloroplastima (Flora, 2009; Parvaiz i sur. 2010; Waśkiewicz i sur. 2014). Jedan je od najvažnijih antioksidansa u biljkama, koji između ostalog djeluje u obrani od oksidacijskog stresa izazvanog metalima, bilo direktno, detoksifikacijom ROS, ili indirektno, kao u supstrat u sintezi fitokelatina, kelatora iona metala (Biba i sur. 2022a). U biljnim stanicama nalazi se u dvije forme, reduciranoj GSH koja je pri optimalnim uvjetima barem 20 puta više zastupljena od oksidirane forme GSSG (Shu i sur. 2011). Omjer GSH/GSSG važan je pokazatelj oksidacijskog stresa, budući da u stresnim uvjetima dolazi do pomicanja ravnoteže u smjeru nastanka oksidiranog GSSG, za koji je poznato da može reagirati sa sulfhidrilnim skupinama proteina te na taj način uzrokovati njihovo oštećenje (Flora, 2009; Noctor i Foyer 1998; Waśkiewicz i sur. 2014). Smatra se da reducirani GSH neutralizira radikale 1O_2 i H_2O_2 , a može neutralizirati i HO^{\cdot} , najreaktivniji ROS, za koji su ostali mehanizmi razgradnje slabo poznati. Još jedna važna uloga GSH u stanicama je regeneracija askorbata, drugog moćnog antioksidansa, putem ciklusa askorbat-glutation (Parvaiz i sur. 2010). Osim uloge antioksidansa, GSH ima uloge i u diferencijaciji, starenju i smrti stanica, dio je obrambenog odgovora na patogene, a sudjeluje i u regulaciji aktivnosti nekih enzima (Ogawa, 2005).

Aminokiselina prolin, osim što je važna za primarni metabolizam, sudjeluje i u održavanju redoks ravnoteže u stanicama, a djeluje i kao kompatibilni osmolit, pri čemu regulira unos vode i održavanje turgora u biljkama u uvjetima stresa. Velik broj istraživanja povezao je povećanu razinu prolina u stanicama s odgovorom na abiotički stres, prvenstveno na sušu i povećani salinitet, ali i na toksičnost iona metala (Hayat i sur. 2012; Szabados i Savouré 2010). Prolin je važna signalna molekula u mitohondrijskim procesima, sudjeluje u regulaciji proliferacije stanica i staničnoj smrti, a aktivira i ekspresiju određenih gena čiji produkti su važni u odgovoru biljke na stres (Szabados i Savouré 2010). Prolin može neutralizirati različite ROS, primarno

$^1\text{O}_2$, a može i inhibirati proces lipidne peroksidacije u cilju očuvanja integriteta staničnih membrana (Liang i sur. 2013).

Istraživanja na biljkama izloženim AgNP pokazala su uglavnom povećanu razinu neenzimskih antioksidansa kao odgovor na povećanu razinu molekula ROS u stanicama. U klijancima duhana, tretman česticama AgNP-PVP izazvao je povećanje sadržaja prolina i GSH u odnosu na kontrolu (Biba i sur. 2022b). Izlaganje vodene leće *S. polyrhiza* česticama AgNP-GA i AgNP-PVP (Jiang i sur. 2014) i pšenice *Triticum aestivum* AgNP bez omotača (Barbasz i sur. 2016) rezultiralo je povećanim sadržajem GSH, koji se povećavao proporcionalno povećanju koncentracije AgNP.

2.4. Istraživanje rane pojave oksidacijskog stresa *in situ*

Većina istraživanja fitotoksičnosti AgNP provedena je na razini cijele biljke ili biljnog organa kroz period dovoljno dug da izazove ozbiljne poremećaje u metabolizmu i oštećenja staničnih struktura (Tkalec i sur. 2019). Vrlo malo pažnje pridalo se ispitivanju ranog fiziološkog odgovora biljke *in situ* na stres uzrokovan NP metala, dok podaci o utjecaju AgNP u literaturi nisu dostupni. Razlog tomu su nedovoljno razvijena metodologija i relativno otežano praćenje promjena koje nastaju kao uzrok ili posljedica oksidacijskog stresa. Nastanak i razgradnja ROS u stanici su brzi i dinamični procesi, a ROS su kratkoživi oblici (Schmitt i sur. 2014), zbog čega je njihova detekcija i kvantifikacija vrlo izazovna. Razvoj novih mikroskopskih tehnika u kombinaciji s uporabom visoko osjetljivih i specifičnih fluorescentnih proba, omogućuje praćenje trenutnih i suptilnih promjena izazvanih pojavom oksidacijskog stresa na tkivnoj i staničnoj razini (Mai i sur. 2013; McLennan i Esposti 2000; Ortega-Villasante i sur. 2005).

Stvaranje ROS može se pratiti primjenom specifičnih fluorescentnih proba, kao što su dihidroetidij (DHE), koji se koristi za detekciju $\text{O}_2^{\cdot-}$, te 2',7'-diklorofluorescein-diacetat ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$), koji je specifičan za detekciju H_2O_2 (Rothe i Valet 1990; Schulze-Osthoff i sur. 1992; Zamzami i sur. 1995), koje u kombinaciji sa fluorescencijskom mikroskopijom mogu dati informaciju o mjestu nastanka ROS u stanici i relativnoj količini u usporedbi s kontrolnim tkivom. Nadalje, uporabom probe monoklorobiman (eng. *monochlorobimane*, MCB) moguće je detektirati stvaranje antioksidansa GSH; naime, molekula MCB nema svojstvo fluorescencije, međutim u reakciji s GSH, koju katalizira enzim glutation S-transferaza (GST), nastaje fluorescentni konjugat GSH-MCB (Fernández-Checa i Kaplowitz 1990). Ovom metodom moguće je analizirati i vijabilnost stanica, bojanjem tkiva i tkivnih prereza propidij

jodidom (eng. *propidium iodide*, PI), koji interkalira između baza molekule DNA i selektivno se koristi za detekciju mrtvih stanica (Dengler i sur. 1995; Krishan, 1990).

U dosadašnjim istraživanjima ranog fiziološkog odgovora biljke na stres uzrokovan metalima, nakon primjene probe H₂DCF-DA, fluorescencijskom mikroskopijom zabilježeno je povećano stvaranje H₂O₂ u korijenu lucerne *Medicago sativa* nakon kratkotrajnog (6 h) tretmana kadmijem (Cd) i živom (Hg), uz povećanje udjela mrtvih stanica određenog bojanjem tkiva probom PI (Ortega-Villasante i sur. 2005). U istom istraživanju zabilježeno je smanjenje količine GSH, što je određeno praćenjem intenziteta fluorescencije produkta GSH-MCB (Ortega-Villasante i sur. 2005). Pojačano stvaranje ROS molekula primijećeno je i u klijancima riže *O. sativa* nakon 7-dnevnog izlaganja djelovanju AgNP, kada je mjerenjem intenziteta fluorescencije 3'-(p-hidroksifenil)-fluoresceina zabilježen porast količine H₂O₂, dok je primjenom probe DHE zabilježen porast sadržaja O₂^{•-} (Nair i Chung 2014a).

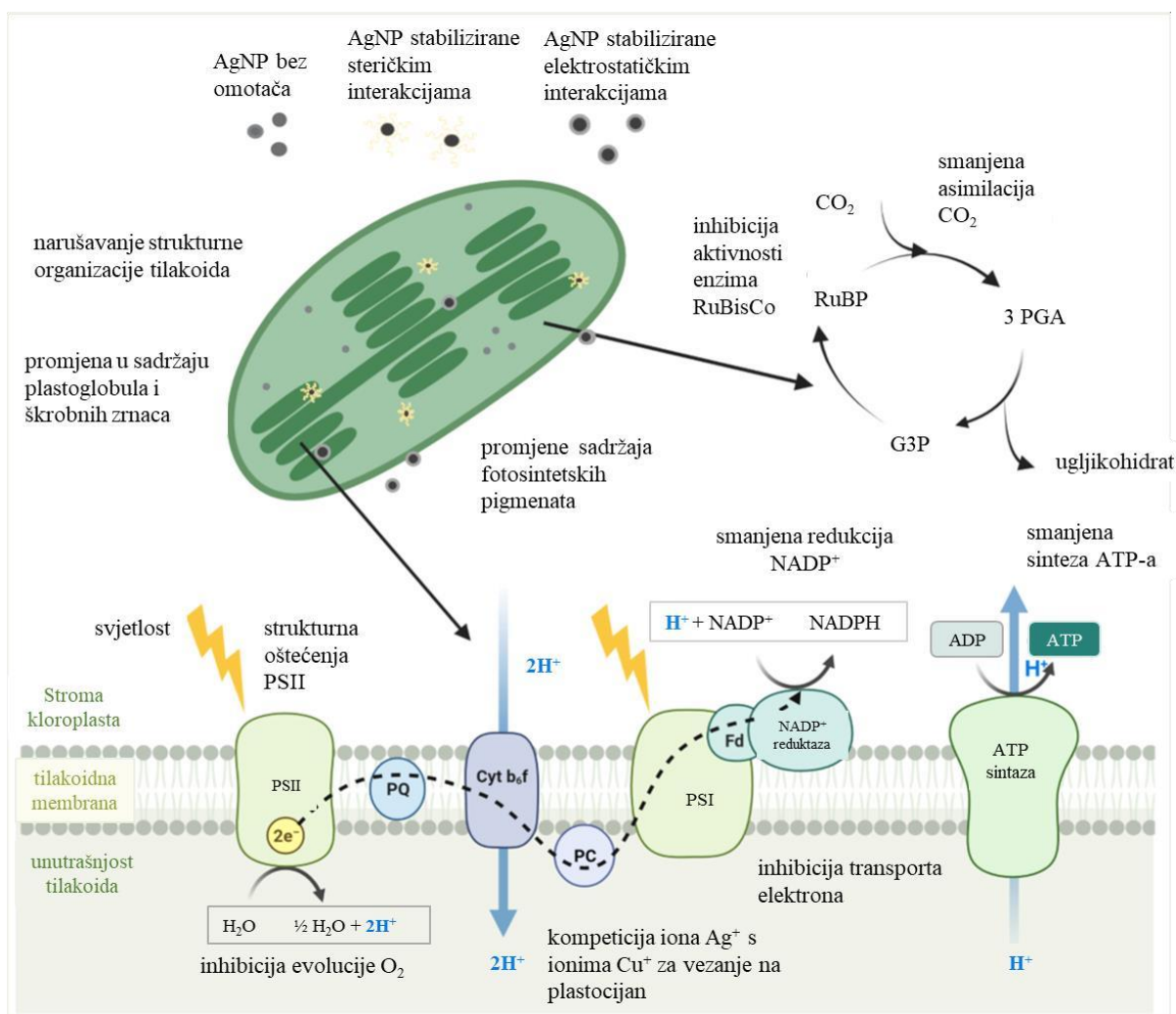
2.5. Utjecaj AgNP na proces fotosinteze

Fotosinteza je jedan od najvažnijih biokemijskih procesa koji se odvija u kloroplastima biljaka i algi, a čija je svrha pohrana energije u obliku organske tvari i oslobađanje O₂ potrebnog za život svih aerobnih organizama (Whitmarsh i Govindjee 1999). Poznato je da je proces fotosinteze osjetljiv na abiotičke stresne faktore poput suše, povišene temperature i saliniteta te izloženosti teškim metalima (Tkalec i sur. 2019). Dosadašnja istraživanja pokazala su uglavnom negativan utjecaj abiotičkog stresa na fotosintezu putem nekoliko mehanizama, pri čemu je najistaknutija promjena sadržaja fotosintetskih pigmenata (Richardson i sur. 2011).

Fotosintetski pigmenti su molekule odgovorne za apsorpciju svjetlosnog zračenja, nakon čega se energija apsorbiranih fotona prenosi do reakcijskih centara PSII gdje se odvijaju fotokemijske reakcije (Montero, 2015). Klorofil je najvažniji fotosintetski pigment, zbog čega određivanje njegovog sadržaja u kloroplastima može služiti kao indikator fotosintetske učinkovitosti (Tkalec i sur. 2019). Klorofil *a* jedini je pigment neophodan za odvijanje procesa fotosinteze, jer energiju dobivenu apsorpcijom fotona prenosi do reakcijskog centra, pri čemu djeluje kao primarni donor elektrona u transportnom lancu elektrona. Ostali fotosintetski pigmenti poput klorofila *b* te pigmenata iz skupine karotenoida i fikobilina imaju sporednu ulogu u fotosintezi, a to je prvenstveno omogućiti biljkama da apsorbiraju širi raspon valnih duljina svjetlosti, pri čemu energiju apsorbirane svjetlosti potom usmjeravaju na klorofil *a* radi pokretanja fotokemijskih reakcija (Rabinovitch i Govindjee 1970). Smanjenje sadržaja ukupnog klorofila kao posljedica izlaganja česticama AgNP već je zabilježeno u slatkovodnim

i morskim algama (Hazeem i sur. 2019; Mariano i sur. 2020; Pham, 2019; Romero i sur. 2020), te u vodenim i kopnenim biljkama (Jiang i sur. 2012, 2017; Liang i sur. 2018; Qian i sur. 2013; Zou i sur. 2017), a u nekoliko istraživanja izmjereno je i smanjenje sadržaja karotenoida (Nair i Chung 2014a; Peharec Štefanić i sur. 2021; Qian i sur. 2013) (Slika 7.).

Mjerenje prinosa fluorescencije klorofila *a* je brza, osjetljiva i nedestruktivna metoda za ispitivanje utjecaja okolišnih uvjeta na fotosintetsku učinkovitost (Krause i Weis 1991; Strasser i sur. 2004). Svjetlosna energija koju apsorbiraju molekule klorofila ima tri različite sudbine: (i) može biti korištena za fotokemijske reakcije potrebne za odvijanje fotosinteze, ili može biti re-emitirana (ii) u obliku toplinske energije i (iii) kao fluorescencija. Budući da su ovi procesi u međusobnoj kompeticiji, analizom promjene fluorescencije klorofila *a* moguće je odrediti kvantnu učinkovitost fotokemijskih reakcija odgovornih za dobivanje energije i reducirajućeg potencijala za asimilaciju ugljikovog dioksida (CO₂), te posredno dobiti uvid u strukturu i funkciju fotosintetskog aparata (Strasser i sur. 2004). Kod mjerenja prinosa fluorescencije, najčešće se određuje kvantni prinos (F_v/F_m) PSII, kao mjera učinkovitosti reakcijskih centara PSII da apsorbiraju foton (Wassink, 1951). Smanjeni sadržaj ukupnog klorofila, praćen smanjenom učinkovitosti PSII, zabilježen je u vodenim biljkama *S. polyrhiza* nakon tretmana s AgNP-GA (Jiang i sur. 2012) i AgNP-PVP (Jiang i sur. 2017) te *L. gibba* izloženoj djelovanju AgNP bez omotača. Slični rezultati zabilježeni su i u kopnenim vrstama *A. thaliana* nakon tretmana s česticama AgNP-citrat (Qian i sur. 2013), te *Pisum sativum* (Tripathi i sur. 2017) i *Brassica juncea* (Vishwakarma i sur. 2017) izloženih djelovanju AgNP bez omotača. Rezultati ovih istraživanja pokazali su da AgNP uzrokuju poremećaj u apsorpciji svjetlosti i prijenosu energije do reakcijskih centara, oštećenje PSII i inaktivaciju njegovih reakcijskih centara (Slika 7.). Još jedan pokazatelj inhibicije fotosinteze je smanjena brzina transporta elektrona, koja je u direktnoj korelaciji s povećanom proizvodnjom ROS (Biba i sur. 2022a) (Slika 7.), a zabilježena je u duhanu *N. tabacum* izloženom djelovanju AgNP s tri različita omotača (citrat, PVP i CTAB) (Peharec Štefanić i sur. 2021), te u zelenoj algi *Clamydomonas reinhardtii* (Dewez i Oukarroum 2012) izloženoj djelovanju AgNP bez omotača. Nadalje, istraživanja strukture stanica lista nekoliko biljnih vrsta nakon tretmana s AgNP pokazala su promjene u ultrastrukтури kloroplasta i organizaciji tilakoidnih membrana te nakupljanje škrobnih zrnaca (Peharec Štefanić i sur. 2021; Biba i sur. 2022b).



Slika 7. Shematski prikaz utjecaja AgNP na proces fotosinteze. RuBP – ribuloza 1,5-bisfosfat (eng. *ribulose 1,5-bisphosphate*), 3-PGA – 3-fosfoglicerat (eng. *3-phosphoglyceric acid*), G3P – gliceraldehid 3-fosfat (eng. *glyceraldehyde 3-phosphate*), PS – fotosustav (eng. *photosystem*), PQ – plastokinon (eng. *plastoquinone*), Cyt b₆f – citokrom b₆f (eng. *cytochrome b₆f*), PC – plastocijanin, Fd – feredoksin, ADP – adenzin difosfat (eng. *adenosine diphosphate*), ATP – adenzin trifosfat (eng. *adenosine triphosphate*), NADPH – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat (eng. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*). Preuzeto i prilagođeno prema Biba i sur. (2022b).

U manjem broju istraživanja nije zabilježen štetan utjecaj AgNP na proces fotosinteze (Larue i sur. 2014; Pardha-Saradhi i sur. 2018; Shabnam i sur. 2017), dok je u nekim slučajevima zabilježen i stimulativni učinak (Bello-Bello i sur. 2017; Sadak, 2019; Sharma i sur. 2012; Spinoso-Castillo i sur. 2017), što dovodi do zaključka da kod interpretacije rezultata treba uzeti u obzir niz čimbenika poput fizikalno-kemijskih svojstava samih AgNP i svojstava omotača korištenih pri sintezi, biodostupnosti AgNP te uvjeta izlaganja, vrste i starosti biljke (Biba 2022b).

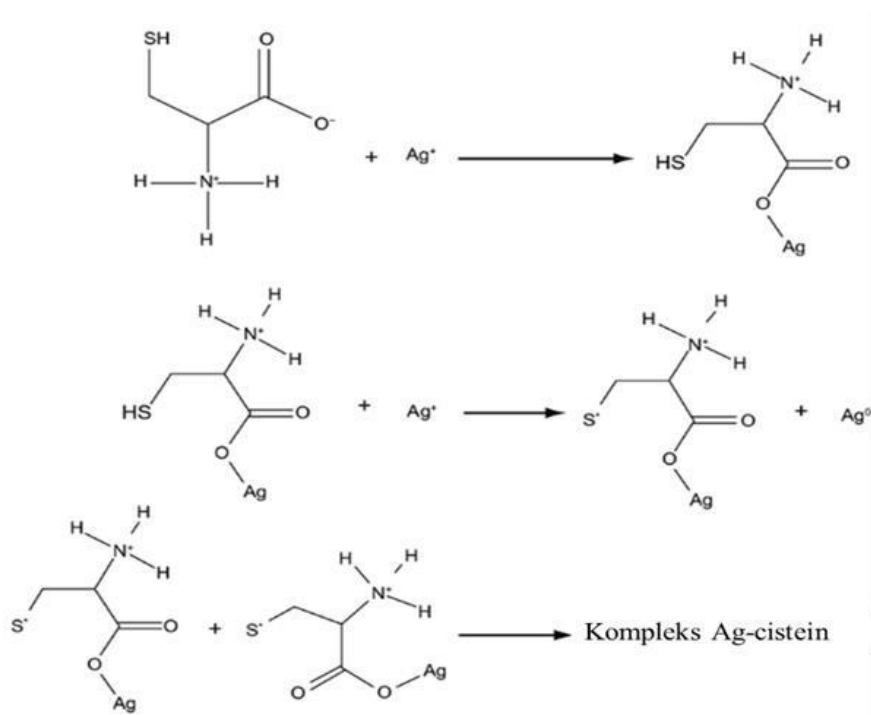
2.6. Utjecaj AgNP na biljni proteom

Proteini u stanicama imaju važne strukturne uloge, ali i uloge u gotovo svim staničnim procesima, koji uključuju transport tvari, katalizu različitih metaboličkih procesa, staničnu signalizaciju i odgovor na stres (Majumdar i Keller 2021). Analiza promjena u biljnom proteomu omogućava identifikaciju diferencijalno eksprimiranih proteina i s njima povezanih odgovora uslijed promjena u biljnom okolišu, čime predstavlja sponu između promjena u ekspresiji gena i utjecaja na metaboličke procese u stanicama (Hossain i sur. 2015). Kombiniranom primjenom genomike, proteomike i metabolomike moguće je kvalitativno i kvantitativno ispitati promjene na staničnoj i molekularnoj razini koje nastaju kao kompleksan odgovor biljaka na stres, a osim toga ove metode omogućavaju lakšu usporedbu odgovora različitih biljnih vrsta u različitim eksperimentalnim uvjetima (Majumdar i sur. 2019). Izlaganje biljaka česticama AgNP uzrokuje promjene na morfološkoj, fiziološkoj, biokemijskoj i molekularnoj razini, no većina dosadašnjih istraživanja fokusirala se uglavnom na ispitivanje fizioloških promjena, dok je mali broj ispitivao molekularne osnove fitotoksičnosti (Biba i sur. 2022b). Stoga je utjecaj AgNP na promjene u biljnom proteomu još uvijek slabo istražen, a većina radova fokusirala se na jedan tip AgNP i jednu biljnu vrstu (Tkalec i sur. 2019), dok o utjecaju AgNP s različitim omotačima gotovo da i nema podataka. U dosadašnjim istraživanjima, najveći broj diferencijalno eksprimiranih proteina uslijed izlaganja biljaka AgNP bili su proteini uključeni u procese primarnog metabolizma, pri čemu je zabilježena povećana ekspresija proteina uključenih u procese glikolize i fotosinteze (Biba i sur. 2022b; Mirzajani i sur. 2014; Peharec Štefanić i sur. 2018; Vannini i sur. 2013). Nadalje, nešto manji broj različito eksprimiranih proteina bili su proteini uključeni u odgovor na stres i staničnu signalizaciju, pri čemu su pojačanu ekspresiju imali proteini uključeni u antioksidacijski odgovor na stres (Biba i sur. 2022b; Mirzajani i sur. 2014; Mustafa i sur. 2015; Peharec Štefanić i sur. 2018; Vannini i sur. 2013), a u nešto manjoj mjeri bili su zastupljeni proteini uključeni u sintezu, smatanje i degradaciju proteina, te apoptozu (Vannini i sur. 2013; Mirzajani i sur. 2014; Peharec Štefanić i sur. 2018; Biba i sur. 2022a).

2.7. Usporedba utjecaja AgNP i iona Ag⁺

Iako je u posljednjem desetljeću istraživanje utjecaja AgNP na biljke pridobilo veliku pažnju znanstvene zajednice, još uvijek nije razjašnjeno potječe li fitotoksičnost AgNP od svojstava samih NP i/ili iona Ag⁺, koji se s njih otpuštaju. Stoga je prilikom dizajniranja pokusa u kojima se ispituje utjecaj AgNP na biljke, važno osim kontrolnih, netretiranih biljaka, uvesti i dodatnu kontrolu u obliku ionskog srebra, što je najčešće otopina AgNO₃ (Beer i sur. 2012;

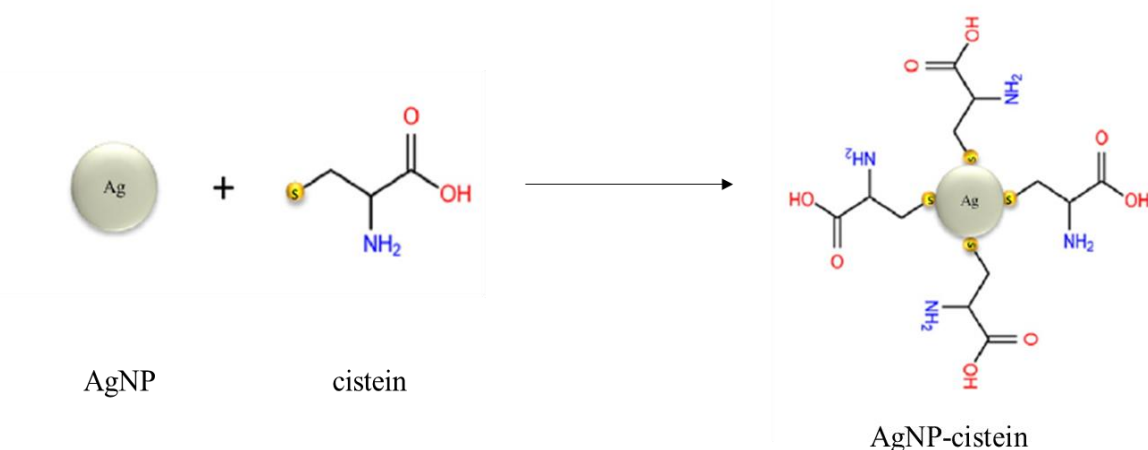
Layet i sur. 2019; Leclerc i Wilkinson 2014). Usporedbom učinaka ionskog srebra i srebra u obliku NP, apliciranih u istim uvjetima i istoj koncentraciji, moguće je djelomično razlučiti utjecaj iona Ag^+ od utjecaja samih AgNP (Leclerc i Wilkinson 2014; Navarro i sur. 2015, 2008b; Noori i sur. 2022). Međutim, priča je puno kompleksnija budući da je poznato da ioni Ag^+ otpušteni s AgNP u reducirajućem okolišu mogu formirati sekundarne nanočestice čija su fizikalno-kemijska svojstva različita od polaznih NP (Pem i sur. 2021), a i same biljke mogu biosintetizirati AgNP iz prekursora ionskog srebra (Dobrucka i sur. 2019; Vishwakarma i sur. 2017; Wang i sur. 2020). Provedena istraživanja potvrdila su različite učinke AgNP i ionskog srebra primijenjenih u istim koncentracijama na istoj biljci u istim eksperimentalnim uvjetima (Biba i sur. 2021b; Cvjetko i sur. 2017; Peharec Štefanić i sur. 2019; Shabnam i sur. 2017; Vishwakarma i sur. 2017).



Slika 8. Predloženi mehanizam kompleksacije iona Ag^+ s cisteinom. Preuzeto i prilagođeno prema Paredes i sur. (2014).

Osim uvođenja tzv. ionske kontrole u pokuse, dodatnu provjeru otpuštanja iona Ag^+ s AgNP moguće je provesti primjenom kelatora srebra, za što se koriste hidrofilni tioli kao što su glutation i cistein koji mogu vezati srebro stvaranjem Ag-sulfhidrilne veze (Slika 8.) (Gondikas i sur. 2012).

Osim keliranja iona Ag^+ , cistein može djelovati i kao omotač putem dva mehanizma: (i) interakcijom tiolne skupine s površinom nanočestice, i (ii) elektrostatičkom stabilizacijom djelovanjem karboksilne skupine cisteina (Slika 9). AgNP na koje je vezan cistein, mogu se dodatno umrežiti stvaranjem vodikove veze između amino skupina cisteina, što posljedično dovodi do agregacije čestica (Mandal i sur. 2001). Nekoliko istraživanja već je pokazalo da dodatak cisteina u kombiniranim tretmanima s AgNP i/ili AgNO_3 dovodi do ublažavanja njihovog toksičnog učinka, što sugerira da fitotoksičnost AgNP barem djelomično potječe od otpuštenih iona Ag^+ (Biba i sur. 2022b, 2021b; Navarro i sur. 2015, 2008b; Yin i sur. 2011).



Slika 9. Shematski prikaz stvaranja Ag-sulfhidrilne veze između AgNP i molekula cisteina. Preuzeto i prilagođeno prema Bamdad i sur. (2016).

2.8. Duhan kao modelni organizam

Osim što je ekonomski važna poljoprivredna biljka, duhan je dobro poznati modelni organizam za razna genetička, fiziološka i morfološka istraživanja. Razlog tome je dostupnost biljke, kratko generacijsko vrijeme i lagana transformacija. Stoga je većina otkrića iz područja biljne biologije upravo potekla iz istraživanja na duhanu, a i prva je dobivena transgenična biljka (Van Lijsebettens i sur. 2013). Danas se zbog široke primjene u proizvodnji rekombinantnih proteina, antitijela i posebnih kemikalija naziva „Pepeljgom biljne biotehnologije“ (Ganapathi i sur. 2004). Tijekom rada s biljkom duhana u uvjetima kulture tkiva, Murashige i Skoog su 1962. osmislili hranjivu podlogu koja se i danas s manjim modifikacijama koristi za uzgoj brojnih drugih biljnih vrsta u uvjetima *in vitro* (Ganapathi i sur. 2004).

Danas najpoznatija i najviše uzgajana vrsta duhana, od njih ukupno 70, je virginijski duhan (*N. tabacum*) koji je prirodni alotetraploid dobiven križanjem dva diploidna pretka, *Nicotiana sylvestris* i *Nicotiana tomentosiformis*, prije 6 milijuna godina. Uzgoj duhana od stadija sjemenke do odrasle biljke, koja može dati i do milijun novih sjemenki, traje u prosjeku oko tri mjeseca, zbog čega se relativno brzo i jednostavno može uzgojiti u velikim količinama (Ganapathi i sur. 2004). Danas se kao poljoprivredna biljka uzgaja u oko 130 zemalja svijeta sa godišnjim prinosom od gotovo 7 milijuna tona (<https://beef2live.com/story-ranking-countries-produce-tobacco-263-212893>, pristupljeno 12. veljače 2023.).

Duhan se danas učestalo koristi kao modelni organizam u istraživanjima utjecaja abiotičkog stresa na biljke (Antofie i Sava Sand 2021; Khan i sur. 2020; Majsec i sur. 2016; Peharec Štefanić i sur. 2012; Song i sur. 2022; Tkalec i sur. 2014), budući da je relativno otporan na stres uzrokovan okolišnim uvjetima (Schaeffer i sur. 2012), a prikladan je i za proteomske studije (Biba i sur. 2022b; Chen i sur. 2019; Peharec Štefanić i sur. 2019, 2018; Shen i sur. 2022) budući da mu je genom sekvenciran (Sierro i sur. 2014) i dostupan u bazama podataka.

MATERIJALI I METODE

3. MATERIJALI I METODE

Kemikalije korištene u ovom radu su od proizvođača Sigma-Aldrich (SAD), ukoliko nije drugačije navedeno.

3.1. Sinteza AgNP

Sintezu AgNP izvodila sam u mraku zbog fotoosjetljivosti srebra. Sintezu AgNP-PVP provela sam redukcijom otopine AgNO_3 natrijevim citratom uz dodatak PVP-a. Potrebne odvage pripremila sam na analitičkoj vagi (Sartorius, Njemačka), a zatim sam u 120 mL ultra-čiste vode (Milli-Q, $18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$, Merck Millipore, SAD) otopila 0,02 g AgNO_3 i 0,019 g PVP. Priređenu otopinu sam uz konstantno miješanje zagrijavala na magnetskoj miješalici (Kartell Labware, Italija) do vrenja, nakon čega sam dodala alikvot od 5 mL 1% (w/v) otopine $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ i nastavila zagrijavati uz miješanje do promjene boje iz prozirne u bistru žuto-narančastu. Reakciju sam tada naglo zaustavila pod mlazom hladne vode, a pripremljenu suspenziju pohranila sam u tamnu bocu na $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ do upotrebe.

Sintezu AgNP-CTAB provela sam redukcijom otopine AgNO_3 askorbinskom kiselinom uz dodatak CTAB-a. U 62,5 mL ultra-čiste vode otopila sam 0,02 g AgNO_3 i 0,0043 g CTAB i otopinu prvo ohladila na ledu. Zatim sam u otopinu, uz konstantno miješanje, dokapavala hladnu otopinu koja je sadržavala 0,01 g askorbinske kiseline u 62,5 mL ultra-čiste vode sporim kontinuiranim mlazom pomoću birete. Nakon dokapavanja čitavog volumena reducensa, otopina je promijenila boju iz prozirne u mutnu sivkasto-narančastu, nakon čega sam naglo zaustavila miješanje i pohranila dobivenu suspenziju AgNP-CTAB u tamnu bocu na $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ do korištenja.

3.2. Fizikalno-kemijska karakterizacija AgNP

3.2.1. UV/Vis spektrofotometrija

Za potvrdu uspješnosti sinteze AgNP, koristila sam UV/Vis spektroskopiju zbog jedinstvenih optičkih svojstava AgNP. Naime, kada se površina AgNP pobudi svjetlošću određenih valnih duljina, dolazi do snažne oscilacije vodljivih elektrona, koja za posljedicu ima apsorpciju i raspršenje svjetlosti koje se mogu mjeriti UV/Vis spektrofotometrom, a karakteristične su za plazmonske nanočestice (Malinsky i sur. 2001; Paramelle i sur. 2014). Nastala pojava naziva se rezonancija površinskih plazmona (eng. *surface plasmon resonance*, SPR). Suspenzije AgNP u vodi imaju karakterističan maksimum apsorpcije na valnoj duljini od oko 420 nm (Kaur i sur. 2021), a na temelju valne duljine pri kojoj se nalazi maksimum

apsorbancije moguće je procijeniti veličinu AgNP i njihovu koncentraciju u otopini (Paramelle i sur. 2014).

Nakon sinteze AgNP, priredila sam 5× razrijeđenu suspenziju AgNP-PVP i AgNP-CTAB u 5% (v/v) dušičnoj kiselini (HNO₃) i izmjerila apsorbcije u rasponu valnih duljina od 300 do 800 nm na uređaju Specord 50 PLUS (Analytik Jena, Njemačka), a maksimum apsorbcije uzoraka očitala sam u programu *WinASPECT PLUS* (Analytik Jena, Njemačka). Kao slijepu probu za analizu suspenzije AgNP-PVP koristila sam otopinu koja je sadržavala 0,019 g PVP u 125 mL ultra-čiste vode, a slijepa proba za analizu suspenzije AgNP-CTAB bila je otopina 0,0043 g CTAB u 125 mL ultra-čiste vode.

3.2.2. Određivanje distribucije veličina i naboja

Distribuciju veličina AgNP-PVP i AgNP-CTAB u matičnim otopinama (poglavlje 3.1.) odredila sam metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (eng. *dynamic light scattering*, DLS), koja se temelji na mjerenju intenziteta raspršenja svjetlosti i analizi njegovog intenziteta kao funkcije vremena (Fissan i sur. 2014). Distribuciju veličina AgNP odredila sam na temelju vrijednosti hidrodinamičkog promjera (d_H) AgNP dobivenih iz distribucije veličine i volumena čestica koje sam dobila mjerenjem metodom DLS, dok sam ζ -potencijal, odnosno efektivni naboj čestica u mediju, odredila mjerenjem elektroforetskog raspršenja svjetlosti (eng. *electrophoretic light scattering*, ELS). Metodom ELS određuje se stabilnost AgNP u koloidnoj suspenziji, što je od presudne važnosti za procjenu njihovih interakcija s tvarima iz medija u kojem se nalaze (Vega-Baudrit i sur. 2019). Pri tome se stabilnim smatraju koloidi čija vrijednost ζ -potencijala prelazi ± 30 mV (Saeb i sur. 2014).

Parametri DLS i ELS izmjereni su na uređaju Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, UK) opremljenim zelenim laserom (532 nm). Za mjerenje DLS, alikvote suspenzija AgNP prebacila sam u kivete od polistirola/polistirena, intenzitet raspršene svjetlosti detektirala pod kutom od 173°, a dobivene podatke obradila u softveru Zetasizer verzija 6.32 (Malvern Panalytical, UK). Hidrodinamički promjeri AgNP dobiveni su iz distribucije veličine i volumena čestica, a prikazani su kao srednja vrijednost 10 mjerenja \pm standardna devijacija. Naboj AgNP odredila sam metodom ELS primjenom kapilarnih ćelija, a dobivene vrijednosti ζ -potencijala iskazane su kao srednja vrijednost pet mjerenja \pm standardna devijacija.

3.2.3. Mjerenje koncentracije srebra u matičnim otopinama AgNP

Određivanje sadržaja srebra u suspenziji AgNP provela sam metodom apsorpcijske atomske spektroskopije (AAS), koja se primjenjuje za kemijsku kvantifikaciju elementarnih tvari u otopinama (McGillicuddy i sur. 2017). Metoda AAS temelji se na prevođenju analita u plinovito stanje te prolasku vidljivog ili UV zračenja kroz sloj slobodnih atoma, pri čemu se dio zračenja određenih valnih duljina apsorbira dajući prepoznatljiv spektar odgovarajućeg elementa (Lagalante, 2004). Nedostatak ove metode je nemogućnost uređaja da razlikuje AgNP od iona Ag^+ , zbog čega se za precizno mjerenje koncentracije AgNP, odnosno za mjerenje postotka disocijacije iona Ag^+ , suspenzije AgNP centrifugiraju kroz odgovarajuće filtere, pri čemu AgNP zaostaju na filteru, a ioni Ag^+ prolaze kroz filter i sakupljaju se za analizu (Liu i sur. 2012; Wojcieszek i sur. 2020).

Koncentraciju srebra u matičnim otopinama AgNP-PVP i AgNP-CTAB (poglavlje 3.1.) izmjerila sam na uređaju SOLAAR S4 (Thermo Elemental, SAD). Prije mjerenja, alikvote matičnih otopina razrijedila sam $50\times$ u 5% (v/v) HNO_3 , a sadržaj srebra odredila sam preko baždarnog pravca dobivenog mjerenjem otopina srebra poznatih koncentracija. Rezultati su iskazani kao srednja vrijednost tri mjerenja \pm standardna pogreška.

3.2.4. Određivanje veličine i oblika AgNP

Primjenom transmisivne elektronske mikroskopije (TEM) u matičnim otopinama vizualizirala sam sintetizirane AgNP-PVP i AgNP-CTAB te im odredila oblik i veličinu. Pri tome sam alikvote od 2 μL matičnih otopina AgNP prebacila na Formar[®] bakrenu mrežicu naparenu ugljikom. Osušene uzorke sam prebacila na nosač i analizirala elektronskim mikroskopom (TF20, FEI Tecnai G2, SAD) sa Schottky katodom pri naponu od 200 kV. Pomoću detektora energetske disperzivne rendgenske spektroskopije (eng. *energy dispersive X-ray spectroscopy*, EDX) analiziran je elementarni sastav uzorka kako bi se potvrdila prisutnost srebra.

3.3. Uzgoj biljnih kultura i tretmani

Sjemenke duhana (*Nicotiana tabacum* L.) korištene u ovom istraživanju dobivene su od Duhanskog instituta u Zagrebu. Sjemenke su prije nasađivanja sterilizirane na način da sam 0,025 g sjemenki prebacila u mikroeprovete od 1,5 mL, te dodala 1 mL 50% (v/v) natrijevog hipoklorita (NaOCl) (Gram-mol, Hrvatska). Nakon 15 min na tresilici, sjemenke sam $3\times$ isprala u autoklaviranoj dH_2O . Nakon sterilizacije, sjemenke sam nasađivala u Erlenmeyerove tikvice

s 5 mL prethodno pripremljene i autoklavirane tekuće hranjive podloge MS s polovičnom koncentracijom makroelemenata ($\frac{1}{2}$ MS) (Prilog 1.). Sjemenke su iskljavane na tresilici u komori za uzgoj biljnih kultura, pri intenzitetu svjetlosti od $90 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, temperaturi 24 ± 1 °C u uvjetima dugog dana (16 h svjetlosti i 8 h tame). Nakon tri tjedna, klijanci su prebačeni u veće posude u 50 mL hranjive podloge MS, a kako bih osigurala da je samo korijenje uronjeno u podlogu, kao potporu sam koristila staklene držače. Klijanci su uzgajani u aseptičnim uvjetima u komori za uzgoj pri ranije navedenim uvjetima otprilike 5 tjedana, odnosno do potpuno razvijenog korijenja i stabljike s diferenciranim listovima. Sterilizaciju i nasađivanje sjemenki i presađivanje klijanaca provodila sam u komori s horizontalnim strujanjem zraka (Heraeus, Njemačka).

Za tretman odraslih biljaka duhana koristila sam hranjive podloge $\frac{1}{2}$ MS s dodatkom AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ u koncentracijama od 25, 50 i 100 μM , samih ili u kombinaciji s cisteinom (cys) u omjeru 1:5 (125, 250 i 500 μM) (Prilog 2). Otopine sam pripremila iz odgovarajućih matičnih otopina (poglavlje 3.1.), u sterilnim uvjetima prije samog tretmana. 100 mM matične otopine AgNO₃ i cys pripremljene su u ultra-čistoj vodi, nakon čega su sterilno filtrirane i pohranjene u mrak na +4 °C do korištenja. Tretmane sam postavila u aseptičnim uvjetima, na način da sam iz posuda u kojima su rasle biljke sterilnim nastavkom izvukla podlogu i dodala po 50 mL prethodno pripremljenih otopina pojedinog tretmana, nakon čega su biljke vraćene u komoru za uzgoj. Kontrolne biljke rasle su u hranjivoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS bez dodatka srebra. Tretman je trajao 7 dana, nakon čega sam odvojila korijenje i detaljno ga isprala s dH₂O kako bih uklonila višak AgNP/AgNO₃ te ih posušila i odmah koristila za pokuse ili pohranila na -80 °C do upotrebe. Listove sam pojedinačno odvajala od stabljika, posušila i pohranila na -80 °C ili odmah koristila. Tkivo dobiveno na ovaj način koristila sam za analize parametara oksidacijskog stresa ili proteomske analize. Za svaki pokus postavila sam po 6 posuda svake koncentracije i tretmana, a pokus je ponovljen dva puta.

3.4. Mjerenje stabilnosti AgNP-PVP i AgNP-CTAB u podlozi $\frac{1}{2}$ MS

3.4.1. Spektrofotometrijsko određivanje stabilnosti

UV/Vis spektrofotometrijom pratila sam stabilnost suspenzija AgNP-PVP, AgNP-CTAB i otopine AgNO₃ koncentracija 25, 50 i 100 μM , samih i u kombinaciji s 125, 250 i 500 μM cys, u tekućoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS. Suspenzije odgovarajućih koncentracija tretmana pripremila sam u UV-kivetama koristeći prethodno autoklaviranu tekuću podlogu $\frac{1}{2}$ MS, nakon čega sam UV-kivete zatvorila parafilmom. ApSORBANCije u spektru valnih duljina od 300 do 800

nm očitala sam na način opisan u poglavlju 3.2.1., ukupno 7 dana u definiranim vremenskim razmacima, a između mjerenja UV-kivete sam držala u komori za uzgoj biljnih kultura, pri eksperimentalnim uvjetima opisanim u poglavlju 3.3. Slijepa proba bila je podloga ½ MS bez dodatka srebra.

3.4.2. Određivanje promjene veličine i naboja

Promjenu veličine i naboja AgNP-PVP i AgNP-CTAB u tekućoj podlozi ½ MS analizirala sam metodama DLS i ELS samo za najveću koncentraciju nanočestica (100 µM), samih i u kombinaciji s cys (100 µM AgNP + 500 µM cys), jer su nakon spektrofotometrijskih mjerenja pokazale najznačajnije promjene. Analize su napravljene metodom opisanom u poglavlju 3.2.2., a promjene sam pratila u definiranim vremenskim razmacima u periodu od 48 h.

3.5. Analiza AgNP u tkivu korijena i lista duhana

3.5.1. Određivanje sadržaja srebra

Metodom induktivno spregnute plazme sa spektrometrijom masa (eng. *inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS) moguće je kvantificirati elementarne tvari u biološkim uzorcima (McGillicuddy i sur. 2017), zbog čega sam koristila ovu metodu za brzo i precizno mjerenje sadržaja srebra u tkivu korijena i listova nakon tretmana biljaka duhana. Princip rada metode ICP-MS temelji se na razlaganju uzoraka na atome primjenom plazme te identifikacijom i utvrđivanjem koncentracije pojedinog elementa spektrometrijom masa.

Nakon 7-dnevnog tretmana (opisano u poglavlju 3.3.), tkivo korijena i listova tretiranih i kontrolnih biljaka osušeno je na temperaturi od 80 °C, kroz 24 h, nakon čega je usitnjeno u prah korištenjem tarionika i tučka. Digestija tkiva napravljena je u mikrovalnoj pećnici ETHOS SEL (Milestone Inc., USA) prema metodi EPA 3051. Prvi korak proveden je u 10 mL koncentrirane 65% (v/v) HNO₃ pri temperaturi od 130 °C, 10 min, zatim još 15 min pri 180 °C. Drugi korak digestije proveden je u 1 mL 37% (v/v) kloridne kiseline (HCl) 5 min pri temperaturi od 85 °C, zatim još 4 min na temperaturi od 130 °C. Uzorci su potom ohlađeni i razrijeđeni s 1% (v/v) HNO₃ do konačnog volumena od 50 mL i analizirani uređajem ELAN DRC-e ICP-MS (Perkin Elmer, SAD). Za određivanje koncentracije srebra u uzorcima korišten je baždarni pravac dobiven na temelju seta standarda poznatih koncentracija srebra. Granica detekcije bila je 0,05 mg kg⁻¹, a granica kvantifikacije 0,1 mg kg⁻¹. Test za određivanje točnosti mjerenja (eng. *spike recovery test*) u tkivu korijena dao je rezultate 95,6% (AgNP-PVP), 95,2% (AgNP-CTAB) i 96,5% (AgNO₃), dok su u listovima dobivene vrijednosti 96,2% (AgNP-PVP), 96,6% (AgNP-

CTAB) i 96,8% (AgNO_3). Sadržaj srebra u uzorcima izražen je kao $\mu\text{g Ag}$ po g suhe tvari tkiva, a prikazan je kao srednja vrijednost 9 replika \pm standardna pogreška dobivena iz tri nezavisna pokusa.

3.5.2. Detekcija AgNP

Uzorci za mikroskopske analize pripremljeni su prema modificiranom protokolu opisanom u Peharec Štefanić i sur. (2013). Mali komadići tkiva korijena i listova duhana kontrolnih biljaka i biljaka tretiranih sa $100 \mu\text{M AgNP-PVP}$, AgNP-CTAB ili AgNO_3 , fiksirani su 1 h u 1%-tnoj (w/v) otopini glutaraldehida u 50 mM kakodilatnom puferu, pH 7,2 na ledu. 50 mM kakodilatni pufer pripremila sam razrjeđivanjem 2 M matične otopine, dobivene otapanjem 4,28 g natrijevog kakodilatata ($\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2$) u 100 mL dH_2O . Uzorke sam potom ispirala 2×10 minuta s 1 mL 50 mM kakodilatnog pufera i zatim postfiksirala u 1%-tnoj (w/v) otopini osmijevog tetroksida (OsO_4) u istom puferu, 1 h na $+4^\circ\text{C}$. Nakon postfiksacije uzorke sam isprala s dH_2O 10 minuta, pri $+4^\circ\text{C}$ te ih dehidrirala na sobnoj temperaturi u seriji rastućih koncentracija etanola, redom 50%, 60%, 70%, 80% i 96% (v/v), u svakoj koncentraciji po 10 minuta. Naposljetku sam uzorke prebacila u 100% (v/v) etanol i inkubirala preko noći. Sutradan sam uzorke prebacila u smjesu 100%-tnog etanola i acetona u omjeru 1:1 te inkubirala 30 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega sam ih još 30 minuta inkubirala u čistom acetonu. Nakon završenog postupka dehidracije, uzorke sam prebacila u mješavinu epoksidne smole (Spurrovo sredstvo) i acetona u omjeru (1:3) 30 minuta, zatim u smjesu omjera 1:1 narednih 30 minuta te naposljetku u smjesu Spurrovog sredstva i acetona u omjeru 3:1 zadnjih 30 minuta. Smjesu sam zamijenila sa čistom smolom te sam uzorke ostavila 2 sata na 42°C . Po isteku vremena uzorke sam prenijela u kalupe te ih prekrila čistim Spurrovim sredstvom i inkubirala na temperaturi od 65°C 48 h, kako bi se smola potpuno polimerizirala.

Nakon polimerizacije, pripremila sam ultratanke prereze debljine 70 nm korištenjem ultramikrotoma (RMC MT-6000) sa staklenim nožićem. Prerezi su plivali na površini vode u bazenčiću staklenog noža, te sam ih pojedinačno prenosila na bakrenu mrežicu presvučenu Formvarom® i naparenu ugljikom. Konačno, uzorke sam dodatno kontrastirala inkubacijom u vodenoj otopini 2%-tnog (w/v) uranil acetata i 2%-tnog (w/v) olovnog citrata, pH 12 u trajanju od 10 minuta (Reynolds, 1963). Uzorke sam analizirala pomoću monokromatskog TF20 TEM-a (FEI Tecnai G2, SAD) sa Schottky katodom pri naponu od 200 kV, dok sam za potvrdu prisutnosti srebra koristila detektor EDX.

3.6. Mjerenje parametara oksidacijskog stresa

3.6.1. Ekstrakcija ukupnih topivih proteina u kalij-fosfatnom puferu

Odvage liofiliziranog tkiva korijena (35 mg) i lista (50 mg) prebacila sam u tarionik i ekstrahirala tučkom uz dodatak 10 mg PVP-a. Na dobiveni prah dodala sam 1,5 mL ohlađenog 0,1 M kalij-fosfatnog pufera, pH 7 i nastavila usitnjavati do potpune homogenizacije. Homogenat sam potom prebacila u mikroepruvetu od 1,5 mL i centrifugirala (Eppendorf centrifuge 5804 R, Njemačka) 15 min na 20000 g pri +4° C, nakon čega sam supernatante prebacila u čiste mikroepruvete od 1,5 mL i centrifugirala 45 min pri istim uvjetima. Nakon toga, supernatante sam prebacila u čiste mikroepruvete od 1,5 mL i iz alikvota odredila koncentraciju proteina metodom po Bradfordu (Bradford, 1976), a ostatak ekstrakata pohranila na -20 °C za daljnje analize. Dobivene proteinske ekstrakte koristila sam za mjerenje ukupnog sadržaja ROS, sadržaja proteinskih karbonila te mjerenje aktivnosti antioksidacijskih enzima.

Metoda određivanja koncentracije proteina po Bradfordu temelji se na vezanju boje *Coomasie Brilliant Blue* (CBB) na proteine (primarno na aminokiselinske ostatke arginina, lizina i histidina) u kiselim uvjetima, pri čemu se nastalo obojenje mjeri spektrofotometrijski. Za mjerenje koncentracije proteina po Bradfordu, pripremila sam matičnu otopinu (350 mg CBB G-250, 30 mL 96% (v/v) etanola, 200 mL 85% (v/v) fosforne kiseline (H₃PO₄) (T.T.T., Hrvatska) i radnu otopinu (30 mL matične Bradford otopine, 15 mL 96% (v/v) etanola, 30 mL 85% (v/v) H₃PO₄, 425 mL ultra-čiste H₂O). Zatim sam u mikroepruvetu od 1,5 mL dodala 980 µL radne otopine i 20 µL proteinskog ekstrakta, promiješala na vorteks miješalici (IKA, Njemačka) te inkubirala 10 minuta u mraku pri sobnoj temperaturi. Intenzitet plavog obojenja koje nastaje pri reakciji spektrofotometrijski sam izmjerila pri valnoj duljini od 595 nm na spektrofotometru *ATI/Unicam UV4-100* (UK). Na temelju baždarne krivulje napravljene s poznatim koncentracijama (0,2 – 2,0 mg mL⁻¹) otopina goveđeg serumskog albumina (eng. *bovine serum albumine*, BSA) u 0,1 M kalij-fosfatnom puferu, pH 7, odredila sam vrijednosti koncentracije proteina iz uzoraka.

3.6.2. Određivanje sadržaja ROS *in vitro*

3.6.2.1. Fluorimetrijsko određivanje sadržaja O₂⁻

Ekstrakte korijena i lista pripremljene na način opisan u poglavlju 3.7.1. koristila sam za određivanje sadržaja O₂⁻. Pri tom sam koristila boju DHE koja u prisutnosti O₂⁻ oksidira prvo u hidroetidij (EOH), a zatim u etidij, pri čemu se apsorpcijski i emisijski spektar pomiču prema području crvene fluorescencije (McLennan i Esposti 2000.)

U mikrotitarskoj pločici pomiješala sam 50 μL ekstrakta i 50 μL 20 μM DHE u dH_2O i kratko protresla, nakon čega sam odmah izmjerila intenzitet fluorescencije na čitaču mikrotitarskih pločica (Tecan, SAD) s valnom duljinom pobuđujuće svjetlosti podešenom na 520 nm, a emitirane na 600 nm. Rezultate mjerenja prikazuju srednju vrijednost \pm standardna pogreška, dobivenu iz dva nezavisna pokusa po 6 replika, a iskazani su kao postotak od kontrole.

3.6.2.2. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja H_2O_2

Metodom prema Alexievu i sur. (2001) spektrofotometrijski sam odredila sadržaj H_2O_2 u korijenu i listu duhana. Koristila sam 150 mg svježeg tkiva korijena ili lista koje sam usitnila u fini prah u tarioniku s tučkom uz dodatak PVP-a i tekućeg dušika. Svi koraci ekstrakcije provedeni su na ledu, a nakon usitnjavanja tkiva, u tarionik sam dodala 2 mL 0,1% (*w/v*) trikloroacetne kiseline (eng. *trichloroacetic acid*, TCA). Ekstrakte sam potom prebacila u mikroeprevete od 2 mL i centrifugirala 10 minuta pri 20000 g i 0 °C. Dobivene supernatante sam prebacila u čiste mikroeprevete od 2 mL i držala na ledu do mjerenja.

Za analizu uzoraka pomiješala sam 0,5 mL dobivenog supernatanta s 0,5 mL 10 mM kalij-fosfatnog pufera, pH 7,0 i 1 mL 1 M kalijevog jodida (KI), a za slijepu probu umjesto uzoraka dodala sam 0,1% (*w/v*) TCA. Dobivenu smjesu sam homogenizirala na vorteksu i prebacila u UV-kivetu te mjerila u UV/Vis spektrofotometru pri valnoj duljini od 390 nm. Koncentraciju H_2O_2 izračunala sam preko baždarne krivulje pripremljene s otopinama H_2O_2 (Gram-mol, Hrvatska) poznatih koncentracija (1,378 – 352,8 μM). Rezultati prikazuju srednju vrijednost \pm standardna pogreška, dobivenu iz dva nezavisna pokusa po 6 replika, a izrazila sam ih kao $\mu\text{mol g}^{-1}$ svježe mase.

3.6.3. Mjerenje oštećenja biomolekula

3.6.3.1. Mjerenje sadržaja MDA

Stupanj lipidne peroksidacije indirektno sam odredila mjerenjem sadržaja produkta MDA prema metodi koju su opisali Heath i Packer (1968). Na sobnoj temperaturi ekstrahirala sam 20 mg svježeg tkiva korijena ili lista u tarioniku uz dodatak 1,3 mL ekstrakcijskog pufera (0,3% (*w/v*) tiobarbituricne kiseline (eng. *thiobarbituric acid*, TBA) otopljene u 10% (*w/v*) TCA). Homogenate sam potom prebacila u mikroeprevete od 2 mL i inkubirala 30 minuta na 95 °C u termobloku (Termomixer comfort, Eppendorf, Njemačka). Reakciju sam zaustavila naglim hlađenjem u ledenoj kupelji, nakon čega sam uzorke centrifugirala 15 minuta pri 20000 g i +4 °C. Supernatante sam odvojila u čiste mikroeprevete od 1,5 mL, a taloge bacila.

Apsorbanciju sam mjerila spektrofotometrijski pri valnim duljinama 532 i 600 nm, pri čemu razlika ove dvije vrijednosti daje korekciju za nespecifično zamućenje.

Sadržaj MDA u uzorku izračunala sam koristeći formulu:

$$\text{Sadržaj MDA} = \frac{A_{532} - A_{600}}{m \times V \times \epsilon \times l} (\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ suhe tvari})$$

pri čemu je:

A_{532} – apsorbancija izmjerena na 532 nm

A_{600} – apsorbancija izmjerena na 600 nm

m – masa tkiva (mg)

V – volumen uzorka (1,5 mL)

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

l – duljina puta (1 cm)

Rezultate sam izrazila kao $\mu\text{mol mg}^{-1}$ suhe tvari, a prikazuju srednju vrijednost \pm standardna pogreška dobivenu iz dva nezavisna pokusa po 6 replika.

3.6.3.2. Mjerenje oštećenja molekule DNA komet testom

Komet test, odnosno gel elektroforeza pojedinačnih stanica (eng. *single cell gel electrophoresis assay*, SCGE) brza je i jednostavna metoda za analizu genotoksičnosti, a koristi se za određivanje jednolančanih i dvolančanih lomova u molekuli DNA. Metoda se temelji na različitim obrascima putovanja DNA kroz agarozni gel, pri čemu se lanci na kojima se dogodio lom brže putuju prema anodi, formirajući karakteristični „rep“ kometa. Intenzitet oštećenja određuje se kao postotak DNA u repu u odnosu na „glavu“ kometa (neoštećene, kondenzirane molekule DNA) (Ostling i Johanson 1984).

Za određivanje razine oštećenja molekule DNA u svježem tkivu korijena ili lista neposredno nakon tretmana (poglavlje 3.3.) koristila sam modificiranu metodu prema Gichner i sur. (2004). Prvo sam mehaničkim postupkom izolirala jezgre, zarezujući žiletom tkivo uronjeno u 250 μL 400 mM Tris-HCl, pH 7,5 na ledu. Suspenziju jezgara sam potom pomiješala s jednakim volumenom 1% (w/v) agaroze niskog tališta (eng. *low melting point*, LMP), koju sam pripremila otapanjem agaroze na 42 °C u otopini fosfatnih soli (eng. *phosphate buffer saline*, PBS) koja je sadržavala 10 mM Na_2HPO_4 , 1,7 mM KH_2PO_4 , 2,7 mM KCl, 130 mM NaCl (sve Gram-mol,

Hrvatska). Dobivenu smjesu sam prebacila na predmetna mikroskopska stakalca na koja sam prethodno nanijela sloj 1% (w/v) agaroze normalnog tališta (eng. *normal melting point*, NMP), koju sam pripremila zagrijavanjem u dH₂O u mikrovalnoj pećnici. Predmetna stakalca zatim sam prekrila pokrovnim stakalcem i ostavila na +4 °C da očvrсне. Nakon pripreme stakalaca provela sam horizontalnu agaroznu gel elektroforezu. Predmetna stakalca sa smjesom jezgara premjestila sam u kadnicu za elektroforezu u kojoj se nalazila ohlađena otopina koja se sastojala od 1 mM Na₂EDTA i 300 mM NaOH, pH 13, nakon čega sam uklonila pokrovna stakalca. Za denaturaciju u lužnatim uvjetima, uzorke sam ostavila u kadici u mraku 10 minuta, nakon čega sam pokrenula elektroforezu koja se odvijala 20 minuta na 26 V i 300 mA. Nakon toga sam predmetna stakalca s jezgrama neutralizirala na način da sam stakalca isprala 3× s 1 mL 0,4 M Tris-HCl, nakon čega sam ih ostavila da se u potpunosti osuše na zraku. Jezgre sam vizualizirala uporabom fluorescentne boje *GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain* (Lonza, SAD) koja interkalira između parova baza u molekuli DNA. Stakalca sam 5 minuta inkubirala u 70 µL boje prethodno razrijeđene 10000×, nakon čega sam ih analizirala uporabom fluorescencijskog mikroskopa s ekscitacijskim filterom BP 520/09 nm i graničnim filterom od 610 nm. Na ukupno 150 nasumično odabranih jezgara po stakalcu, odredila sam postotak DNA u repu (eng. *% tail DNA*, *% tDNA*) tretmana u odnosu na kontrolu, koristeći računalni program *Komet ver. 5* (Kinetic Imaging, UK). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ukupno 150 jezgara ± standardna pogreška.

3.6.3.3. Mjerenje sadržaja proteinskih karbonila

Metoda za određivanje sadržaja proteinskih karbonila temelji se na reakciji derivatizacije karbonilne skupine 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH), pri čemu nastaje obojani adukt dinitrofenilhidrazon koji se mjeri spektrofotometrijski (Colombo i sur. 2016). Metodu koju sam koristila za mjerenje proteinskih karbonila prvi su razvili Levine i sur. (1994). U mikroepreveti od 1,5 mL sam pomiješala 20 µL proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.6.1.) sa 180 µL 0,1 M kalij-fosfatnog pufera, pH 7, te dodala 300 µL 10 mM DNPH pripremljenog u 2 M HCl. Uzorke sam promiješala na vorteks miješalici te inkubirala 1 h u mraku na sobnoj temperaturi uz povremeno protresanje. Nakon inkubacije, precipitirala sam proteine dodatkom 500 µL 10% (w/v) TCA te inkubacijom 5 minuta na -20 °C, nakon čega sam uzorke centrifugirala 10 minuta na 20000 g i +4 °C. Supernatant sam odlila, a taloge sam ispirala 3× u 500 µL otopine etanol/etilacetat u omjeru 1:1 kako bih uklonila nevezani DNPH. Zatim sam na taloge dodala 1 mL 6 M uree otopljene u 20 mM kalij-fosfatnom puferu, pH 2,4 te ih otopila miješanjem pomoću vorteksa. Uzorke sam zatim mjerila spektrofotometrijski pri valnoj duljini

od 370 nm za određivanje proteinskih karbonila te na 280 nm za određivanje ukupnih proteina i na 260 nm za detekciju potencijalnog onečišćenja uzorka nukleinskim kiselinama. Svaki uzorak je imao svoju slijepu probu koja je pripremljena na opisani način, ali bez dodatka DNPH. Sadržaj ukupnih proteina izračunat je baždarne krivulje BSA poznatih koncentracija (0,2 – 2,0 mg mL⁻¹) dobivene mjerenjem apsorbancije standarada BSA na 280 nm.

Sadržaj proteinskih karbonila sam potom izračunala prema sljedećoj formuli:

$$\text{Sadržaj karbonila} = \frac{A_{370}}{c \times s \times l} \quad (\mu\text{mol mg}^{-1} \text{ proteina})$$

pri čemu je:

A_{370} – apsorbancija uzorka izmjerena na 370 nm

ϵ – molarni apsorpcijski koeficijent (22 mM⁻¹ cm⁻¹)

c – sadržaj ukupnih proteina (mg mL⁻¹)

l – duljina optičkog puta (1 cm)

Rezultate sam izrazila kao $\mu\text{mol mg}^{-1}$ proteina, a prikazuju srednju vrijednost \pm standardna pogreška dobivenu iz dva nezavisna pokusa sa po 6 replika.

3.6.4. Spektrofotometrijsko mjerenje aktivnosti antioksidacijskih enzima

3.6.4.1. Mjerenje aktivnosti SOD

Aktivnost SOD mjerila sam metodom prema Beauchamp i Fridovich (1971), koja se temelji na fotokemijskoj reakciji u kojoj riboflavin stvara $\text{O}_2^{\bullet-}$ koji reducira nitro plavi tetrazolij (eng. *nitroblue tetrazolium*, NBT) u ljubičasto obojani produkt formazan. Promjena obojenja mjeri se spektrofotometrijski, a iz dobivenih vrijednosti apsorbancija određuje se aktivnost SOD.

Za mjerenje aktivnosti SOD pripremila sam reakcijsku smjesu (13 mM metionin, 75 μM NBT (Alfa Aesar, SAD), 0,1 M etilendiamintetraoctena kiselina (eng. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA) (T.T.T., Hrvatska) i 2 mM riboflavin u 50 mM kalij-fosfatnom puferu, pH 7,8). Budući da se jedinica (eng. *unit*, U) SOD definira kao količina enzima potrebnog za 50%-tnu inhibiciju redukcije NBT, prije mjerenja uzoraka, odredila sam maksimalnu apsorbanciju koja je posljedica redukcije NBT-a u formazan u prisutnosti riboflavina koji pod utjecajem svjetlosti producira $\text{O}_2^{\bullet-}$. Bez prisutnosti SOD, koji uklanja $\text{O}_2^{\bullet-}$, nastat će više formazana što će rezultirati maksimalnom apsorbancijom. Apsorbanciju nastalu uslijed reakcije stvaranja

formazana izmjerila sam pri valnoj duljini od 560 nm, nakon 8-minutne inkubacije u kiveti izloženoj svjetlosti (15 W) u transiluminatoru. Kao slijepu probu koristila sam istu smjesu, koja nije bila izložena svjetlosti. Za mjerenje aktivnosti SOD u proteinskim ekstraktima (poglavlje 3.6.1.), u reakcijsku smjesu sam dodala volumen uzorka kontrole koji izaziva 50%-tno smanjenje vrijednosti maksimalne apsorbancije, a mjerenje je provedeno u istim uvjetima. Aktivnost SOD izračunala sam na temelju baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbancija SOD standarda (0,025 – 1 U μL^{-1}), a dobivene vrijednosti sam izrazila kao U mg^{-1} proteina. Rezultati prikazuju srednju vrijednost \pm standardna pogreška, dobivenu iz dva nezavisna pokusa po 6 replika.

3.6.4.2. Mjerenje aktivnosti CAT

Aktivnost CAT mjerila sam metodom prema Aebi i sur. (1984), koja se temelji na određivanju brzine razgradnje H_2O_2 dodanog u uzorak, a promjene se prate mjerenjem smanjenja apsorbancije uzorka pri valnoj duljini od 240 nm. U UV-kiveti pomiješala sam 970 μL reakcijske smjese (10 mM H_2O_2 , 50 mM kalij-fosfatni pufer, pH 7,0) i 30 μL proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.6.1.) te mjerila promjenu apsorbancije pri valnoj duljini od 240 nm svakih 10 sekundi tijekom jedne minute.

Aktivnost CAT u uzorcima izračunala sam prema sljedećoj formuli:

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A \times 6 \times V_{rs} \times F.R.}{V_{uz} \times s \times l \times c} \quad (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1})$$

pri čemu je:

ΔA – srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 240 nm tijekom 10 sekundi

6 – faktor korekcije za ΔA za izražavanje rezultata u minuti

V_{rs} – volumen reakcijske smjese (1 mL)

F.R. – faktor razrjeđenja uzorka (1)

V_{uz} – volumen uzorka (0,03 mL)

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

l – duljina optičkog puta (1 cm)

c – koncentracija proteina (mg mL^{-1})

Rezultati su izraženi kao μmol utrošenog H_2O_2 po mg proteina u minuti i prikazuju srednju vrijednost \pm standardna pogreška dobivenu iz dva nezavisna pokusa po 6 replika.

3.6.4.3. Mjerenje aktivnosti APX

Enzim APX katalizira reakciju H_2O_2 s askorbatom koja dovodi do oksidacije askorbata u monodehidroaskorbinsku kiselinu. Mjereći pad apsorbancije pri valnoj duljini od 290 nm do koje dolazi uslijed oksidacije askorbata izračunava se aktivnost APX (Nakano i Asada 1981).

Za mjerenje aktivnosti APX u uzorcima, u UV-kiveti pomiješala sam 800 μL reakcijske smjese (50 mM kalij-fosfatni pufer, pH 7,0 i 10 mM EDTA), 10 μL 0,1 mM askorbinske kiseline, 10 μL 12 mM H_2O_2 i 180 μL proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.6.1.). Promjenu apsorbancije mjerila sam pri valnoj duljini od 290 nm, svakih 15 sekundi unutar jedne minute.

Aktivnost APX u uzorcima sam izrazila pomoću formule:

$$\text{APX} = \frac{\Delta A \times 4 \times V_{rs} \times F.R.}{V_{uz} \times s \times l \times c} (\mu\text{mol}_{\text{ASK}} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1})$$

Pri čemu je:

ΔA – srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 290 nm tijekom 15 sekundi

4 – faktor korekcije za ΔA za izražavanje rezultata u minuti

V_{rs} – volumen reakcijske smjese (1 mL)

F.R. – faktor razrjeđenja uzorka (1)

V_{uz} – volumen uzorka (0,18 mL)

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

l – duljina optičkog puta (1 cm)

c – koncentracija proteina (mg mL^{-1})

Rezultati su izraženi kao μmol utrošenog askorbata po mg proteina u minuti i prikazuju srednju vrijednost \pm standardna pogreška dobivenu iz dva nezavisna pokusa po 6 replika.

3.6.4.4. Mjerenje aktivnosti pirogalol peroksidaze (PPX)

Aktivnost PPX odredila sam spektrofotometrijski, metodom prema Nakano i Asada (1981) koja se temelji na mjerenju porasta apsorbancije pri valnoj duljini od 430 nm do koje dolazi uslijed oksidacije pirogalola u purpurogalin u prisutnosti H_2O_2 .

Za mjerenje, u kivetu sam pomiješala 980 μL reakcijske smjese (50 mM kalij-fosfatni pufer, pH 7,0, 20 mM pirogalol i 1 mM H_2O_2) i 20 μL proteinskog ekstrakta (poglavlje 3.6.1.) i pratila promjenu apsorbancije pri valnoj duljini od 430 nm svakih 15 sekundi u periodu od 2 minute.

Aktivnost PPX u uzorcima sam izračunala pomoću formule:

$$\text{PPX} = \frac{\Delta A \times 4 \times V_{rs} \times F.R.}{V_{uz} \times s \times l \times c} (\mu\text{mol}_{\text{purpurogalina}} \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1})$$

pri čemu je:

ΔA – srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 430 nm tijekom 15 sekundi

4 – faktor korekcije za ΔA za izražavanje rezultata u minuti

V_{rs} – volumen reakcijske smjese (1 mL)

F.R. – faktor razrjeđenja uzorka (1)

V_{uz} – volumen uzorka (0,02 mL)

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

l – duljina optičkog puta (1 cm)

c – koncentracija proteina (mg mL^{-1})

Rezultati su izraženi kao μmol nastalog produkta purpurogalina po mg proteina u minuti i prikazuju srednju vrijednost \pm standardna pogreška dobivenu iz dva nezavisna pokusa po 6 replika.

3.6.5. Mjerenje sadržaja neenzimskih antioksidansa

3.6.5.1. Mjerenje sadržaja prolina

Sadržaj prolina odredila sam metodom prema Bates i sur. (1973). Svježe tkivo korijena ili lista (150 mg) ekstrahirala sam u tarioniku uz dodatak male količine PVP-a i 1,5 mL 3% (w/v) sulfosalicilne kiseline. Dobivene homogenate centrifugirala sam 15 minuta pri 10000 g i $+4^\circ\text{C}$, nakon čega sam supernatante prebacila u čiste mikroeprevete od 1,5 mL i pohranila na ledu do mjerenja.

Za mjerenje sam pripremila otopinu kiselog ninhidrina otapanjem 1,25 g ninhidrina u 30 mL ledene octene kiseline uz dodatak 20 mL 6 M H_3PO_4 , uz zagrijavanje na miješalici do promjene boje iz plave u žutu. Zatim sam u mikroepreveti od 1,5 mL pomiješala 500 μL kiselog

ninhidrina s 500 μL ekstrakta i 500 μL ledene octene kiseline (T.T.T., Hrvatska) te nakon miješanja inkubirala u termobloku 60 minuta pri 95 °C. Reakciju sam zaustavila naglim hlađenjem u ledenoj kupelji, nakon čega sam ekstrakte prebacila u staklene epruvete i dodala po 1,5 mL toluena (Carlo Erba, Njemačka). Nakon 30 sekundi miješanja na vorteksu, pažljivo sam izvukla gornju toluensku fazu u kojoj su ekstrahirane kromoforne skupine, prebacila 900 μL u kvarcnu kivetu i mjerila apsorbanciju pri valnoj duljini od 520 nm. Sadržaj prolina izračunala sam uz pomoć baždarne krivulje dobivene mjerenjem otopina poznatih koncentracija prolina (0,5 – 500 μM). Rezultate sam izrazila kao μmol prolina po gramu svježje tvari, a prikazuju srednju vrijednost \pm standardna pogreška dobivenu iz dva nezavisna pokusa po 6 replika.

3.6.5.2. Mjerenje sadržaja GSH

Sadržaj reduciranog GSH odredila sam prema modificiranoj metodi Salbitani i sur. (2017). Metoda se temelji na reakciji Ellmanovog reagensa (5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzojeva kiselina), DTNB) s tiolnom skupinom GSH pri čemu nastaje obojeni produkt 5-tionitrobenzojeva kiselina (TNB), a količina nastalog produkta mjeri se spektrofotometrijski.

Za mjerenje reduciranog GSH, u kiveti sam pomiješala 100 μL ekstrakta (poglavlje 3.6.5.1.) i 750 μL reakcijske smjese (1,5 mg mL^{-1} DTNB, 0,1 M kalij-fosfatni pufer, pH 7,0 i 1 mM EDTA) i inkubirala na sobnoj temperaturi 20 minuta te potom izmjerila apsorbanciju pri valnoj duljini od 412 nm. Koncentraciju reduciranog GSH očitala sam iz baždarne krivulje dobivene mjerenjem otopina GSH standarda poznatih koncentracija (0,785 – 25 μM). Rezultate sam izrazila kao μmol GSH po gramu svježje tvari, a prikazuju srednju vrijednost \pm standardna pogreška dobivenu iz dva nezavisna pokusa po 6 replika.

3.6.6. Određivanje aktivnosti različitih izoformi antioksidacijskih enzima

3.6.6.1. Razdvajanje proteina poliakrilamidnom gel elektroforezom u nativnim uvjetima

Gel elektroforeza je jedna od najčešćih tehnika za razdvajanje nukleinskih kiselina ili proteina iz smjese, a temelji se na različitim brzinama putovanja nabijenih čestica kroz gel uslijed primjene električnog polja. Za razdvajanje proteina koristi se elektroforeza u poliakrilamidnom gelu (eng. *polyacrylamide gel electrophoresis*, PAGE) kod koje proteini putuju kroz pore u gelu uslijed djelovanja električnog polja. Veličinu pora uvjetuje koncentracija akrilamida i bisakrilamida (Chakavarti i Chakavarti 2008), a proteini se u gelu razdvajaju na temelju razlika u elektroforetskoj pokretljivosti, koju definira njihova molekulska masa i gustoća naboja (Balen i sur. 2011). Gel elektroforeza u nativnim uvjetima podrazumijeva

razdvajanje proteina koji se nalaze u nativnoj formi, odnosno sačuvane konformacije ali i biološke aktivnosti, stoga se ova tehnika može koristiti za analizu aktivnosti pojedinih izoformi enzima (Covian i sur. 2012; Sari i sur. 2011).

Za razdvajanje proteina na gelu koristila sam sustav *PROTEAN® II xi cell* (Bio-Rad, SAD), a elektroforezu sam provodila prema protokolu opisanom u Balen i sur. (2011). Prvo sam pripremila 12%-tni gel za razdvajanje (Prilog 3.), kojega sam izlila između staklenih ploča. Gel sam nadsvodila otopinom 20% (v/v) etanola i boje bromfenol plava (eng. *bromphenol blue*, BFB), kako bih spriječila kontakt otopine gela sa zrakom tijekom polimerizacije. Nakon što se gel polimerizirao, isprala sam ga s dH₂O te na njega izlila pripremljeni 4%-tni gel za sabijanje (Prilog 3.), dodala češljice (debljine 1 mm) za pripremu jažica i ostavila gel da se polimerizira. Staklene ploče s gelovima postavila sam na elektrodni nosač te ih prenijela u kadicu za vertikalnu elektroforezu ispunjenu 1× elektrodnim puferom za nativnu elektroforezu dobivenim razrjeđivanjem 10× elektrodnog pufera (0,25 M Tris, 1,92 M glicin, pH 8,3). Na gelove sam nanosila volumen proteinskih ekstrakata (poglavljje 3.6.1.) koji je odgovarao masi proteina od 90 µg. Prije nanošenja uzoraka u jažice, uzorke sam pomiješala s 20 µL 0,5% (w/v) otopine saharoze (Gram-mol, Hrvatska) i boje BFB. Saharoza zbog svoje velike gustoće osigurava zadržavanje uzoraka u jažicama, dok BFB stvara frontu koja omogućava praćenje tijekom elektroforeze. Elektroforezu sam provodila na +4 °C, prvih 45 minuta pri 100 V, te pri 220 V dok fronta nije došla do donjeg ruba gela. Nakon provedene elektroforeze, gelove sam inkubirala u otopinama sa specifičnim supstratima za vizualizaciju izoformi pojedinih antioksidacijskih enzima.

3.6.6.2. Određivanje aktivnosti izoformi antioksidacijskih enzima

Za određivanje aktivnosti izoformi SOD na gelu, koristila sam modificiranu metodu prema Beauchamp i Fridovich (1971). Nakon provedene elektroforeze (poglavljje 3.6.6.1.), gel sam 25 minuta inkubirala u 50 mM kalij-fosfatnom puferu, pH 7,8 s dodatkom 2,45 mM NBT. Nakon toga gel sam inkubirala 15 minuta u mraku u istom puferu, ali uz dodatak 28 mM TEMED-a i 0,028 mM riboflavina. Gel sam u istoj toj otopini prebacila u transiluminator i izložila svjetlosti (15 W) te inkubirala na sobnoj temperaturi 1 h uz povremeno protresanje. Nakon pojave akromatskih vrpca na ljubičastoj podlozi, gel sam isprala u dH₂O i skenirala.

Izoforme CAT detektirala sam prema modificiranom protokolu od Woodbury i sur. (1971). Gel sam nakon provedene elektroforeze (poglavljje 3.6.6.1.) isprala 3×15 minuta u dH₂O, nakon čega sam ga inkubirala u otopini 0,0003% (v/v) H₂O₂. Potom sam gel kratko isprala u dH₂O i

tretirala otopinom 2% (w/v) FeCl₃ (Carlo Erba, Njemačka) i 2% (w/v) K₃Fe(CN)₆ (Alfa Aesar, SAD) dok se nisu pojavile bijelo-žute vrpce na zelenoj pozadini. Gel sam potom isprala u dH₂O i skenirala.

Za detekciju izoformi APX, elektroforezu sam provela u elektrodnom puferu (poglavlje 3.6.6.1.) s dodatkom 2 mM askorbata prema modificiranom protokolu opisanom u Mittler i Zilinskas (1993). Nakon provedene elektroforeze, gel sam ispirala 3×10 minuta u 50 mM kalij-fosfatnom puferu, pH 7,0 uz dodatak 2 mM askorbata. Gel sam zatim inkubirala 20 minuta u istom puferu uz dodatak 4 mM askorbata i 2 mM H₂O₂, nakon čega sam ga kratko isprala u samom puferu te potom inkubirala u otopini koja je sadržavala 2,45 mM NBT i 28 mM TEMED u 50 mM kalij-fosfatnom puferu, pH 7,8 do pojave akromatskih vrpce na ljubičastoj podlozi, nakon čega sam ga isprala s dH₂O i skenirala.

Za detekciju PPX koristila sam modificiranu metodu prema Maehly i Chance (1954). Nakon provedene elektroforeze (poglavlje 3.6.6.1.), gel sam 30 minuta inkubirala u 50 mM kalij-fosfatnom puferu, pH 7,0 te potom u istom puferu s dodatkom 20 mM pirogalola i 4 mM H₂O₂ do pojave smeđih vrpce na žutoj pozadini. Gel sam skenirala odmah nakon pojave vrpce bez ispiranja jer intenzitet obojenja opada sa stajanjem.

3.6.7. Analize ekspresije proteina

3.6.7.1. Ekstrakcija proteina fenolom

Ekspresiju proteina analizirala sam u korijenu i listu duhana tretiranih samo s najvećim koncentracijama (100 μM) AgNP-PVP, AgNP-CTAB ili AgNO₃ te njihovim kombinacijama s cys. Proteine sam izolirala metodom po Faurobert i sur. (2007) uz manje modifikacije (Pavoković i sur. 2012). U prethodno ohlađenom tarioniku, tučkom sam usitnila 40 mg tkiva korijena ili 50 mg listova u prah uz dodatak 10 mg PVP-a. Na dobiveni prah korijena dodala sam 3 mL ekstrakcijskog pufera pH 8,0 (500 mM Tris, 50 mM EDTA, 700 mM saharoze, 100 mM KCl, 1 mM fenilmetilsulfonil fluorid (eng. *phenylmethylsulfonyl fluoride*, PMSF) i 2% (v/v) β-merkaptoetanol (Alfa Aesar, SAD), a za ekstrakciju listova dodala sam 4 mL istog pufera. Dobivene homogenate prebacila sam u polipropilensku epruvetu od 15 mL, promiješala na vorteksu te posložila horizontalno na led i inkubirala 10 minuta na tresilici. Nakon toga, u svaku epruvetu s proteinskim ekstraktima korijena dodala sam po 3 mL fenola (ROTI® Phenol, ROTH, Njemačka), a proteinskim ekstraktima listova dodala sam po 4 mL fenola, promiješala na vorteksu i inkubirala 10 min na ledu na tresilici. Uzorke sam potom centrifugirala 20 minuta pri 4500 g i 0 °C, nakon čega sam supernatant oprezno pipetom prebacila u čistu epruvetu,

pritom pazeći da ne pokupim međufazu, te dodala 3 (korijen) ili 4 mL (listovi) ekstrakcijskog pufera, promiješala na vorteksu i inkubirala 3 min na tresilici na ledu. Uzorke sam centrifugirala pri već navedenim uvjetima, nakon čega sam supernatante prebacila u čiste polipropilenske epruvete od 50 mL pomoću pipete, pazeći da ne pokupim donju fazu. Na uzorke sam dodala 4× veći volumen hladne precipitacijske otopine (0,1 M amonijev acetat u metanolu), promiješala sadržaj epruvete laganim okretanjem te ostavila na precipitaciji preko noći na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Sljedeći dan precipitirane proteine sam dodatno pročistila serijom centrifugiranja i ispiranja taloga proteina. Prvo sam uzorke centrifugirala 30 min pri 4500 g i $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$, a dobivene taloge sam otopila u 3 mL hladne precipitacijske otopine, prebacila u polipropilenske epruvete od 15 mL te ponovila postupak centrifugiranja i ispiranja taloga još 3× po 15 minuta pri već navedenim uvjetima. Nakon zadnjeg centrifugiranja, taloge sam otopila u 3 mL hladnog acetona, ponovno centrifugirala pri istim uvjetima te zatim izbacila aceton, epruvete polegnula horizontalno i taloge osušila 1 minutu u digestoru. Pročišćene proteine u talogu sam potom resuspendirala u 500 μL pufera za izoelektrično fokusiranje (IEF) sastavljenog od 9 M uree i 4% (w/v) 3-((3-kolamidpropinil) dimetilamonijev)-1-propansulfata (eng. 3-((3-cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonate, CHAPS) (Roche, Švicarska) uz dodatak 2 mg mL^{-1} ditiotreitola (DTT) (Roth, Njemačka) i 5,2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ amfolita. Otopljene taloge sam prebacila u mikroeprevete od 1,5 mL i 5 minuta centrifugirala pri 20000 g i $23\text{ }^{\circ}\text{C}$, nakon čega sam supernatante prebacila u čiste mikroeprevete od 1,5 mL i čuvala na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do analiza.

Koncentraciju ukupnih topivih proteina odredila sam modificiranom Bradfordovom metodom (Ramagli i Rodriguez 1985), koja se temelji na zakiseljavanju uzoraka, čime se omogućuje vezanje boje CBB na proteine bez interferencija koje mogu izazvati sastojci IEF pufera (urea, amfoliti, neionski surfaktanti i tiolni spojevi). U polipropilenskim epruvetama od 15 mL pripremila sam reakcijsku smjesu – pomiješala sam 10 μL 0,1 M HCl, 20 μL proteinskog ekstrakta, 70 μL ultra-čiste vode i 3,5 mL radne Bradford otopine (poglavlje 3.6.1.). Uzorke sam kratko promiješala na vorteksu te inkubirala u mraku 10 minuta, nakon čega sam izmjerila apsorbanciju pri valnoj duljini od 595 nm. Kao slijepu probu koristila sam reakcijsku smjesu u koju sam umjesto proteinskog ekstrakta dodala 20 μL IEF pufera. Koncentraciju proteina u uzorcima izračunala sam pomoću baždarne krivulje dobivene mjerenjem apsorbanacija otopina BSA poznatih koncentracija (0,2 – 2,0 mg mL^{-1}), pripremljenih u IEF puferu.

Ovako pripremljene uzorke koristila sam za analizu ekspresije ukupnih topivih proteina nakon razdvajanja elektroforetskim tehnikama, te za analizu ekspresije enzima SOD, CAT, APX i peroksidaze iz hrena (eng. *horseradish peroxidase*, HRP) nakon prijenosa na membranu.

3.6.7.2. Elektroforetsko razdvajanje proteina

Najčešća korištena elektroforetska tehnika za analizu proteina je natrijev dodecil sulfat-poliakrilamid gel elektroforeza (eng. *sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) koja uključuje uporabu anionskog detergenta SDS-a za otapanje, denaturaciju i disocijaciju proteina, čime polipeptidni lanci postaju negativno nabijeni, što omogućuje razdvajanje polipeptida na temelju njihove relativne molekulske mase (Laemmli, 1970).

SDS-PAGE provodila sam u sustavu *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* (Bio-Rad, SAD), prema protokolu opisanom u Balen i sur. (2011). Sastav gelova opisan je u Prilogu 4. Prije nanošenja na gel, proteinske ekstrakte (poglavlje 3.6.7.1.) pomiješala sam s puferom za denaturaciju (eng. *sample buffer*, SB; 187,5 mM Tris-HCl, 20% (v/v) glicerol, 6% (w/v) SDS, 5% (v/v), β -merkaptoetanol, 0,1% BFB) (Laemmli, 1970) u omjeru 5:1 te inkubirala 5 minuta na 95 °C u termobloku. U svaku jažicu sam nanijela volumen proteinskog ekstrakta koji je sadržavao 14 μ g proteina za vizualizaciju proteinskih vrpca bojom CBB, odnosno 6 μ g proteina za vizualizaciju srebrovim nitratom. Kao biljeg molekulskih masa koristila sam *ColorBURST™ Electrophoresis Marker*. Elektroforezu sam provodila na sobnoj temperaturi u 1 \times razrijeđenom elektrodnom puferu za SDS-PAGE elektroforezu (0,25 M Tris, 1,92 M glicin i 10% (w/v) SDS, pH 8,3), prvih 15 minuta pri naponu od 100 V, te 190 V do završetka elektroforeze.

3.6.7.3. Vizualizacija proteina bojom *Coomassie Brilliant Blue*

Za vizualizaciju proteinskih vrpca u gelu, koristila sam boju CBB kako je opisano u Balen i sur. (2011). Nakon završene elektroforeze (poglavlje 3.6.7.2.), gel sam inkubirala u otopini CBB (0,1% (w/v) CBB R-250, 45% (v/v) etanol, 10% (v/v) ledena octena kiselina) 1 h na tresilici pri sobnoj temperaturi. Nakon toga gel sam ispirala u otopini za odbojavanje (10% (v/v) octena kiselina i 10% (v/v) metanol) pri istim uvjetima, do pojave plavih proteinskih vrpca na prozirnog gelu. Otopinu za odbojavanje sam nekoliko puta promijenila. Gel sam pohranila u 10%-tnu (v/v) otopinu octene kiseline do skeniranja i daljnje analize detektiranih vrpca.

3.6.7.4. Vizualizacija proteina srebrovim nitratom

Vizualizaciju proteina s AgNO_3 provela sam prema postupku opisanom u Blum i sur. (1987). Nakon provedene elektroforeze (poglavlje 3.6.7.2.), gelove sam fiksirala u otopini koja je sadržavala 30% (v/v) etanola, 12% (v/v) octene kiseline i 0,5% (v/v) formaldehida, 1 h na tresilici pri sobnoj temperaturi. Nakon toga, gelove sam ispirala otopinom 30%-tnog (v/v) etanola 3×20 minuta pri istim uvjetima. Uslijedila je obrada gelova 0,02%-tnom otopinom natrijevog tiosulfata ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (T.T.T., Hrvatska) 1 minutu. Nakon kratkog ispiranja u ddH_2O , gelove sam inkubirala u otopini za impregnaciju (0,2% (w/v) AgNO_3 i 0,075% (v/v) formaldehida), 20 minuta na sobnoj temperaturi na tresilici. Na kraju sam dodala otopinu za razvijanje (6% (w/v) natrijevog karbonata (Na_2CO_3) (Kemika, Hrvatska); 0,05% (v/v) formaldehida; 0,0004% (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), inkubirala uz protresanje rukom do pojave smeđih vrpca, nakon čega sam reakciju zaustavila naglim zakiseljavanjem dodatkom otopine 50% (v/v) etanola i 12% (v/v) octene kiseline. Gel sam zatim skenirala za analizu proteinskih vrpca.

3.6.8. Imunodetekcija antioksidacijskih enzima

3.6.8.1. SDS-PAG elektroforeza i prijenos proteina na membranu

Proteine dobivene ekstrakcijom fenolom (poglavlje 3.6.7.1.) razdvojila sam SDS-PAG elektroforezom, kako je opisano u poglavlju 3.6.7.2. U prvu jažicu nanijela sam 2 μL biljega molekularskih masa *ColorBURST™ Electrophoresis Marker*. Za razdvajanje i detekciju enzima SOD, CAT i APX, koristila sam 12%-tne poliakrilamidne gelove za razdvajanje (Prilog 4.), na koje sam nanijela volumen uzoraka koji odgovara masi od 14 μg proteina, a za detekciju enzima HRP koristila sam 10%-tni gel (Prilog 4.) i nanijela volumen koji odgovara 12 μg proteina.

Nakon elektroforeze, gelove sam prebacila na nitroceluloznu membranu (Amersham™ Protran®, veličina pora 0,45 μm) metodom mokrog prijenosa i položila između Whatmann filtera papira i spužvice sa svake strane, te sve zajedno prenijela u plastični okvir, učvrstila i prenijela u vertikalni sustav za elektroprijenos *Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad, SAD) na način da je membrana bila okrenuta prema anodi. Nitroceluloznu membranu sam prethodno namočila u pufer za prijenos (29 mM Tris-HCl, 192 mM glicin, 10% (v/v) metanol, pH 8,3), u kojem se prijenos izvodio. Sustav za prijenos sam zatim prebacila u kadu koju sam nadopunila hladnim puferom za prijenos te postavila posudu s ledom za dodatno hlađenje. Prijenos se odvijao 1 h na 60 V, nakon čega sam uspješnost prijenosa provjerila bojanjem bojom *Rouge Ponceau S* (0,5% (w/v) *Rouge Ponceau S*, 1% (v/v) octena kiselina), koja se reverzibilno veže na proteine. Membrane sam isprala s ddH_2O , a zatim sam grafitnom

olovkom ucrtala položaje biljega molekulskih masa, te potom dodatno odbojila membrane u 25 mL pufera 1× TBS (eng. *Tris-buffered saline*; 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5).

3.6.8.2. Obrada membrana antitijelima i detekcija

Nakon prijenosa, membrane sam blokirala kako bih spriječila nespecifično vezanje antitijela. Za detekciju izoformi enzima CAT i APX, membrane sam inkubirala u otopini za blokiranje sastava: 1× PBS pufer (poglavlje 3.6.3.2.), 1% (v/v) Tween 20 i 2% (w/v) bezmasnog mlijeka u prahu. Membranu za detekciju izoformi enzima SOD blokirala sam u istoj otopini, ali uz dodatak 5% (w/v) bezmasnog mlijeka u prahu, dok sam za blokiranje membrane za detekciju enzima HRP koristila 10% (w/v) mlijeko.

Blokiranje membrana je provedeno u Petrijevim zdjelicama, 1 h, pri sobnoj temperaturi na tresilici, nakon čega je uslijedila inkubacija u otopinama primarnih antitijela (Agrisera, Švedska) pripremljenim u otopini za blokiranje (Prilog 5.) 1 h pri sobnoj temperaturi na tresilici, a zatim preko noći na +4 °C. Sljedeći dan, membrane sam ispirala 3×15 minuta u otopini za blokiranje te potom inkubirala 1 h u otopini sekundarnog antitijela (Prilog 5.), pri sobnoj temperaturi na tresilici. Membrane sam potom ispirala u otopini sastava: 1× PBS pufer i 1% (v/v) Tween 20, 2×10 minuta, nakon čega sam proteinske vrpce detektirala otopinom za kemiluminiscenciju *Western-Sure® Chemiluminescent Substrate* (LI-COR Biosciences, SAD) na uređaju *C-DiGit Chemiluminescence Western Blot Scanner* (LI-COR Biosciences, SAD). Za analizu intenziteta proteinskih vrpce koristila sam računalni program *Image Studio Lite 5.2* (LI-COR Biosciences, SAD). Za kontrolu nanošenja uzoraka (eng. *loading control*) koristila sam antitijelo za β-aktin (ACT), protein staničnog citoskeleta veličine oko 45 kDa koji ima konstitutivnu ekspresiju u svim tipovima stanica, odnosno ekspresija mu nije podložna značajnim promjenama uslijed tretmana. Intenzitete signala proteina SOD, CAT, APX i HRP normalizirala sam prema signalu proteina ACT, a dobivene rezultate sam prikazala kao srednje vrijednosti relativnog intenziteta ± standardna pogreška, dobivene u tri nezavisna pokusa.

3.7. Analiza ranog fiziološkog odgovora *in situ* i detekcija AgNP u tkivu primjenom fluorescencijske konfokalne mikroskopije

Primjenom specifičnih fluorescentnih proba u kombinaciji s konfokalnom mikroskopijom ispitala sam pojavu oksidacijskog stresa u tkivu korijena i lista biljaka duhana *in situ*, nakon kratkotrajnog tretmana sa 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, te njihovim kombinacijama s cisteinom.

Nakon uzgoja odraslih biljaka duhana (opisano u poglavlju 3.3.), izrezala sam mali dio vršnog dijela korijena te izradila lisne diskove promjera od oko 1 cm i prebacila ih u mikrotitarske pločice s dubokim jažicama. U jažice sam dodala 1 mL 100 μ M otopine odgovarajućeg tretmana (Prilog 2.) i inkubirala 24 h u komori za uzgoj biljnih kultura u uvjetima opisanim u poglavlju 3.3. Nakon toga, korijen i lisne diskove sam isprala 3 \times s ultra-čistom vodom i inkubirala u otopinama s odgovarajućim fluorescentnim probama.

Za detekciju $O_2^{\cdot-}$, tkivo korijena ili listova inkubirala sam u 1 mL 10 μ M otopine DHE u ultra-čistoj vodi, 10 minuta u mraku. DHE iskazuje svojstvo plave fluorescencije kada se nalazi u citosolu, dok ga $O_2^{\cdot-}$ ne oksidira u hidroetidij (EOH), koji može interkalirati između parova baza u molekuli DNA, pri čemu mu se apsorpcijski i emisijski spektri pomiču prema području crvene svjetlosti (McLennan i Esposti, 2000). Nakon inkubacije u DHE, uzorke sam analizirala konfokalnim laserskim pretražnim mikroskopom (eng. *confocal laser scanning microscope*, CLSM), (Leica SP8, Njemačka) s laserskom pobudnom linijom od 405 nm, pri čemu sam vrijednosti valne duljine pobuđujuće svjetlosti namjestila na 500 nm, a emitirane svjetlosti na 580 nm. Negativna kontrola pripremljena je na isti način kao i uzorci, ali bez dodatka DHE.

Za detekciju H_2O_2 , u jažice s tkivnim prerezima dodala sam 1 mL 50 μ M otopine H_2DCF -DA u ultra-čistoj vodi i inkubirala 10 minuta u mraku. H_2DCF -DA može lako difundirati u stanice gdje ga stanične esterase deacetiliraju u nefluorescentni spoj 2',7'-diklorodihidrofluorescein (H_2DCF), dok u prisutnosti H_2O_2 , H_2DCF brzo oksidira u visoko fluorescentni 2',7'-diklorofluorescein (DCF) (McLennan i Esposti, 2000; Yang i sur. 2014). Analiza uzoraka provedena je na istom mikroskopu, pri čemu sam vrijednosti valne duljine pobuđujuće svjetlosti namjestila na 504 nm, a emitirane svjetlosti na 550 nm. Negativna kontrola pripremljena je na isti način kao i uzorci, ali bez dodatka H_2DCF -DA.

Za detekciju GSH koristila sam probu MCB koja sama nema svojstvo fluorescencije, ali u interakciji sa staničnim GSH tvori fluorescentni adukt MCB-GSH u reakciji koju katalizira enzim GST (Fernández-Checa i Kaplowitz 1990). U jažice s tkivnim prerezima dodala sam 1 mL 50 μ M otopine MCB u ultra-čistoj vodi i inkubirala 10 minuta u mraku. Nakon toga, uzorke sam analizirala istim mikroskopom, ali ovoga puta sam kao izvor pobuđujuće svjetlosti koristila multifotonski pulsirajući laser (Chameleon Discovery TPC, 80 Mhz, 140 ± 10 fs), pri čemu sam valnu duljinu pobuđujuće svjetlosti namjestila na 720 nm, a emisijski signal je filtriran pomoću SP680 dikroidnog zrcala 560 te pomoću filtera propuštanja 525/50 i 610/70. Negativna kontrola je pripremljena na isti način kao i uzorci, ali bez dodatka MCB.

Vijabilnost stanica analizirala sam bojanjem tkiva bojom PI, koji interkalira između baza u molekuli DNA, ali budući su membrane živih stanica nepropusne za PI, selektivno se koristi za detekciju mrtvih stanica. Nakon što se boja veže, njena fluorescencija se pojačava 20 do 30 puta, a maksimum ekscitacije fluorescencije pomaknut je ~30 – 40 nm u crveni dio spektra (Dengler i sur. 1995; Krishan, 1990). Za određivanje sadržaja mrtvih stanica u uzorcima korijena i listova, u jažice sam dodala 1 mL 25 μ M otopine PI i inkubirala 10 minuta u mraku, nakon čega sam ponovo koristila lasersku pobudnu liniju od 405 nm, a vrijednosti valnih duljina pobuđujuće i emitirane svjetlosti bile su namještene na 543 i 620 nm. Negativna kontrola bili su uzorci bez dodatka PI, tretirani i analizirani pri istim uvjetima.

Vremena ekspozicije bila su postavljena tako da se dobije optimizirana slika s minimalnim pozadinskim signalom. Slike su dobivene optičkim rezovima debljine 30 nm tako da je konačni rezultat bio preklapanje signala kroz sve vidljive dijelove promatranih ravnina duž z-osi. Za odvajanje kratkoživućeg signala autofluorescencije (koji potječe od klorofila ili sekundarnih metabolita) od signala ciljane probe, koristila sam postavku filtracije signala na temelju vremena života fluorescencije. Dobivene slike su obrađene u programu *Leica LAS X* (Leica, Njemačka), a intenzitet signala određen je u programu *Lucida 6.0* (Wirral, UK).

Na temelju intrinzičnog svojstva fluorescencije AgNP pri valnoj duljini od 465 nm (Alqudami i Annapoorni, 2007), moguće ih je detektirati u tkivu primjenom fluorescencijske mikroskopije. Primjenom modula za mjerenje života fluorescencije (eng. *fluorescence-lifetime imaging microscopy*, FLIM) moguće je napraviti distinkciju različitih fluorofora u biljci, te razlučiti AgNP od drugih spojeva koji emitiraju fluorescenciju pri sličnim valnim duljinama (Datta i sur. 2020). Uzorke korijena duhana tretirane s AgNP ili AgNO₃ na način opisan na početku ovog poglavlja, analizirala sam istim mikroskopom, primjenom multifotonskog pulsirajućeg lasera (Chameleon Discovery TPC, 80 Mhz, 140 \pm 10 fs), pri čemu sam valnu duljinu pobuđujuće svjetlosti namjestila na 740 nm, a emisijski signal je filtriran pomoću SP680 dikroidnog zrcala 560 te pomoću filtera propuštanja 525/50 i 610/70, pri čemu su za detekciju signala korišteni HyD detektori (Leica). Za mjerenje života fluorescencije koristila sam Becker i Hickl SPC-150 modul, koristeći vremenski korelirano brojenje pojedinačnih fotona u periodu od 300 sekundi (eng. *time-correlated single photon counting*, TCSPC).

3.8. Ispitivanje utjecaja AgNP na parametre fotosinteze

3.8.1. Mjerenje fluorescencije klorofila *a*

Za mjerenje fluorescencije klorofila *a* koristila sam metodu saturacijskog pulsa (Klughammer i Schreiber 1994) primjenom uređaja FluorPen FP100 (Photon Systems Instruments, Češka). Listove tretiranih i kontrolnih biljaka prvo sam 30 minuta adaptirala na tamu kako bih odredila minimalnu fluorescenciju (F_0). U tim uvjetima reakcijski centri PSII su otvoreni a molekule plastokinona oksidirane. List sam obasjala modrom svjetlošću (455 nm) vrlo niskog intenziteta (oko $1 \mu\text{mol fotona m}^{-2} \text{s}^{-1}$), što je nedovoljno za pokretanje fotokemijskih reakcija. Nakon kratke primjene saturacijskog svjetlosnog pulsa ($2100 \mu\text{mol fotona m}^{-2}\text{s}^{-1}$), izmjerena je maksimalna fluorescencija (F_m). U tom su trenutku svi reakcijski centri zatvoreni i molekule plastokinona reducirane. Iz dobivenih vrijednosti izračuna se maksimalni kvantni prinos PSII. Do kraja pokusa, listove sam izlagala svjetlosti $100 \mu\text{mol fotona m}^{-2}\text{s}^{-1}$, koja je dovoljno jakog intenziteta za odvijanje fotosinteze. U tom dijelu pokusa se u određenim vremenskim intervalima primjenjuju saturacijski pulsevi, pri čemu se bilježe vrijednosti maksimuma fluorescencije (F'_m) i fluorescencije ravnotežnog stanja (F_s). Mjerenje je trajalo 10 minuta, odnosno dok se vrijednosti F'_m i F_s nisu ustalile. Nakon toga sam listove ponovno obasjala svjetlošću vrlo niskog intenziteta kako bih izmjerila vrijednost F'_0 . Parametri fluorescencije klorofila *a* određeni su prema Maxwell i Johnson (2000) prema sljedećim izrazima:

1. Maksimalni kvantni prinos PS II:

$$(F_m - F_0) / F_m = F_v / F_m$$

pri čemu je F_v razlika između maksimalne i minimalne fluorescencije. Omjer varijabilne i maksimalne fluorescencije u listu prilagođenom na uvjete tame mjera je maksimalnog kvantnog prinosa PSII, tj. njegove učinkovitosti u uvjetima kada su svi reakcijski centri oksidirani. Za većinu biljnih vrsta optimalna vrijednost iznosi otprilike 0,83.

2. Efektivni kvantni prinos PSII (Φ_{PSII}):

$$\Phi_{PSII} = (F'_m - F_s) / F'_m$$

koji predstavlja udio svjetlosne energije apsorbirane klorofilom vezanim uz PSII i iskorištene u fotokemijskim reakcijama.

3. Fotokemijsko gašenje (eng. *photochemical quenching*, *qP*):

$$qP = (F'_m - F_s) / (F'_m - F'_0)$$

koje ovisi o udjelu oksidiranih reakcijskih centara na PSII i redoks-stanju primarnog akceptora elektrona PSII (plastokinona).

4. Nefotokemijsko gašenje (eng. *nonphotochemical quenching*, *NPQ*):

$$NPQ = (F_m - F'_m) / F'_m$$

koje odražava gubitak energije u obliku topline.

3.8.2. Određivanje sadržaja fotosintetskih pigmenata

Svježe tkivo lista homogenizirala sam u 96% (v/v) hladnom acetonu s 0,3 mg mL⁻¹ kalcijevog karbonata (CaCO₃), a ekstrakciju sam provodila u polumraku. Pigmente sam razdvojila tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (eng. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) (Perkin Elmer, SAD) primjenom reverzno fazne kolone *Zorbax ODS* (4,6×250 mm, 5 μm veličina čestica) (Agilent Technologies, SAD) s detektorom s nizom dioda (eng. *diode array detector*, DAD) na koloni. Za eluciju pigmenata koristila sam metodu koju su opisali Thayer i Björkman (1990) s manjim izmjenama. Kolonu sam prvo ispirala sa 100%-tnom otopinom A (smjesa acetonitril/metanol/H₂O u omjeru 84:12:4) 2 minute, nakon čega je uslijedilo eluiranje u linearnom gradijentu sa 100%-tnom otopinom B (metanol/etil acetat u omjeru 68:32) 14 minuta, a zatim izokratno eluiranje 9 minuta pri brzini protoka od 1 mL min⁻¹. Pigmenti neoksantin, violaksantin, anteraksantin, zeaksantin, lutein, β-karoten, klorofil *a* i klorofil *b* detektirani su mjerenjem apsorbancija na valnoj duljini od 440 nm i kvantificirani prema poznatim standardima (DHI Water and Environment, Danska). Sadržaji fotosintetskih pigmenata i njihovi omjeri izraženi su kao % od kontrole. Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti ± standardna pogreška dobivenih iz tri nezavisna pokusa, svaki s po tri replike.

3.8.3. Analize ultrastrukture kloroplasta

Tkivni prerezi lista pripremljeni su na način opisan u poglavlju 3.5.2. Promjene ultrastrukture kloroplasta analizirala sam elektronskim mikroskopom Morgagni 268D (FEI, Nizozemska) pri naponu od 70 kV.

3.9. Analiza diferencijalne ekspresije proteina dvodimenzionalnom elektroforezom

Analiza promjena u ekspresiji proteina uslijed određenog tipa tretmana moguća je primjenom tehnika dvodimenzionalne elektroforeze (2D-E), koja se temelji na razdvajanju

proteina prema naboju metodom izoelektričnog fokusiranja (IEF) u prvoj dimenziji, zatim prema relativnoj molekularnoj masi primjenom SDS-PAGE elektroforeze u drugoj dimenziji. Identifikaciju tako razdvojenih proteina moguće je provesti tehnikom spektrometrije masa (Balen i sur. 2011).

3.9.1. Prva dimenzija - IEF

Proteinske ekstrakte pripremljene na način opisan u poglavlju 3.6.7.1. razrijedila sam u IEF puferu do konačnog volumena od 400 μL u kojem je sadržana jednaka masa proteina. Uzorke sam zatim pomiješala s 5 μL boje BFB i centrifugirala na 20000 g pri sobnoj temperaturi te ih prebacila u zasebne jažice u posudu za rehidraciju imobilina (eng. *immobiline drystrip*) (Cytiva, Švedska). U svaku jažicu sam potom položila jedan imobilin duljine 13 cm s nelinearnim gradijentnim gelom (pH 3-10). Svaku jažicu prekrila sam s 900 μL mineralnog ulja (*Immobiline DryStrip Cover Fluid*, GE Healthcare, SAD), koje služi kao zaštita od isušivanja. Rehidracija je trajala 16 h na sobnoj temperaturi.

Nakon rehidracije, imobiline sam prebacila na keramičku podlogu uređaja *Ettan IPHphore 3* (GE Healthcare, SAD) u skladu s njihovom dužinom i orijentacijom. Na krajeve imobilina dodala sam elektrodne papiriće koje sam prethodno namočila u 150 μL dH_2O i na njih postavila elektrode. Cijelu keramičku podlogu prelila sam sa 110 mL mineralnog ulja i pokrenula IEF prema programu u skladu s veličinom i brojem imobilina, pri čemu je kraj označio prelazak 30 kVhT. Nakon završetka prve dimenzije, imobiline sam pohranila na $-80\text{ }^\circ\text{C}$ preko noći.

3.9.2. Druga dimenzija - SDS-PAGE

Prije razdvajanja proteina u drugoj dimenziji, provela sam postupak ekvibracije imobilina kako bih osigurala da su proteini denaturirani i da im je nativni naboj maskiran vezanjem SDS-a (Balen i sur. 2011) kako je opisano u poglavlju 3.6.7.2. Imobiline sam otopila i prebacila u plastičnu posudu s jažicama. Na svaki imobilin dodala sam 2,5 mL pufera za ekvibraciju (0,05 M Tris-HCl, pH 8,8, 6 M urea, 2% (w/v) SDS) s dodatkom 130 mM DTT-a (za redukciju disulfidnih veza između polipeptidnih lanaca) i inkubirala 15 minuta na tresilici. Nakon toga, imobiline sam lagano ocijedila i prebacila u čiste jažice te dodala 2,5 mL ekvibracijskog pufera s dodatkom 135 mM jodacetamida (eng. *iodoacetamide*, IAA; alkiliranjem sulfhidridnih skupina sprječava ponovno stvaranje disulfidnih veza) te inkubirala u istim uvjetima.

Prema tablici u Prilogu 6. pripremila sam poliakrilamidni gel za provođenje SDS-PAG elektroforeze. Imobiline sam kratko isprala u $1\times$ elektrodnom puferu (poglavlje 3.7.7.2.) te ih položila na gel za razdvajanje s tim da sam uz „minus“ (–) stranu imobilina postavila komadić Whatmann filter papira s 5 μ L biljega molekulskih masa *Pierce*TM *Unstained Protein MW Marker* (Thermo Fisher Scientific, SAD). Sve sam nadsvodila s otopinom zagrijane agaroze (0,5% (w/v) agaroz, 0,1% (v/v) BFB, $1\times$ elektrodni pufer do 25 mL) kako bih osigurala dodatno prijanjanje imobilina na gel, a dodatak BFB omogućuje praćenje tijekom elektroforeze. Elektroforezu sam provodila u $1\times$ elektrodnom puferu (poglavlje 3.7.7.2.), u sustavu *PROTEAN II xi Cell* (Bio-Rad, SAD) spojenom na izvor vode kako ne bi došlo do pregrijavanja sustava, prvih 30 minuta na 100 V te na 220 V do kraja.

Nakon elektroforeze, gelove sam inkubirala u otopini CBB (poglavlje 3.6.7.3.), 1 h na tresilici pri sobnoj temperaturi kako bih vizualizirala proteinske mrlje. Gelove sam potom odbojavala kako je opisano u poglavlju 3.6.7.3., skenirala te pohranila u 10% (v/v) octenoj kiselini na +4 °C do daljnjih analiza.

3.9.3. Analiza gelova i odabir proteinskih mrlja za daljnju analizu

Kvalitativnu i kvantitativnu analizu proteinskih mrlja napravila sam računalnim programom *Image Master 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare, SAD). Količina proteina sadržana u pojedinačnim proteinskim mrljama izražena je u obliku volumnog postotka. Na temelju usporedbe volumnog postotka pojedinih proteinskih mrlja u kontrolnim i tretiranim uzorcima za daljnju analizu odabrala sam proteine čija je ekspresija u tretmanima bila $1,5\times$ veća ili manja u odnosu na kontrolu.

3.10. Identifikacija proteina spektrometrijom masa

3.10.1. Priprema uzoraka za digestiju u gelu

Odabrane proteinske mrlje (poglavlje 3.9.3.) izrezala sam iz gela koristeći plastični nastavak za pipetu kojem sam odrezala vrh. Izrezane komadiće gela prebacila sam u mikroeprovete od 1,5 mL s 1 mL otopine za odbojavanje (10% (v/v) octena kiselina i 40% (v/v) metanol) i odbojavala u termobloku pri 23 °C i 700 rpm preko noći, odnosno do potpunog obezbojenja.

3.10.2. Digestija proteina u gelu

Nakon odbojavanja, uklonila sam otopinu za odbojavanje iz mikroeproveta, a komadića gela ispirala 2×5 minuta u 500 μ L otopine 5 mM amonijevog bikarbonata, (NH_4HCO_3), pH 7,8

na termobloku pri 23 °C i 700 rpm. Zadnje ispiranje trajalo je 30 minuta kako bih uklonila zaostali CBB i SDS te pomoću NH_4HCO_3 postigla optimalanu pH vrijednost za djelovanje proteaze tripsina (pH 7,8). Nakon toga, uklonila sam otopinu, komadićima gela dodala 500 μL otopine sastava 50% (v/v) 50 mM NH_4HCO_3 i 50% (v/v) acetonitrila (ACN), te inkubirala sljedećih 30 minuta u termobloku pri 700 rpm i 23 °C. Otopinu sam uklonila i dodala 100 μL 100% (v/v) ACN, te dehidrirala gelove 5 minuta u istim uvjetima. ACN sam potom uklonila uparavanjem u vakuum centrifugi *Concentrator 5301* (Eppendorf, Njemačka) 30 minuta na 45 °C. Osušene komadiće gela prebacila sam u mikroeprevete volumena 200 μL i dodala 10 μL otopine tripsina koncentracije 7 $\mu\text{g mL}^{-1}$, koja je pripravljena otapanjem matične otopine tripsina koncentracije 1 mg mL^{-1} u 25 mM NH_4HCO_3 , pH 7,8. Uzorci su inkubirani preko noći u termobloku na 37 °C i 500 rpm.

3.10.3. Ekstrakcija peptida iz gela

Nakon digestije proteina, provela sam ekstrakciju peptida iz gela. Sadržaj u mikroeprevetama najprije sam centrifugirala (*MiniSpin*, Eppendorf, Njemačka) 20 sekundi, kako bih ga sabila na dno. Zatim sam sav sadržaj otopine prebacila u mikroeprevete od 1,5 mL i uparavala u vakuum centrifugi pri 45 °C do potpunog sušenja. Komadićima gela zaostalim u mikroeprevetama dodala sam 10 μL otopine za ekstrakciju (50% (v/v) otopine 5%-tne trifluoroctene kiseline (eng. *trifluoroacetic acid*, TFA) u ACN), pa ih inkubirala 30 min u ultrazvučnoj kupelji (*Ultrasonic Cell Disruptor XL*, Misonix Inc., SAD) pri sobnoj temperaturi. Mikroeprevete sam dodatno inkubirala 15 minuta u termobloku na 500 rpm pri sobnoj temperaturi, a potom ekstrakte spojila s osušanim tripsinskim puferima, a komadiće gela bacila. Ekstrakte peptida sušila sam u vakuum centrifugi 30 min pri 45 °C te ih zatim pohranila na -80 °C do daljnjih analiza.

3.10.4. Pročišćavanje peptida

Postupak pročišćavanja peptida provela sam na automatiziranom uređaju za pripremu uzoraka *AssayMAP Bravo Automated Liquid Handling Platform* (Agilent Technologies, SAD), upotrebom kromatografskih kolona. Tehnologija *AssayMAP* ima modificiranu 96-kanalnu robotsku „ruku“ opremljenu s preciznim protočnim špricama, koje se spajaju na kromatografske kolone kroz posebnu sondu, a sam postupak pročišćavanja temelji se na principu tekućinske kromatografije obrnutih faza. Kolone C18 (eng. *reversed phase-small*, RP-S) prvo se kondicioniraju nizom otapala rastuće polarosti, nakon čega se na njih nanosi uzorak. Peptidi iz uzorka vežu se na čestice punila elektrostatskim interakcijama, dok se

molekule soli koje se ne vežu na punilo ispiru polarnim otapalom (vodenom otopinom TFA). Peptidi se konačno eluiraju otapalom manje polarosti (vodenom otopinom ACN).

Postupak pročišćavanja započela sam resuspendiranjem osušenih peptida u 50 μL 0,1%-tne (v/v) TFA, a dobivene otopine prebacila sam u jažice mikrotitarskih pločica. U prazne mikrotitarske pločice prebacila sam po 300 μL otopine za kondicioniranje kolone (pripremljeni pufer - 0,1% (v/v) TFA i 50% (v/v) ACN). Drugu mikrotitarsku pločicu napunila sam s 300 μL otopine za ekvilibraciju (0,1% (v/v) TFA), dok sam u treću mikrotitarsku pločicu dodala 100 μL otopine za eluciju peptida s kolone (0,1% (v/v) TFA i 70% (v/v) ACN). Pripremljene mikrotitarske pločice postavila sam u instrument *AssayMAP BRAVO Platform* na točno predviđena mjesta i postavila još dvije prazne mikrotitarske pločice, od kojih je jedna bila predviđena za sakupljanje organskog otapala s kolone, a druga za sakupljanje pročišćenih peptida (eluat). Pokrenula sam program pročišćavanja peptida u trajanju od 40 minuta, prilikom kojeg su kolone prvo kondicionirane sa 100 μL pripremnog pufera brzinom od 300 $\mu\text{L min}^{-1}$, zatim sa 100 μL ekvilibracijskog pufera brzinom od 10 $\mu\text{L min}^{-1}$, nakon čega je uslijedilo nanošenje uzorka (svih 45 μL) brzinom od 5 $\mu\text{L min}^{-1}$ te elucija peptida otopinom za eluciju peptida s kolone, u volumenu od 25 μL brzinom od 3 $\mu\text{L min}^{-1}$. Dobivene pročišćene peptide osušila sam u vakuum centrifugi i koristila za daljnju analizu.

3.10.5. Analiza peptida spektrometrijom masa

Pročišćene i osušene peptide resuspendirala sam u 5 μL matrice (otopina α -ciano-4-hidroksicimetne kiseline (eng. *α -cyano-4-hydroxycinnamic acid*, CHCA) koncentracije 5 mg mL^{-1} (5 mg CHCA u 1 mL 50% (v/v) ACN). Za analizu uzoraka koristila sam matricom potpomognutu ionizaciju uz desorpciju laserskim zračenjem (eng. *matrix-assisted laser desorption/ionization*, MALDI), koja koristi matricu kao nosač peptida, koji se nakon zagrijavanja i fotoionizacije laserom raspršuje u vakuumu spektrometra masa zajedno s peptidima. Ovakav princip ionizacije pogodan je za prevođenje velikih nehlapivih molekula (poput peptida) iz čvrste u plinovitu fazu (Karas i Hillenkamp, 1988).

Po 1 μL uzorka peptida, otopljenih u matrici, nanijela sam na pločicu te nakon sušenja uzorka na zraku, pločicu stavila u spektrometar masa MALDI s analizatorom koji mjeri vrijeme leta (eng. *time of flight*, TOF; 4.800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer, Applied Biosystems, SAD). Dobiveni peptidi u spektrometru masa prvo se ioniziraju, zatim razdvajaju na temelju vrijednosti omjera mase i naboja (m/z) (Steen i Mann, 2004). Odabrani se peptidi zatim izoliraju i fragmentiraju koristeći tandemske tehnike MS/MS, koje daju informaciju o sekvenci proteina

i lokaciji PTM (Aebersold i Mann 2003; Yates i sur. 2009). Analizator TOF daje informaciju o vremenu koje je potrebno pojedinačnoj čestici da prođe kroz uređaj, a brzina prolaska kroz uređaj je direktno vezana uz masu čestica. Parametri analize prikazani su u tablici u Prilogu 7.

3.10.6. Analiza podataka i identifikacija proteina

Dobivene spektre masa MS/MS koristila sam za daljnju pretragu spektralne baze podataka *NCBIprot/green plants* računalnim programom *MASCOT* (verzija 2.1., Matrix Science, UK).

Pomoću posebnih algoritama računalnog programa *ProteinPilot™ Software* (SCIEX, SAD) iz dobivenih podataka identificirala sam proteine iz odgovarajućih proteinskih mrlja, pri čemu sam kao pozitivan rezultat uzimala u obzir samo analize koje su davale razinu pouzdanosti (eng. *confidence*) preko 95%. Pretraživanjem baze podataka *UniProt*, identificirane proteine sam okarakterizirala i pronašla biološke procese u kojima sudjeluju.

3.11. Statistička analiza podataka

Statističku analizu podataka provela sam u programu *STATISTICA 14.0* (TIBCO Software Inc., USA). Podatke dobivene nakon analize tehnikom ICP-MS, fluorimetrijskih i spektrofotometrijskih mjerenja kao i rezultate komet testa, analizirala sam uporabom jednosmjerne analize varijance (eng. *analysis of variance*, ANOVA) za utvrđivanje razlika unutar tretmana i između njih kao i utjecaja dodatka cisteina i samih omotača nakon provedenog post-hoc Duncan testa. Rezultate mjerenja fluorescencije klorofila *a* i sadržaja fotosintetskih pigmenta analizirala sam također primjenom jednosmjerne ANOVA, ali uz korištenje post-hoc testa najmanje značajne razlike (eng. *least significant difference*, LSD). U svim provedenim analizama statistički sam značajnom smatrala razliku pri $p \leq 0,05$.

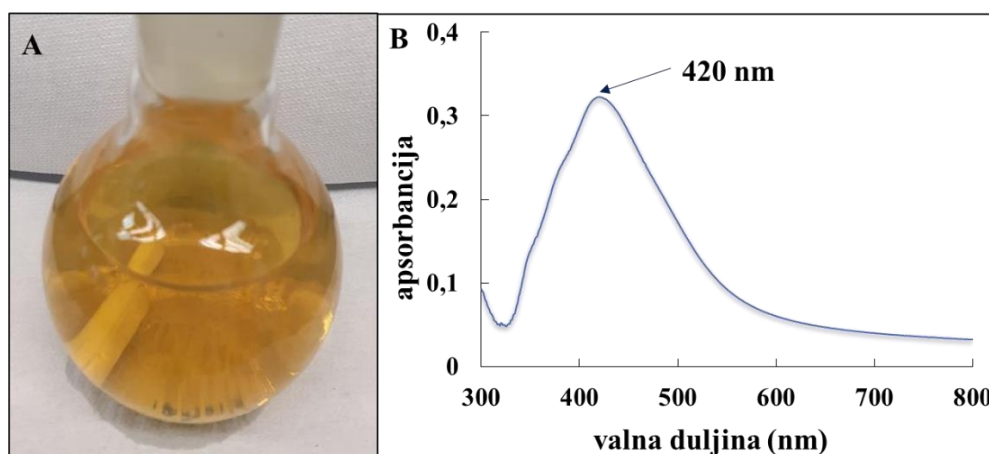
REZULTATI

4. REZULTATI

4.1. Svojstva matičnih suspenzija AgNP-PVP i AgNP-CTAB

4.1.1. Uspješnost sinteze AgNP

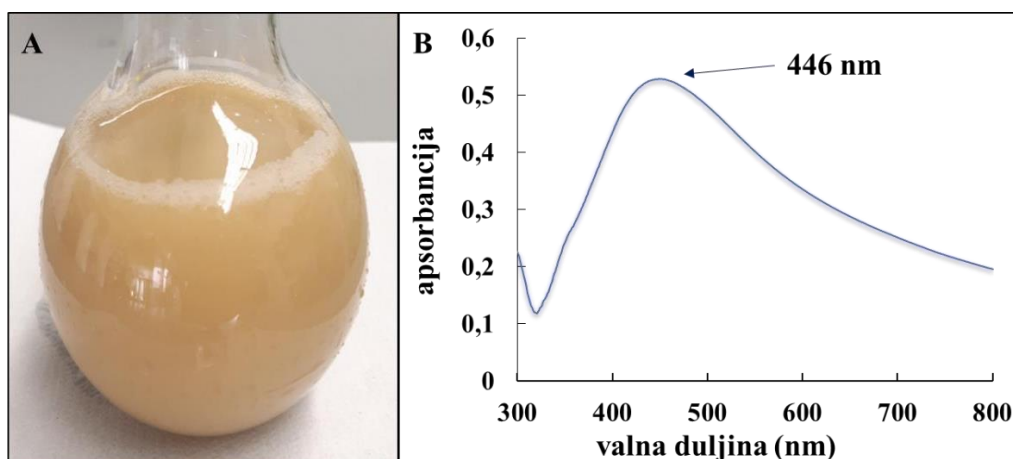
Postupkom kemijske sinteze, redukcijom iona Ag^+ iz ishodišne otopine AgNO_3 , uz dodatak odgovarajućeg omotača (PVP ili CTAB), dobivene su matične suspenzije AgNP-PVP i AgNP-CTAB. Suspenzija AgNP-PVP bila je bistra i žuto-narančaste boje (Slika 10.A). Iz apsorpcijskog spektra prikazanog na Slici 10.B, na temelju širine krivulje, moguće je izvesti zaključak o relativno uskoj distribuciji veličina čestica u suspenziji, pri čemu maksimum apsorpcije pri valnoj duljini od 420 nm ukazuje na uspješnu sintezu AgNP (Kaur i sur. 2021), s najvećim brojem čestica veličine oko 50 nm (Paramelle i sur. 2014).



Slika 10. Izgled **A**) i apsorpcijski spektar **B**) matične suspenzije AgNP-PVP.

Suspenzija AgNP-CTAB bila je mutna i žuto-narančaste boje (Slika 11.A). Apсорpcijski maksimum izmjeren je pri valnoj duljini od 446 nm (Slika 11.B), što ukazuje na uspješnu sintezu AgNP s najvećim brojem čestica veličine oko 70 nm (Paramelle i sur. 2014). Izgled apсорpcijskog spektra (Slika 11.B) ukazuje na široku distribuciju veličina čestica u suspenziji.

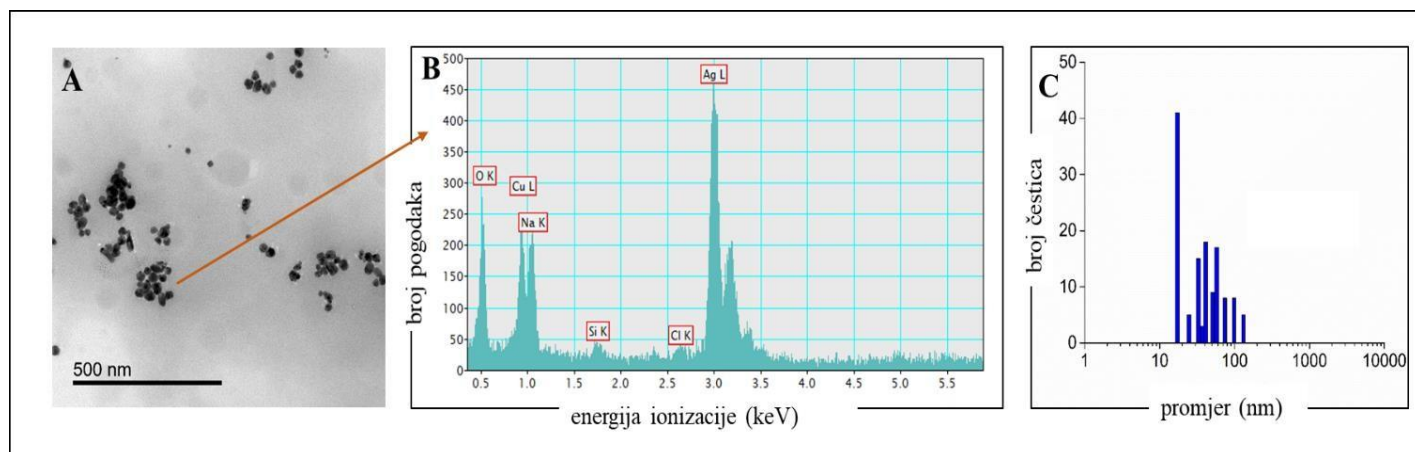
Boja i izgled obje matične suspenzije AgNP u skladu je s literaturom i upućuje na sintezu pretežito sferičnih, ne-agregiranih NP (<https://nanocomposix.com/pages/silver-nanoparticles-optical-properties>).



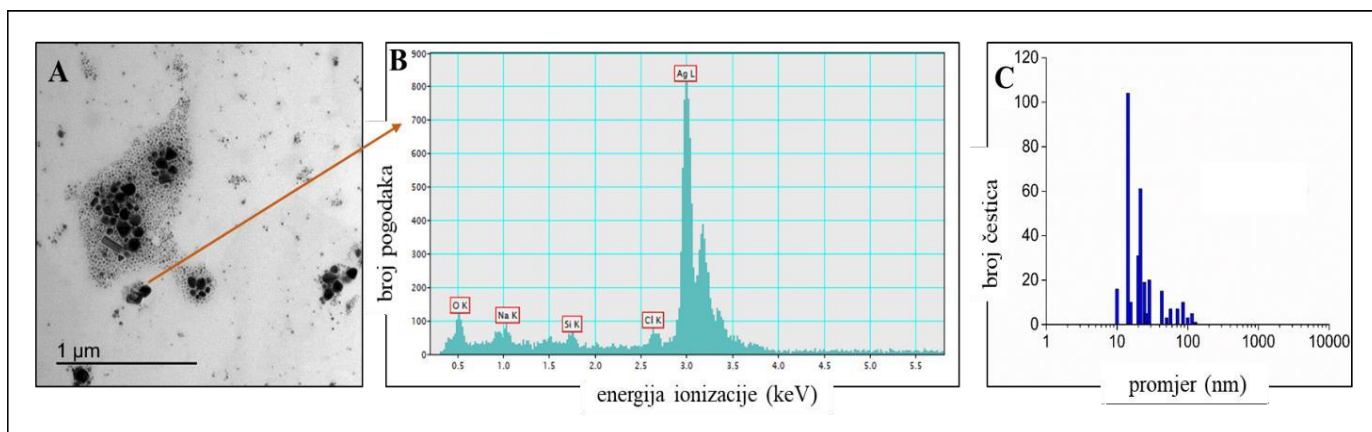
Slika 11. Izgled **A)** i apsorpcijski spektar **B)** matične suspenzije AgNP-CTAB.

4.1.2. Veličina i oblik AgNP

Na mikrografijama suspenzija AgNP-PVP (Slika 12.A) i AgNP-CTAB (Slika 13.A) dobivenih TEM-om vidljive su pretežito sferične NP s manjim udjelom čestica štapićastog oblika. Detektorom EDX analiziran je elementarni sastav pojedinačnih čestica te nedvojbeno potvrđena prisutnost srebra (Slike 12.B i 13.B). Dijagrami distribucije veličina čestica dobiveni iz mikrografija pokazali su srednju veličinu od oko 50 nm za oba tipa AgNP, te prisutnost većeg broja čestica veličine oko 25 nm (Slike 12.C i 13. C).



Slika 12. Matična suspenzija AgNP-PVP analizirana transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM). **A)** mikrografija u svijetlom vidnom polju (bar = 500 nm), **B)** spektar energijski razlučujuće/disperzivne rendgenske spektroskopije (EDX), **C)** dijagram distribucije veličina čestica dobiven analizom mikrografija.



Slika 13. Matična suspenzija AgNP-CTAB analizirana transmisijskim elektronskim mikroskopom (TEM). **A)** mikrografija u svijetlom vidnom polju (bar = 1 μm), **B)** spektar energijski razlučujuće/disperzivne rendgenske spektroskopije (EDX), **C)** dijagram distribucije veličina čestica dobiven analizom mikrografija.

4.1.3. Veličina i naboj AgNP

Mjerenjem distribucije veličina izraženih po volumenu čestica metodom DLS, dobivene su vrijednosti d_H u matičnim suspenzijama AgNP-PVP i AgNP-CTAB. Analiza d_H suspenzije AgNP-PVP pokazala je unimodalnu distribuciju veličina s maksimumom na $57,96 \pm 17,54$ nm (Tablica 1.), što je u skladu s rezultatima dobivenim UV/Vis spektrofotometrijom. Suspenzija AgNP-CTAB pokazala je trimodalnu distribuciju veličina s maksimumom na $55,99 \pm 11,60$ nm koji odgovara rezultatima apsorpcijskog UV/Vis spektra te maksimumom na $28,26 \pm 10,28$ nm (Tablica 1.), koji potječe od manjih čestica vjerojatno sintetiziranih na samom početku uslijed ubrzane redukcije iona Ag^+ u uvjetima suviška reducirajućeg agensa u odnosu na otopinu AgNO_3 . Populacija čestica vrijednosti d_H od $163,30 \pm 85,96$ nm (Tablica 1.) ukazuje na aglomerirane čestice.

Mjerenjem ζ -potencijala metodom ELS određen je efektivni naboj AgNP-PVP i AgNP-CTAB u matičnim suspenzijama. U suspenziji AgNP-PVP izmjeren je ζ -potencijal blizu neutralnom ($-4,24 \pm 2,57$ mV), što je posljedica stabilizacije nenabijenim polimerom (PVP), dok je ζ -potencijal suspenzije AgNP-CTAB od $44,67 \pm 3,36$ mV ukazao na pozitivan naboj čestica koji je posljedica stabilizacije kationskim surfaktantom (CTAB).

Metodom AAS izmjerene su koncentracije ukupnog srebra u matičnim suspenzijama AgNP, koje su iznosile 0,81 mM za AgNP-PVP i 0,88 mM za AgNP-CTAB (Tablica 1.). Dobivene vrijednosti služile su za pripremu radnih otopina za tretman odraslih biljaka duhana.

Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva matičnih suspenzija AgNP-PVP i AgNP-CTAB dobivenih kemijskom sintezom. Hidrodinamički promjer (d_H) dobiven je iz omjera distribucije veličina po volumenu i izražen kao srednja vrijednost 10 mjerenja \pm standardna pogreška, ζ -potencijal izražen je u mV i prikazan kao srednja vrijednost 5 mjerenja \pm standardna pogreška, valne duljine (nm) maksimuma apsorpcije dobivene su UV/Vis spektrofotometrijom, koncentracije srebra u matičnim suspenzijama izražene su u mM i prikazane kao srednja vrijednost tri mjerenja.

Svojstva	AgNP-PVP	AgNP-CTAB
I. distribucija	d_H , nm	57,96 \pm 17,54
	volumni udio, %	100%
II. distribucija	d_H , nm	55,99 \pm 11,60
	volumni udio, %	23,9%
III. distribucija	d_H , nm	163,30 \pm 85,96
	volumni udio, %	58,0%
ζ-potencijal, mV	-4,24 \pm 2,57	44,67 \pm 3,36
Maksimum apsorpcije, nm	420	446
Koncentracija matične suspenzije, mM	0,81	0,88

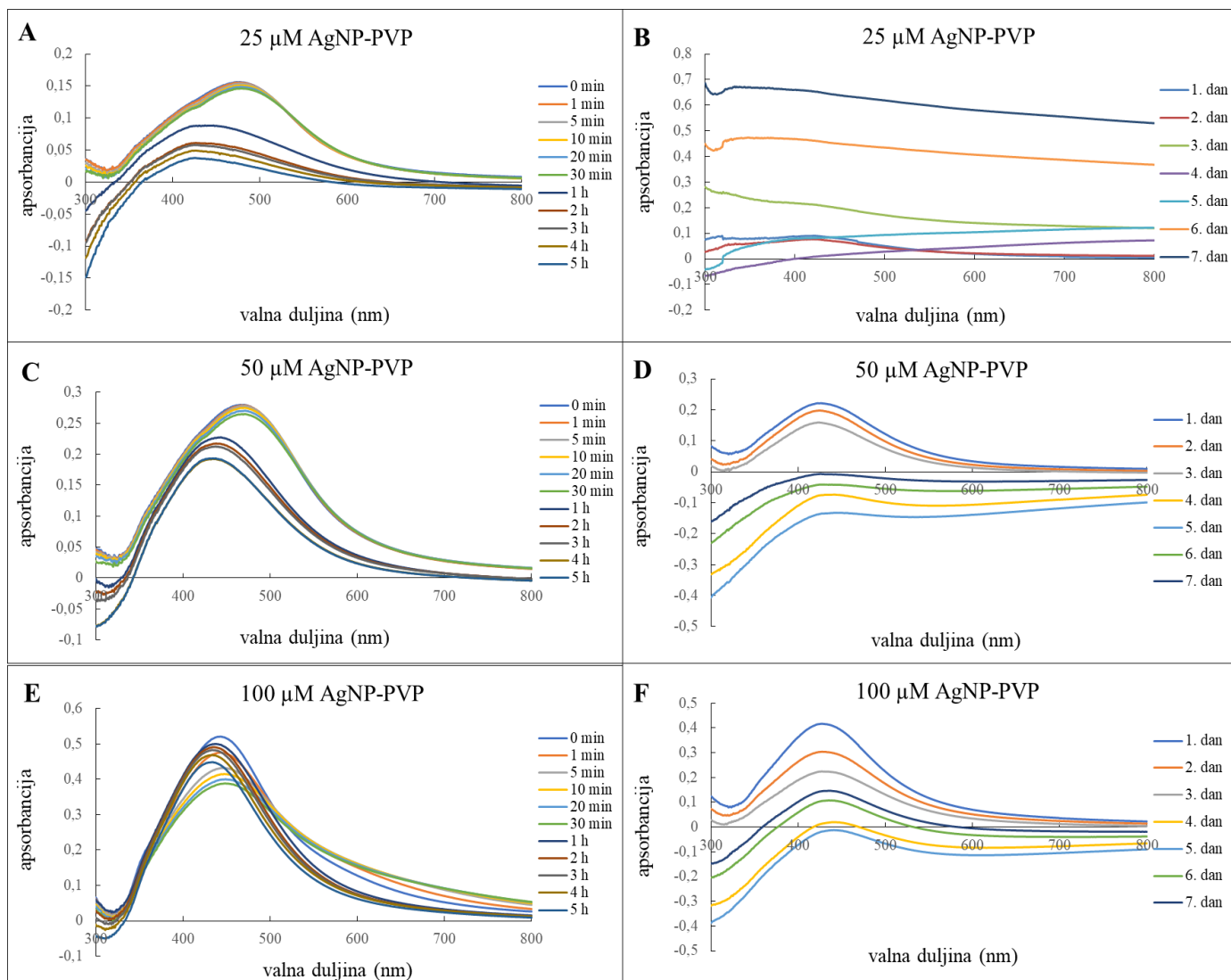
4.2. Stabilnosti AgNP u podlozi ½ MS

4.2.1. Apsorpcijski spektri AgNP

Mjerenjem apsorpcijskog spektra (područje valnih duljina 300-800 nm) suspenzija AgNP-PVP i AgNP-CTAB, samih i u kombinaciji s cisteinom, u tekućoj hranjivoj podlozi ½ MS u određenim vremenskim intervalima u periodu od 7 dana, odredila sam stabilnost AgNP-PVP i AgNP-CTAB.

Odmah po dodatku u podlogu, apsorpcijski maksimum suspenzija AgNP-PVP za sve tri koncentracije pokazao je tzv. *red-shift*, odnosno pomak prema većim valnim duljinama (Slike 14.A,C,E), što ukazuje na brzu aglomeraciju čestica uslijed interakcije s ionima iz hranjive podloge. Pritom je apsorpcijski maksimum bio veći u suspenziji 25 μ M AgNP-PVP (473 nm) u odnosu na 50 μ M (470 nm) i 100 μ M (443 nm) koncentracije. U prvih 30 minuta mjerenja nije došlo do značajnih promjena u položaju apsorpcijskih maksimuma niti za jednu ispitanu koncentraciju. Nakon jednog sata, apsorpcijski maksimum pomakao se prema manjim valnim duljinama (tzv. *blue-shift*) za sve tri koncentracije, ukazujući na djelomično raspadanje aglomerata. Apsorpcijski maksimum zadržao se na valnoj duljini oko 440 nm za sve tri koncentracije AgNP kroz naredna četiri sata mjerenja, dok je apsorpcija s vremenom opadala u suspenzijama 25 i 50 μ M AgNP-PVP, ukazujući na djelomičnu disocijaciju AgNP u ione

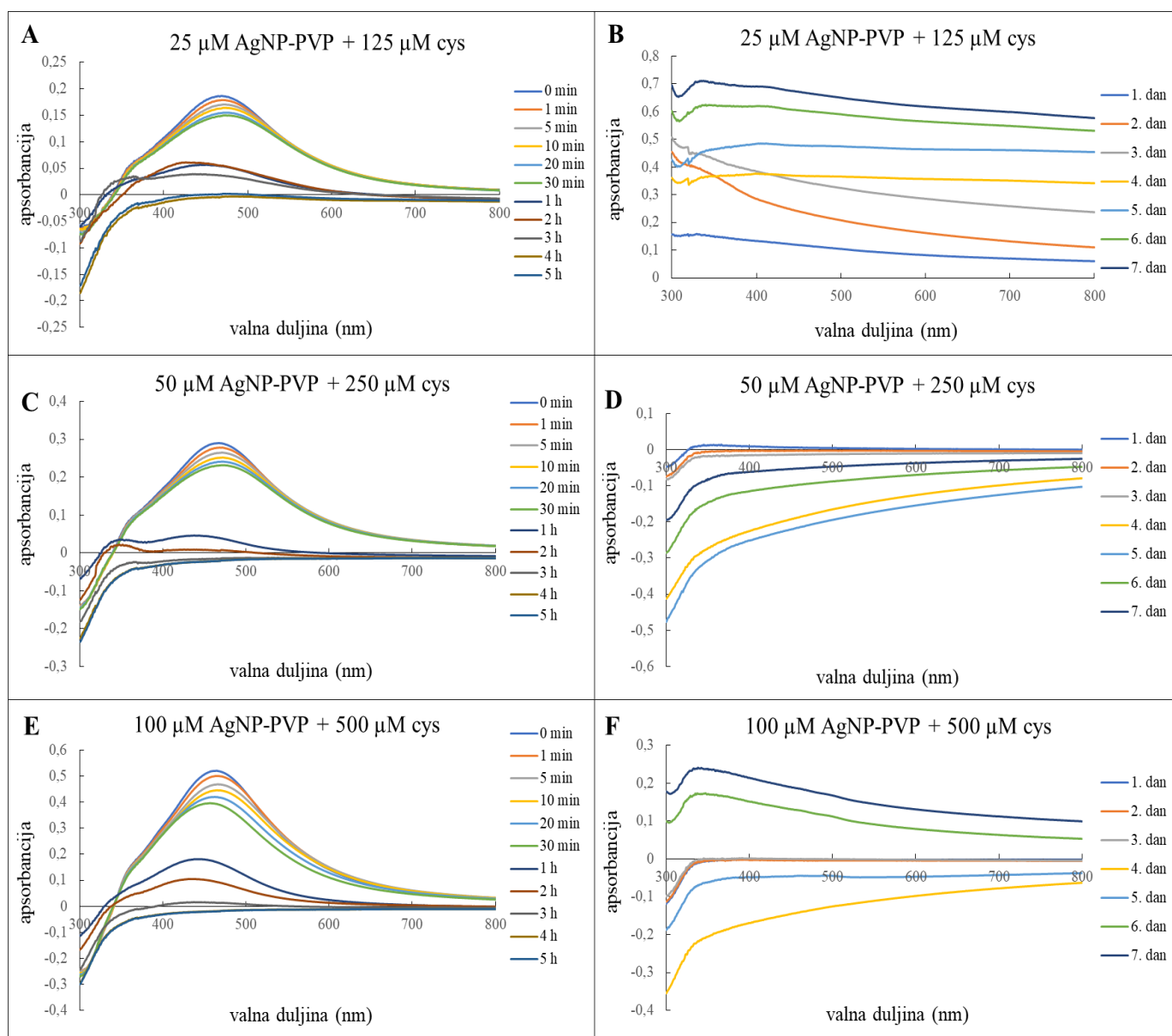
Ag⁺. S druge strane, nakon jednog sata, apsorbanija suspenzije 100 μM AgNP-PVP blago se povećala u odnosu na početno mjerenje i nastavila je rasti u naredna četiri sata mjerenja, što ukazuje na povećanje koncentracije AgNP, najvjerojatnije uslijed sinteze novih NP redukcijom iona Ag⁺ u interakciji sa sastojcima hranjive podloge. Nakon 24 sata, u suspenziji 25 μM koncentracije apsorpcijski maksimum više nije bio vidljiv (Slika 14.B), što ukazuje na potpunu disocijaciju AgNP na ione Ag⁺. U suspenziji 50 μM AgNP-PVP, apsorbanija je opadala u prva tri dana mjerenja, što je bilo popraćeno pomakom položaja apsorpcijskog maksimuma prema manjim valnim duljinama (Slika 14.D); to ukazuje na postepenu disocijaciju AgNP u ione Ag⁺. Nakon 3. dana, u ovoj suspenziji više nije bilo vidljivog maksimuma. U suspenziji 100 μM koncentracije AgNP-PVP, u prva tri dana došlo je do opadanja apsorbanije, popraćene s blagim pomakom apsorpcijskog maksimuma prema manjim valnim duljinama (Slika 14.F) u odnosu na vrijednosti izmjerene u prvih pet sati mjerenja. Mjerenja u 4. i 5. danu nisu pokazala karakterističan maksimum koji ukazuje na postojanje AgNP u suspenziji, nakon čega je u 6. i 7. danu ponovno izmjeren apsorpcijski maksimum na valnoj duljini od 436 nm, ukazujući na ponovnu sintezu AgNP, vjerojatno redukcijom iona Ag⁺ u interakciji sa sastojcima podloge.



Slika 14. Apsorpcijski spektar suspenzija AgNP-PVP u podlozi $\frac{1}{2}$ MS; **A)** 25 μM AgNP-PVP u prvom danu, **B)** 25 μM AgNP-PVP tijekom 7 dana, **C)** 50 μM AgNP-PVP u prvom danu, **D)** 50 μM AgNP-PVP tijekom 7 dana, **E)** 100 μM AgNP-PVP u prvom danu, **F)** 100 μM AgNP-PVP tijekom 7 dana.

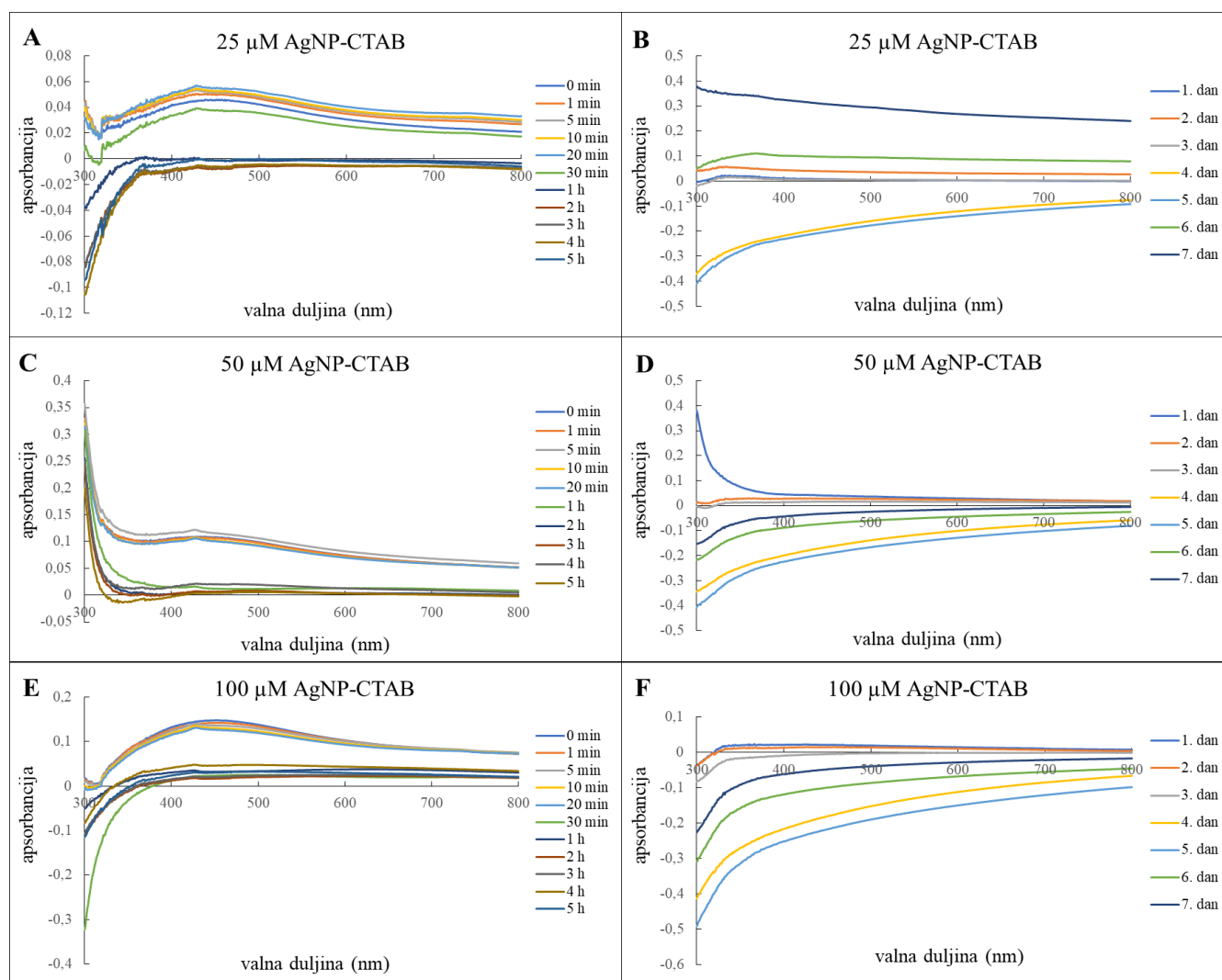
Dodatak cisteina u suspenzije AgNP-PVP u podlozi nije značajnije utjecao na stabilnost čestica u prvih 30 minuta mjerenja (Slike 15.A,C,E). U svim suspenzijama AgNP-PVP i cisteina, odmah po dodatku u podlogu, apsorpcijski maksimum se pomaknuo na veće valne duljine (oko 470 nm) u odnosu na matičnu suspenziju AgNP-PVP, ukazujući na brzu aglomeraciju čestica. U suspenziji 25 μM AgNP-PVP i 125 μM cisteina, u prvom satu mjerenja došlo je do pada apsorbancije i pomaka valne duljine apsorpcijskog maksimuma s 468 nm na 426 nm, što ukazuje na djelomično raspadanje aglomerata i disocijaciju na ione Ag^+ ; slični rezultati dobiveni su i u sljedeća dva sata mjerenja. Nakon 4. sata više nije bilo maksimuma karakterističnog za AgNP (Slike 15.A,B), ukazujući na njihovo raspadanje, a u skladu je s

rezultatima analize suspenzije 25 μM AgNP-PVP bez cisteina UV/Vis spektrofotometrijom (Slike 14.A,B). Apsorpcijski spektar suspenzije 50 μM AgNP-PVP i 250 μM cisteina pokazao je pad apsorbancije s pomakom maksimuma s 467 (nakon 30 minuta) na 438 nm u 1. satu mjerenja. U daljnjim satima i danima mjerenja nije detektiran maksimum apsorbancije karakterističan za AgNP (Slika 15.C,D), što ukazuje na potpuni raspad AgNP-PVP već dva sata nakon dodatka u podlogu. Sličan rezultat dobiven je i u suspenziji 100 μM AgNP-PVP s 500 μM cisteinom, gdje je apsorpcijski maksimum uočen na 440 nm u 1. i 2. satu mjerenja, nakon čega više nije bio mjerljiv (Slike 15.E,F).



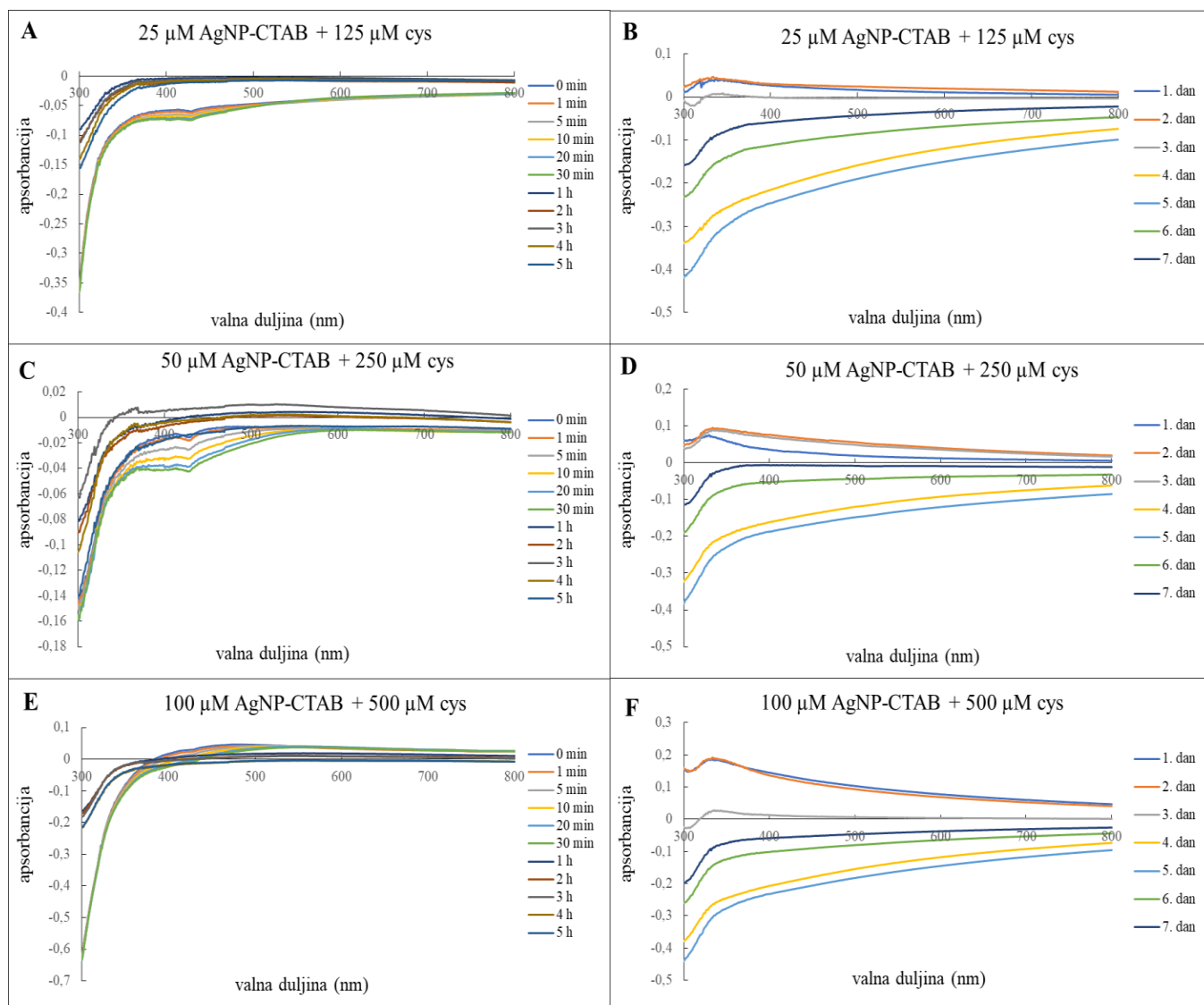
Slika 15. Apsorpcijski spektar suspenzija AgNP-PVP u kombinaciji s cisteinom (cys) u podlozi $\frac{1}{2}$ MS; **A)** 25 μM AgNP + 125 μM cys u prvom danu, **B)** 25 AgNP μM + 125 μM cys tijekom 7 dana, **C)** 50 μM AgNP-PVP + 250 μM cys u prvom danu, **D)** 50 μM AgNP-PVP + 250 μM cys tijekom 7 dana, **E)** 100 μM AgNP-PVP + 500 μM cys u prvom danu, **F)** 100 μM AgNP-PVP + 500 μM cys tijekom 7 dana.

U suspenzijama svih koncentracija AgNP-CTAB, u 0. minuti uočene su široke, nepravilne krivulje koju ukazuju na široku distribuciju veličina čestica (izraženije kod 25 i 50 μM koncentracije; Slike 16.A,C) te se nije mogao odrediti maksimum apsorbancije. U suspenziji 100 μM koncentracije, maksimum apsorbancije u 0. minuti detektiran je na 425 nm (Slika 16.E), što je manja valna duljina u odnosu na maksimum uočen u matičnoj suspenziji (446 nm) (Slika 11.B). To ukazuje na smanjenje veličine AgNP uslijed otpuštanja iona Ag^+ . U prvih 30 minuta mjerenja nije došlo do promjena u izgledu krivulja niti u jednoj suspenziji, osim blagog pada apsorbancije zabilježenog u suspenziji koja je sadržavala 25 μM AgNP-CTAB. Nakon 1. sata, više nije bilo maksimuma karakterističnog za AgNP ni u jednoj suspenziji (Slike 16.B,D,F), što ukazuje na brzu destabilizaciju AgNP-CTAB zbog interakcije s ionima iz podloge.



Slika 16. Apsorpcijski spektar suspenzija AgNP-CTAB u podlozi $\frac{1}{2}$ MS; **A)** 25 μM AgNP-CTAB u prvom danu, **B)** 25 μM AgNP-CTAB tijekom 7 dana, **C)** 50 μM AgNP-CTAB u prvom danu, **D)** 50 μM AgNP-CTAB tijekom 7 dana, **E)** 100 μM AgNP-CTAB u prvom danu, **F)** 100 μM AgNP-CTAB tijekom 7 dana.

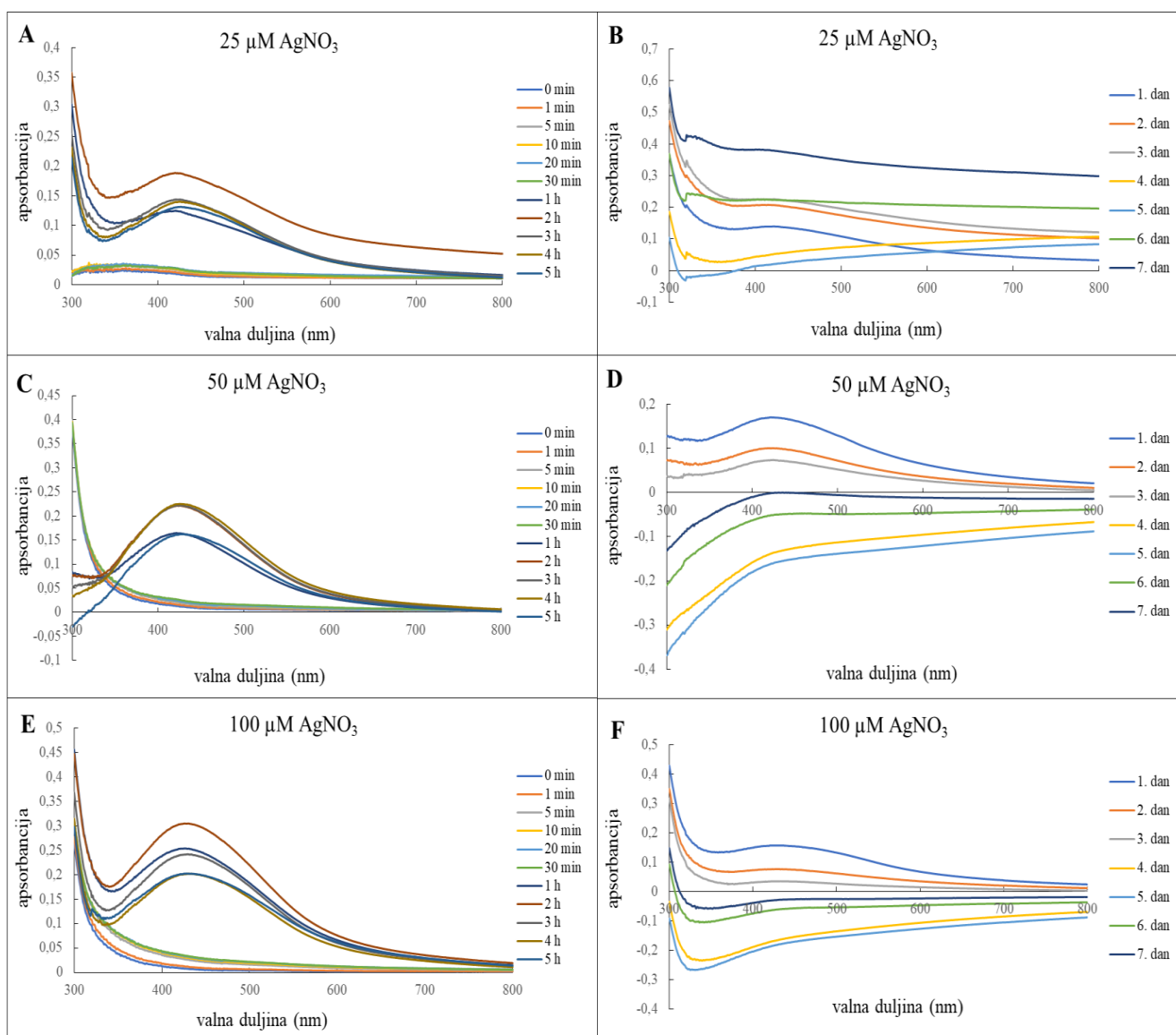
Apsorpcijski spektri 25, 50 i 100 μM AgNP-CTAB s cisteinom nisu pokazali apsorpcijski maksimum karakterističan za AgNP ni u jednoj vremenskoj točki (Slike 17.A-F), što ukazuje na brzu destabilizaciju AgNP-CTAB djelovanjem cisteina i disocijaciju na ione Ag^+ .



Slika 17. Apsorpcijski spektar suspenzija AgNP-CTAB u kombinaciji s cisteinom (cys) u podlozi $\frac{1}{2}$ MS; **A)** 25 μM AgNP-CTAB + 125 μM cys u prvom danu, **B)** 25 μM AgNP-CTAB + 125 μM cys tijekom 7 dana, **C)** 50 μM AgNP-CTAB + 250 μM cys u prvom danu, **D)** 50 μM AgNP-CTAB + 250 μM cys tijekom 7 dana, **E)** 100 μM AgNP-CTAB + 500 μM cys u prvom danu, **F)** 100 μM AgNP-CTAB + 500 μM cys tijekom 7 dana.

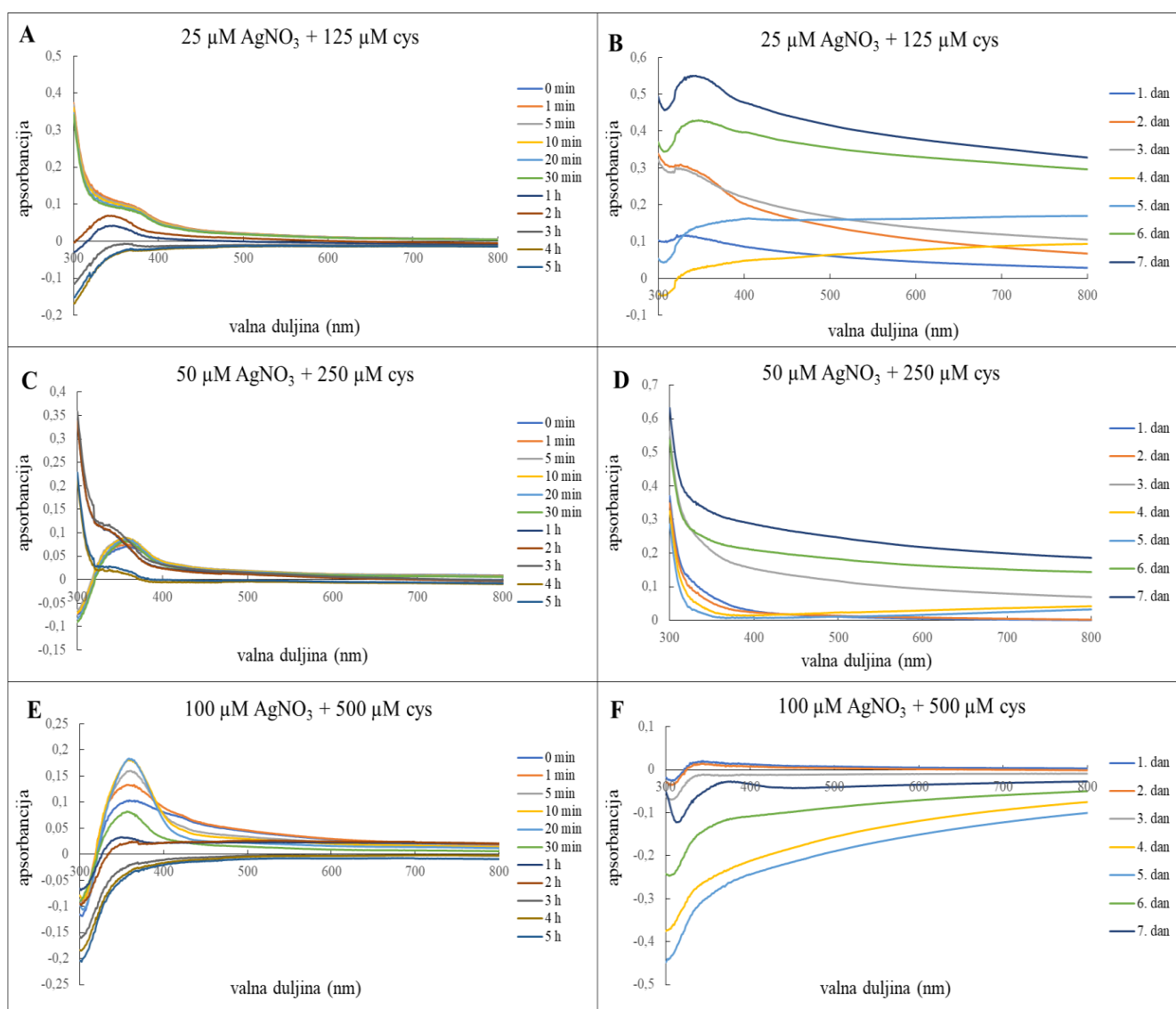
U prvih 30 minuta nakon dodatka AgNO_3 u podlogu $\frac{1}{2}$ MS nije detektiran apsorpcijski maksimum koji bi odgovarao AgNP ni u jednoj otopini. U 1. satu, maksimum apsorpcije 25 i 50 μM otopina određen je na valnoj duljini od 421 nm, a u 100 μM otopini na 425 nm (Slike 18. A,C,E), ukazujući na sintezu AgNP iz otopine AgNO_3 . U 25 μM otopini apsorpcija naglo je opala u 2. satu i zadržala se na istoj razini kroz naredne sate i u 1. danu (Slike 18.A,B). Nakon

2. dana nije detektiran apsorpcijski maksimum koji odgovara AgNP, što ukazuje na potpunu disocijaciju novosintetiziranih AgNP (Slika 18.B). U 50 μM otopini, apsorbancija u 1. i 5. satu bila je podjednaka, dok je u 2., 3. i 4. satu bila veća (Slika 18.C), ukazujući na sintezu novih AgNP između 1. i 2. sata te postepenu disocijaciju novonastalih NP nakon 4. sata. Apсорbancija je opadala do 3. dana, nakon čega nije bilo maksimuma karakterističnog za AgNP (Slika 18.D). Apсорbancija 100 μM otopine bila je najveća u 2. satu (Slika 18.E), nakon čega je postepeno opadala do 2. dana, kada više nije bila mjerljiva (Slika 18.F). Apсорpcijski maksimum u svim otopinama zadržao se na oko 420 nm kroz čitavo vrijeme mjerenja, ukazujući na relativnu stabilnost novonastalih AgNP.



Slika 18. Apсорpcijski spektar otopina AgNO_3 u podlozi $\frac{1}{2}$ MS; **A)** 25 μM AgNO_3 u prvom danu, **B)** 25 μM AgNO_3 tijekom 7 dana, **C)** 50 μM AgNO_3 u prvom danu, **D)** 50 μM AgNO_3 tijekom 7 dana, **E)** 100 μM AgNO_3 u prvom danu, **F)** 100 μM AgNO_3 tijekom 7 dana.

Spektar otopine $25 \mu\text{M}$ AgNO_3 u kombinaciji s $250 \mu\text{M}$ cisteina pokazao je apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 346 nm u 1. i 2. satu (Slika 19.A), koji vjerojatno potječe od kompleksa srebra s cisteinom ili drugim sastojcima iz podloge. Apсорpcijski maksimum detektiran je ponovno tek 6. i 7. dana na nešto manjoj valnoj duljini (329 nm) (Slika 19.B). U otopinama kombiniranih tretmana većih koncentracija, maksimum na valnoj duljini oko 360 nm izmjeren je već u 0. minuti, pri čemu je u otopini $50 \mu\text{M}$ AgNO_3 s $125 \mu\text{M}$ cisteinom bio uočen samo u prvih 30 minuta (Slike 19.C,D,E.). U otopini kombiniranog tretmana najveće koncentracije, apsorpcija je rasla do 20. minute (Slika 19.E), nakon čega je postupno opadala do 2. sata, kada više nije bilo specifičnog maksimuma apsorpcije.

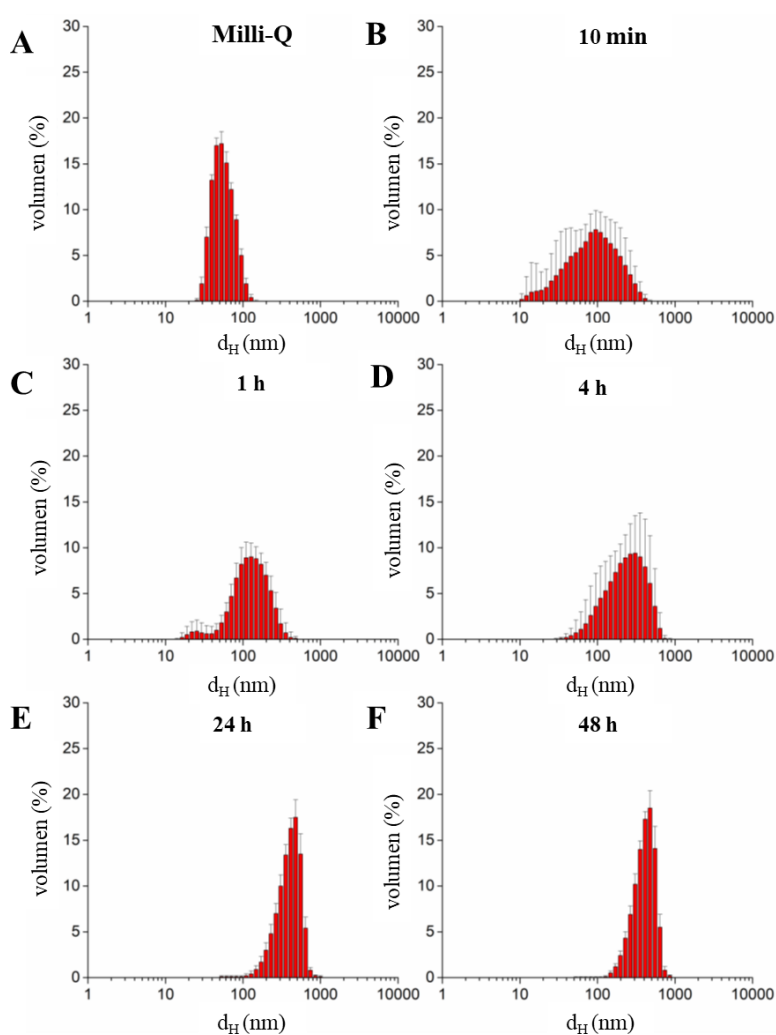


Slika 19. Apсорpcijski spektar otopina AgNO_3 u kombinaciji s cisteinom (cys) u podlozi $\frac{1}{2}$ MS; **A)** $25 \mu\text{M}$ $\text{AgNO}_3 + 125 \mu\text{M}$ cys u prvom danu, **B)** $25 \mu\text{M}$ $\text{AgNO}_3 + 125 \mu\text{M}$ cys tijekom 7 dana, **C)** $50 \mu\text{M}$ $\text{AgNO}_3 + 250 \mu\text{M}$ cys u prvom danu, **D)** $50 \mu\text{M}$ $\text{AgNO}_3 + 250 \mu\text{M}$ cys tijekom 7 dana, **E)** $100 \mu\text{M}$ $\text{AgNO}_3 + 500 \mu\text{M}$ cys u prvom danu, **F)** $100 \mu\text{M}$ $\text{AgNO}_3 + 500 \mu\text{M}$ cys tijekom 7 dana.

4.2.2. Promjena veličine i naboja AgNP

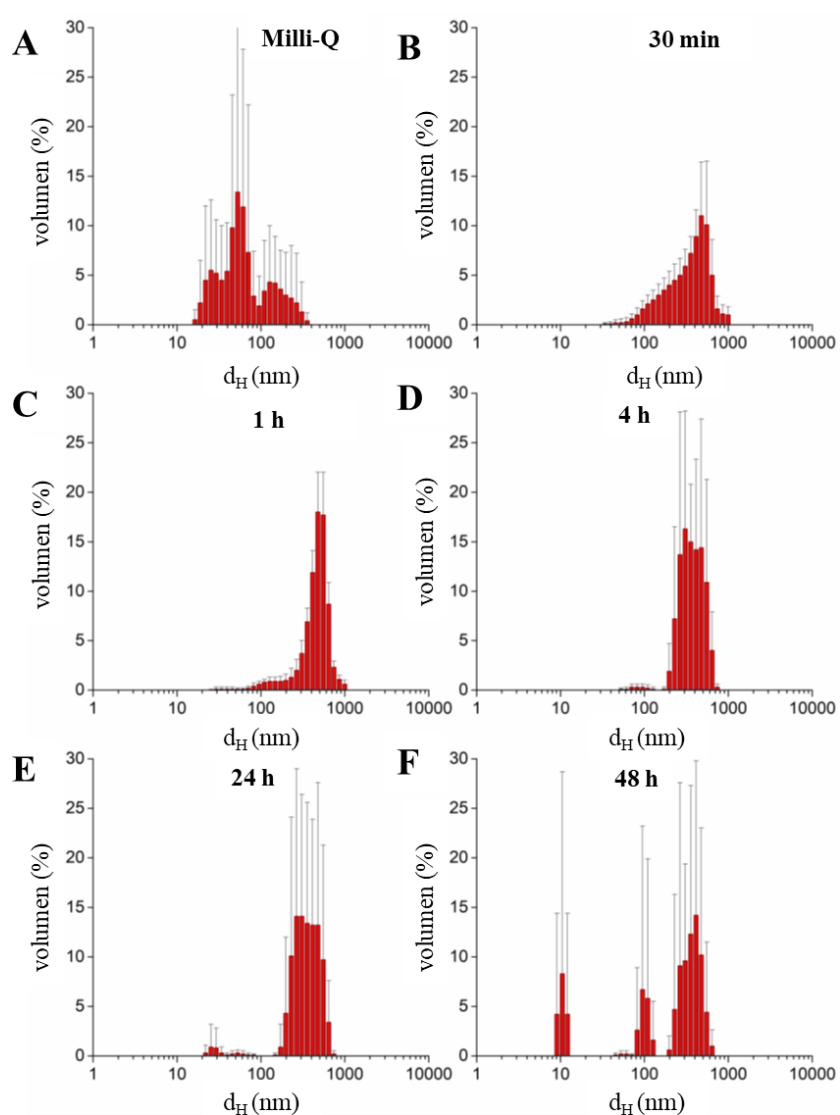
Promjene veličine i naboja AgNP nakon dodatka u podlogu $\frac{1}{2}$ MS izmjerene su samo u suspenzijama 100 μ M AgNP-PVP i AgNP-CTAB koje su pokazale najveće promjene u UV/Vis apsorpcijskim spektrima. Vremenski intervali za mjerenje d_H i ζ -potencijala izabrani su na temelju analize UV/Vis spektara iz kojih je vidljivo da se najveće promjene u stabilnosti oba tipa AgNP događaju u prvih 24 sata.

Rezultati mjerenja d_H u suspenziji AgNP-PVP pokazali su širu distribuciju veličina čestica već 10 minuta nakon dodatka u podlogu $\frac{1}{2}$ MS, u odnosu na onu izmjerenu u ultra-čistoj vodi (Slike 20.A,B). Pritom je maksimum d_H iznosio 124 nm, što ukazuje na relativno brzu aglomeraciju AgNP kao posljedicu interakcije sa sastojcima podloge i u skladu je s rezultatima dobivenim UV/Vis spektrofotometrijom (Slika 14.E). Veličina čestica nastavila je rasti kroz prvih 24 sata, nakon čega se stabilizirala na oko 450 nm (Slike 20.C- F).



Slika 20. Dijagram distribucije veličina AgNP u suspenziji 100 μ M AgNP-PVP u **A)** ultra-čistoj vodi (Milli-Q) te **B)** 10 min, **C)** 1 h, **D)** 4 h, **E)** 24 h i **F)** 48 h nakon dodatka u podlogu $\frac{1}{2}$ MS.

DLS mjerenje suspenzije AgNP-CTAB u ultra-čistoj vodi pokazalo je široku distribuciju veličina čestica (Slika 21.A), međutim već 10 minuta nakon dodatka u podlogu zabilježena je brza aglomeracija čestica, pri čemu je maksimum d_H zabilježen na oko 470 nm (Slika 21.B). Najveći maksimum d_H (510 nm) izmjeren je u 1. satu (Slika 21.C), nakon čega je veličina čestica blago opadala do kraja mjerenja (Slike 21.D,E,F). Nakon 48 sati zabilježena je populacija AgNP-CTAB veličine oko 100 nm, koja ukazuje na restabilizaciju manjih aglomerata ponovnim vezanjem omotača CTAB, te populacija malih čestica (oko 10 nm), koja vjerojatno predstavlja micelle CTAB (Slika 21.F).



Slika 21. Dijagram distribucije veličina AgNP u suspenziji 100 μ M AgNP-CTAB u **A)** ultra-čistoj vodi (Milli-Q) te **B)** 10 min, **C)** 1 h, **D)** 4 h, **E)** 24 h i **F)** 48 h nakon dodatka u podlogu $\frac{1}{2}$ MS.

Dodatkom AgNP-PVP u podlogu došlo je do pojave blago negativnog površinskog naboja, što je vidljivo iz smanjenja ζ -potencijala sa -4 mV (u matičnoj suspenziji) na $-9,6$ mV nakon 10 minuta. Pad ζ -potencijala ukazuje na povećano elektrostatičko odbijanje između čestica, što je vjerojatno posljedica interakcije s ionima iz podloge. Vrijednosti ζ -potencijala blago su se smanjile nakon sat vremena, nakon čega se nisu značajno promijenile do kraja mjerenja, što je u skladu sa sporijom brzinom aglomeracije AgNP-PVP (Tablica 2.). Smanjenje ζ -potencijala AgNP-CTAB sa $44,67$ mV na $16,5$ mV, zabilježeno 10 minuta nakon dodatka u hranjivu podlogu, vjerojatno je posljedica brzog otpuštanja pozitivno nabijenog omotača CTAB s površine AgNP. Otpuštanje omotača uzrokuje destabilizaciju čestica i može dovesti do njihove aglomeracije, što je u skladu sa zabilježenim porastom vrijednosti d_H . Daljnji pad ζ -potencijala zabilježen je nakon četiri sata, međutim, nakon 24 i 48 sati izmjeren je blagi rast ζ -potencijala (Tablica 2.). Blago povećanje naboja vjerojatno potječe od populacije čestica veličine 100 nm koje su se stabilizirale ponovnim vezanjem omotača CTAB, te od pozitivno nabijenih micela omotača CTAB veličine 10 nm (Slika 21.F, Tablica 2.).

Tablica 2. Promjena vrijednosti ζ -potencijala i d_H AgNP u suspenzijama $100 \mu\text{M}$ AgNP-PVP i $100 \mu\text{M}$ AgNP-CTAB u podlozi $\frac{1}{2}$ MS nakon 10 min te 1, 4, 24 i 48 h, prikazana kao srednja vrijednost 5 mjerenja \pm standardna pogreška.

Vrijeme	AgNP-PVP		AgNP-CTAB	
	ζ -potencijal (mV)	d_H (nm)	ζ -potencijal (mV)	d_H (nm)
10 min	$-9,63 \pm 0,91$	$124,3 \pm 92,9$	$16,50 \pm 3,49$	$468,9 \pm 143,6$
1 h	$-12,00 \pm 0,70$	$152,8 \pm 64,2$	$7,00 \pm 0,91$	$510,7 \pm 102,2$
4 h	$-13,13 \pm 1,40$	$317,5 \pm 153,4$	$4,95 \pm 1,40$	$408,2 \pm 138,7$
24 h	$-11,97 \pm 1,27$	$448,7 \pm 132,7$	$11,12 \pm 1,75$	$398,0 \pm 144,7$
48 h	$-11,07 \pm 1,14$	$450,6 \pm 128,0$	$9,31 \pm 2,20$	$101,6 \pm 13,5$ $393,4 \pm 107,6$

4.3. AgNP u tkivu korijena i lista duhana

4.3.1. Sadržaj akumuliranog srebra

Metodom ICP-MS izmjeren je sadržaj ukupnog srebra u korijenu i listu nakon 7-dnevnog tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB, AgNO_3 ili kombiniranih tretmana s cisteinom. Nakon svih tretmana, u korijenu biljaka zabilježeno je povećanje sadržaja ukupnog srebra proporcionalno porastu koncentracije tretmana. Značajno veći sadržaj srebra zabilježen je

nakon oba tipa tretmana s AgNP u odnosu na odgovarajuće koncentracije tretmana s AgNO₃. Dodatak cisteina nije u potpunosti inhibirao unos srebra, no značajno je smanjio sadržaj akumuliranog srebra u svim kombiniranim tretmanima, iako je učinak bio izraženiji u tretmanima s AgNO₃ u odnosu na tretmane s AgNP (Tablica 3.).

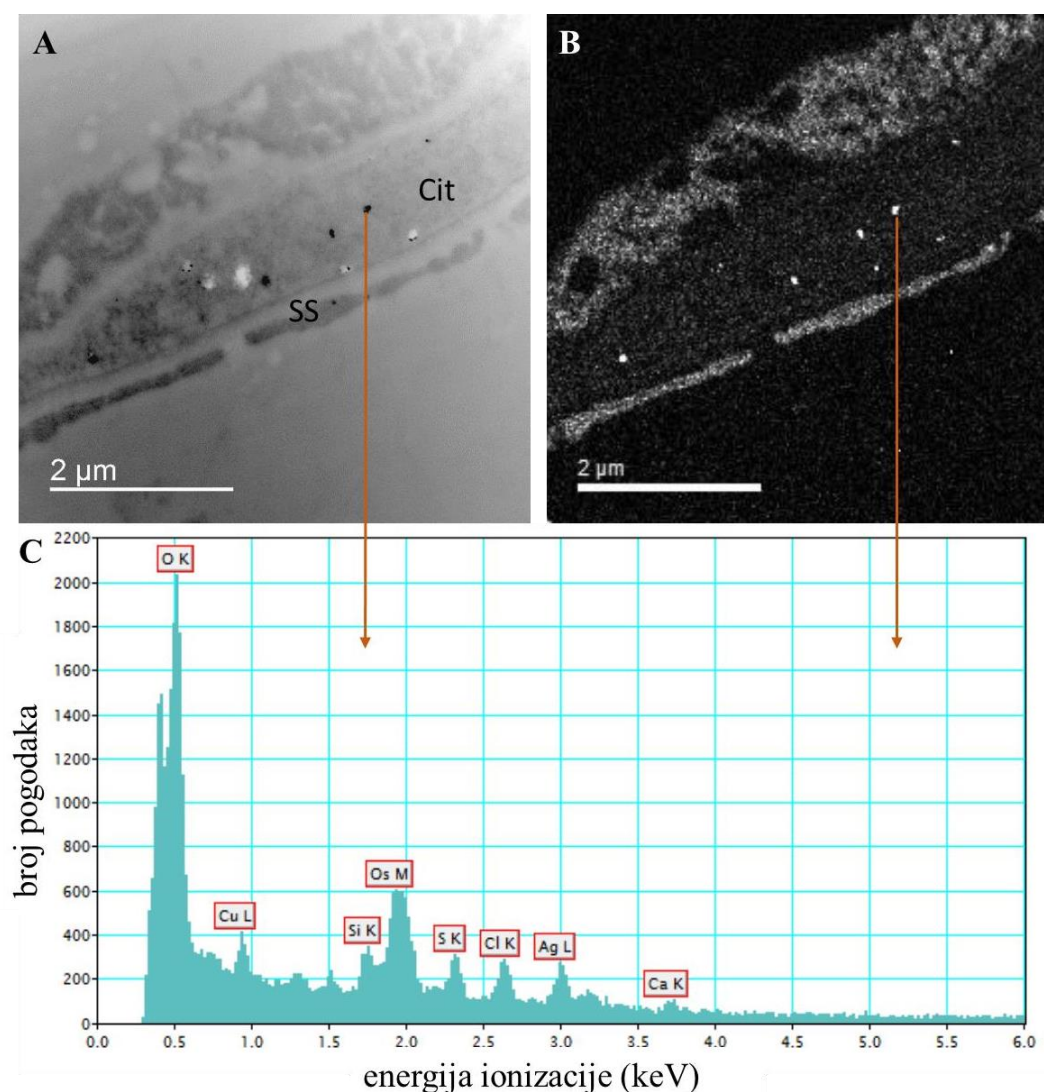
Sadržaj srebra u listu povećavao se s povećanjem koncentracije srebra u svim tipovima tretmana. Pri svim ispitanim koncentracijama, značajno veća akumulacija srebra zabilježena nakon tretmana s AgNP u odnosu na odgovarajuće koncentracije AgNO₃. Sadržaj srebra izmjeren u svim kombiniranim tretmanima s cisteinom bio je značajno manji u odnosu na odgovarajuće tretmane bez cisteina (Tablica 3.).

Tablica 3. Sadržaj srebra u korijenu i listu duhana nakon tretmana s 25, 50 i 100 µM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ i njihovih kombinacija sa 125, 250 i 500 µM cisteinom (cys) prikazan kao srednja vrijednost ± standardna pogreška iz tri nezavisna pokusa, svaki sa po tri replike. Vrijednosti u stupcima koje su obilježene različitim slovima označavaju značajne razlike ($p \leq 0,05$, jednosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test) između različitih koncentracija istog tretmana i kontrole (mala slova) ili istih koncentracija različitih tretmana (velika slova). Zvezdica (*) označava značajnu razliku između tretmana sa i bez cisteina pri odgovarajućoj koncentraciji, dok ljestve (#) označavaju značajnu razliku između kombiniranih tretmana s cisteinom i kontrole. U kontroli, sadržaj srebra je bio ispod limita detekcija (LOQ < 0.1 µg g⁻¹). s.tv. – suha tvar

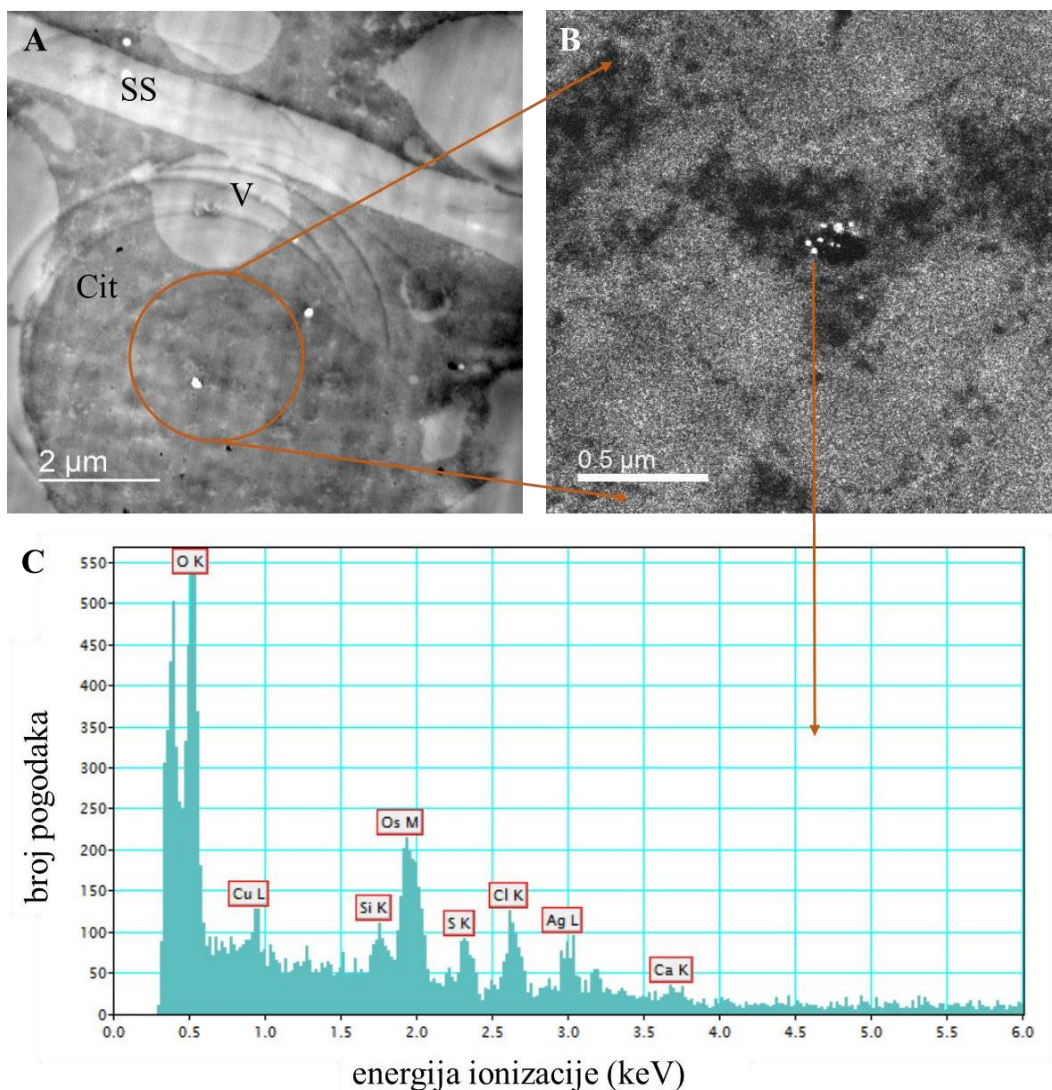
Biljni materijal	Tretman	Konc. (µM)	Sadržaj Ag (µg g ⁻¹ s.tv.)		
			AgNP-PVP	AgNP-CTAB	AgNO ₃
Korijen	Kontrola	0	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^d	0,00 ± 0,00 ^d
	Ag	25	3,60 ± 0,15 ^{b, B}	5,35 ± 0,25 ^{c, A}	2,71 ± 0,15 ^{c, C}
		50	14,83 ± 0,71 ^{a, A}	8,86 ± 0,32 ^{b, B}	3,83 ± 0,17 ^{b, C}
		100	16,26 ± 0,28 ^{a, B}	18,98 ± 0,64 ^{a, A}	10,75 ± 0,04 ^{a, C}
	Ag + cys	25 + 125	1,85 ± 0,08 ^{*, #}	3,94 ± 0,18 ^{*, #}	0,79 ± 0,05 ^{*, #}
		50 + 250	7,94 ± 0,34 [*]	6,39 ± 0,25 ^{*, #}	0,91 ± 0,06 ^{*, #}
		100 + 500	11,36 ± 0,65 ^{*, #}	12,67 ± 0,14 ^{*, #}	2,35 ± 0,04 ^{*, #}
List	Kontrola	0	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^d	0,00 ± 0,00 ^d
	Ag	25	0,64 ± 0,10 ^{c, B}	2,11 ± 0,51 ^{c, A}	0,91 ± 0,04 ^{c, AB}
		50	5,25 ± 0,23 ^{b, A}	3,39 ± 0,21 ^{b, B}	1,40 ± 0,05 ^{b, C}
		100	7,44 ± 0,24 ^{a, B}	8,94 ± 0,29 ^{a, A}	5,29 ± 0,23 ^{a, C}
	Ag + cys	25 + 125	0,16 ± 0,51 [*]	0,90 ± 0,20	0,11 ± 0,01 ^{*, #}
		50 + 250	1,04 ± 0,21 ^{*, #}	2,04 ± 0,14 ^{*, #}	0,29 ± 0,01 ^{*, #}
		100 + 500	3,38 ± 0,29 ^{*, #}	6,69 ± 0,66 ^{*, #}	1,16 ± 0,09 ^{*, #}

4.3.2. Lokalizacija AgNP

Nakon izlaganja biljaka 100 μM AgNP-PVP ili AgNP-CTAB, ultratanki prerezi tkiva korijena i lista analizirani su TEM-om. Nakon oba tipa tretmana, čestice AgNP pretežno su uočene u citoplazmi epidermalnih stanica korijena (Slike 22.A,B; 23.A,B). Analizom elementarnog sastava pojedinačnih čestica detektorom EDX dokazana je prisutnost srebra, što je potvrda unosa AgNP i njihove akumulacije u korijenu (Slike 22.C; 23.C).



Slika 22. AgNP u stanicama korijena nakon tretmana sa 100 μM AgNP-PVP. **A)** mikrografija stanica korijena s AgNP lokaliziranim pretežito u citoplazmi, **B)** elementarna mapa srebra (bar = 2 μm), **C)** spektar energijski razlučujuće/disperzivne rendgenske spektroskopije (EDX). SS – stanična stijenka, Cit – citoplazma. Strelice na slikama A) i B) označavaju AgNP.



Slika 23. AgNP u stanicama korijena nakon tretmana sa 100 μM AgNP-CTAB. **A)** mikrografija stanica korijena s AgNP lokaliziranim pretežito u citoplazmi (bar = 2 μm), **B)** elementarna mapa srebra na uvećanom dijelu citoplazme (bar = 0,5 μm), **C)** spektar energijski razlučujuće/disperzivne rendgenske spektroskopije (EDX). SS – stanična stijenka, V – vakuola, Cit – citoplazma. Strelica na slici B) označava AgNP.

U ultratankim presezima lista AgNP nisu pronađene, što dovodi do zaključka da nakon unosa putem korijena, AgNP pretežno ostaju akumulirane u stanicama korijena i vjerojatno se u manjoj mjeri ili uopće ne prenose do listova.

4.4. Utjecaj AgNP na pojavu oksidacijskog stresa

4.4.1. Sadržaj ROS i oštećenja biomolekula

4.4.1.1. Korijen

Spektrofotometrijsko mjerenje sadržaja H_2O_2 metodom prema Alexieva i sur. (2001), rezultiralo je velikim odstupanjem između bioloških replika, zbog čega nije moguća sasvim pouzdana interpretacija rezultata, no ipak se mogu uočiti generalni učinci različitih tipova tretmana na korijen (Tablica 4.). Tretmani s oba tipa AgNP smanjili su sadržaj H_2O_2 u odnosu na kontrolu, što je ublaženo dodatkom cisteina tretmanu sa $100 \mu M$ AgNP-CTAB. S druge strane, tretmani s $AgNO_3$ povećali su sadržaj H_2O_2 u odnosu na kontrolu, dok je dodatak cisteina doveo do smanjenja sadržaja H_2O_2 u odnosu na odgovarajuće tretmane bez cisteina.

Tretman s AgNP-PVP povećao je stvaranje $O_2^{\cdot-}$ u odnosu na kontrolu pri svim primijenjenim koncentracijama, iako je samo pri $25 \mu M$ koncentraciji povećanje bilo statistički značajno, dok je dodatak cisteina ublažio navedeni učinak. Niti jedna koncentracija AgNP-CTAB ili njegove kombinacije s cisteinom, nije izazvala promjenu u sadržaju $O_2^{\cdot-}$ u odnosu na kontrolu. Slično kao kod tretmana s AgNP-PVP, samo najmanja koncentracija $AgNO_3$ statistički značajno povećala je sadržaj $O_2^{\cdot-}$, što je ublaženo dodatkom cisteina. Usporedbom učinaka različitih tipova tretmana istih koncentracija, pri $50 \mu M$ zabilježen je značajno jači učinak nakon tretmana s AgNP-PVP u odnosu na tretman s $AgNO_3$, dok je pri $100 \mu M$ koncentraciji tretman s AgNP-PVP značajno povećao sadržaj $O_2^{\cdot-}$ u odnosu na tretmane s AgNP-CTAB i $AgNO_3$ (Tablica 4).

Sadržaj MDA, indikatora oštećenja staničnih membrana, značajno se smanjio nakon tretmana s najvećom koncentracijom AgNP-PVP u odnosu na kontrolu i niže koncentracije, a nakon kombiniranih tretmana s cisteinom izmjerene su vrijednosti slične kontroli. Tretmani s AgNP-CTAB i njegovim kombinacijama s cisteinom nisu pokazali značajan učinak na sadržaj MDA, dok su sve koncentracije $AgNO_3$ podjednako smanjile sadržaj MDA u uspoređi s kontrolom. Dodatak cisteina tretmanima s dvije niže koncentracije $AgNO_3$ rezultirao je sličnim ili čak smanjenim vrijednostima u odnosu na odgovarajuće tretmane bez cisteina. Značajno veći sadržaj MDA izmjeren je nakon tretmana s oba tipa AgNP u uspoređbi s $AgNO_3$ pri $25 \mu M$ koncentraciji, dok su pri najvišoj koncentraciji, najveće vrijednosti MDA izmjerene nakon tretmana s AgNP-CTAB (Tablica 4.).

Sadržaj proteinskih karbonila nije se značajno promijenio u odnosu na kontrolu niti pri jednoj ispitanoj koncentraciji tretmana s AgNP-PVP i AgNP-CTAB i njihovih kombinacija s

cisteinom. Promjene nisu zabilježene niti nakon tretmana s AgNO_3 , no u kombiniranom tretmanu AgNO_3 i cisteina izmjerene su veće vrijednosti u odnosu na kontrolu i odgovarajući tretman bez cisteina. Usporedbom različitih tipova tretmana istih koncentracija pokazalo se da je 50 i 100 μM AgNP-PVP uzrokovao povećanje sadržaja proteinskih karbonila u odnosu na tretmane s AgNP-CTAB i AgNO_3 (Tablica 4.).

Rezultati komet testa prikazani su kao % DNA u repu, koji je direktno proporcionalan stupnju oštećenja molekule DNA. Niti jedna ispitana koncentracija AgNP-PVP nije značajno povećala oštećenje molekule DNA u odnosu na kontrolu, iako je 100 μM koncentracija izazvala značajno povećanje u odnosu na 25 μM koncentraciju. Dodatak cisteina nije pokazao razliku u odnosu na tretmane bez cisteina. Tretmani s AgNP-CTAB generalno nisu izazvali oštećenja molekule DNA, dok je nakon izlaganja 100 μM koncentraciji zabilježen čak manji % DNA u repu u odnosu na kontrolu i dvije niže koncentracije. Vrijednosti kombiniranih tretmana s cisteinom bile su slične kontroli. Najveća koncentracija AgNO_3 značajno je povećala vrijednosti % DNA u repu u usporedbi s nižim koncentracijama, iako se nije značajno razlikovala u odnosu na kontrolu. Dodatak cisteina povećao je % DNA u repu u nižim koncentracijama kombiniranih tretmana AgNO_3 i cisteina, ali razlika nije bila statistički značajna u odnosu na kontrolu. Usporedbom učinaka različitih tipova tretmana pokazalo se da je 100 μM AgNP-CTAB imao slabiji učinak u odnosu na istu koncentracije AgNP-PVP i AgNO_3 (Tablica 4).

Tablica 4. Sadržaj vodikovog peroksida (H₂O₂), superoksidnog radikala (O₂^{•-}) malondialdehida (MDA), proteinskih karbonila i % DNA u repu u korijenu nakon tretmana s 25, 50, i 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ i njihovih kombinacija sa 125, 250 i 500 μM cisteinom (cys) prikazan je kao srednja vrijednost ± standardna pogreška iz dva nezavisna pokusa, svaki sa po 6 bioloških replika. Stupci označeni različitim slovima označavaju značajne razlike (p ≤ 0,05, jednosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test) između različitih koncentracija istog tretmana i kontrole (mala slova) ili istih koncentracija različitih tretmana (velika slova). Zvezdica (*) označava značajnu razliku između tretmana sa i bez cisteina pri odgovarajućoj koncentraciji, dok ljestve (#) označavaju značajnu razliku između kombiniranih tretmana s cisteinom i kontrole. sv.t. – svježe tkivo.

	Konc. (μM)	Sadržaj H ₂ O ₂ (μmol g ⁻¹ s.tv.)	• (% od kontrole)	MDA (nmol g ⁻¹ sv.t.)	Proteinski karbonili (μmol mg ⁻¹ proteina)	% DNA u repu
Kontrola	0	1,43 ± 0,40 ^a	100 ± 6,11 ^b	126,62 ± 2,95 ^{ab}	0,025 ± 0,003 ^a	4,70 ± 0,01 ^{ab}
AgNP-PVP	25	0,54 ± 0,13 ^{a, B}	180,45 ± 25,59 ^{a, A}	139,78 ± 5,02 ^{a, A}	0,029 ± 0,002 ^{a, A}	3,80 ± 0,33 ^{b, A}
	50	0,81 ± 0,20 ^{ab, A}	142,09 ± 14,86 ^{ab, A}	125,03 ± 3,92 ^{b, A}	0,032 ± 0,003 ^{a, A}	4,10 ± 0,40 ^{ab, A}
	100	0,68 ± 0,13 ^{b, C}	145,50 ± 6,92 ^{ab, A}	106,97 ± 4,73 ^{c, B}	0,029 ± 0,002 ^{a, A}	5,18 ± 0,49 ^{a, A}
AgNP-PVP + cys	25 + 125	0,51 ± 0,06 [#]	114,61 ± 14,06 [*]	118,18 ± 3,71 [*]	0,030 ± 0,003	5,74 ± 0,43 [*]
	50 + 250	1,23 ± 0,35	134,45 ± 12,64	123,44 ± 1,81	0,029 ± 0,003	5,03 ± 0,45
	100 + 500	0,67 ± 0,13 [#]	150,30 ± 13,68 [#]	114,38 ± 8,47	0,030 ± 0,002	5,48 ± 0,48
Kontrola	0	0,68 ± 0,05 ^a	100 ± 4,39 ^a	126,62 ± 2,76 ^a	0,025 ± 0,002 ^a	4,70 ± 0,01 ^a
AgNP-CTAB	25	0,44 ± 0,01 ^{b, B}	125,78 ± 14,46 ^{b, A}	139,94 ± 9,27 ^{a, A}	0,023 ± 0,003 ^{a, A}	4,65 ± 0,46 ^{b, A}
	50	0,51 ± 0,02 ^{b, A}	104,24 ± 6,33 ^{b, AB}	121,41 ± 4,71 ^{a, A}	0,022 ± 0,003 ^{a, B}	4,52 ± 0,43 ^{a, A}
	100	0,34 ± 0,01 ^{c, B}	92,97 ± 8,66 ^{b, B}	133,40 ± 7,21 ^{a, A}	0,023 ± 0,002 ^{a, AB}	2,84 ± 0,34 ^{b, B}
AgNP-CTAB + cys	25 + 125	0,45 ± 0,04 [#]	127,12 ± 12,23	119,18 ± 3,13 [*]	0,022 ± 0,002	4,51 ± 0,50
	50 + 250	0,61 ± 0,02	102,31 ± 4,70	116,63 ± 6,86	0,019 ± 0,001 [#]	4,01 ± 0,38
	100 + 500	0,62 ± 0,02 [*]	108,46 ± 14,83	115,12 ± 9,37	0,022 ± 0,001	4,18 ± 0,42 [*]
Kontrola	0	0,37 ± 0,16 ^b	100 ± 3,91 ^b	126,62 ± 2,48 ^a	0,025 ± 0,002 ^a	4,70 ± 0,01 ^{ab}
AgNO₃	25	0,86 ± 0,03 ^{a, A}	169,16 ± 11,32 ^{a, A}	108,02 ± 3,02 ^{b, B}	0,027 ± 0,003 ^{a, A}	3,57 ± 0,33 ^{b, A}
	50	0,95 ± 0,15 ^{a, A}	86,76 ± 9,80 ^{b, B}	115,89 ± 5,39 ^{b, A}	0,022 ± 0,001 ^{a, B}	3,81 ± 0,39 ^{b, A}
	100	0,91 ± 0,06 ^{a, A}	76,95 ± 5,15 ^{b, B}	95,39 ± 2,17 ^{c, B}	0,022 ± 0,001 ^{a, B}	5,80 ± 0,46 ^{a, A}
AgNO₃+ cys	25 + 125	0,60 ± 0,06 [*]	87,67 ± 1,95 [*]	101,58 ± 2,18 [#]	0,039 ± 0,001 ^{*, #}	5,35 ± 0,46 [*]
	50 + 250	0,62 ± 0,08	83,84 ± 8,03	102,65 ± 4,42 ^{*, #}	0,030 ± 0,002 [*]	5,56 ± 0,44 [*]
	100 + 500	0,58 ± 0,06 [*]	69,84 ± 1,17	113,19 ± 6,69 ^{*, #}	0,043 ± 0,002 ^{*, #}	5,40 ± 0,43

4.4.1.2. List

Rezultate mjerenja sadržaja H_2O_2 u listu (Tablica 5.) također nije bilo moguće sasvim pouzdano interpretirati (poglavlje 4.4.1.1.), no ipak su uočeni neki generalni učinci. Tretmani s AgNP-PVP nisu doveli do promjena u sadržaju H_2O_2 u odnosu na kontrolu. Najmanja i najveća koncentracija AgNP-CTAB povećale su sadržaj H_2O_2 u odnosu na kontrolu, dok je dodatak cisteina tretmanu s 25 i 100 μM koncentracijom smanjio vrijednosti u odnosu na odgovarajući tretman bez cisteina. Tretmani s $AgNO_3$ nisu promijenili sadržaj H_2O_2 u odnosu na kontrolu.

Tretmani s AgNP-PVP nisu povećali sadržaj $O_2^{\cdot-}$ u odnosu na kontrolu. Vrijednosti izmjerene pri 100 μM AgNP-PVP bile su značajno veće nego nakon tretmana s 25 μM koncentracijom. Dodatak cisteina povećao je sadržaj $O_2^{\cdot-}$ samo u kombiniranom tretmanu s 25 μM AgNP-PVP, ali promjena nije bila statistički značajna u odnosu na kontrolu. Tretmani s AgNP-CTAB nisu izazvali promjene u sadržaju $O_2^{\cdot-}$ u odnosu na kontrolu. Tretmani s 25 i 50 μM $AgNO_3$ značajno su smanjili sadržaj $O_2^{\cdot-}$, dok je 100 μM koncentracija izazvala povećanje u odnosu na kontrolu. Dodatak cisteina povećao je vrijednosti samo pri 25 μM $AgNO_3$ u odnosu na tretman bez cisteina (Tablica 5.). Među različitim tipovima tretmana pri istim koncentracijama nisu zabilježene statistički značajne razlike u sadržaju $O_2^{\cdot-}$.

Svi tretmani s AgNP i $AgNO_3$ povećali su sadržaj MDA u odnosu na kontrolu, iako razlike nisu bile statistički značajne. Dodatak cisteina u kombiniranim tretmanima smanjio je sadržaj MDA na razine slične kontroli samo u tretmanima s 25 μM AgNP-PVP i 50 μM AgNP-CTAB u odnosu na tretmane bez cisteina (Tablica 5).

Niti jedan tretman nije izazvao promjenu u sadržaju proteinskih karbonila u odnosu na kontrolu. Dodatak cisteina smanjio je vrijednosti u svim kombiniranim tretmanima s AgNP-CTAB u odnosu na tretman bez cisteina, iako statistički značajno samo pri najnižoj koncentraciji (Tablica 5.). Zabilježeno je značajno povećanje sadržaja proteinskih karbonila u svim tretmanima s AgNP-CTAB u odnosu na iste koncentracije tretmana s AgNP-PVP i $AgNO_3$.

Među svim ispitanim tretmanima, samo je tretman s 25 μM AgNP-PVP izazvao značajno oštećenje molekule DNA u usporedbi s kontrolom. Dodatak cisteina uglavnom nije imao značajnog učinka na oštećenje DNA u kombiniranim tretmanima s AgNP, dok je u kombiniranim tretmanima s $AgNO_3$ uzrokovao povećanje vrijednosti % DNA u repu. Zabilježeno je da su tretmani s 25 μM AgNP-PVP i AgNP-CTAB imali jači učinak u odnosu na tretman s $AgNO_3$ iste koncentracije (Tablica 5.).

Tablica 5. Sadržaj vodikovog peroksida (H₂O₂), superoksidnog radikala (O₂^{•-}) malondialdehida (MDA), proteinskih karbonila i % DNA u repu u listu nakon tretmana s 25, 50, i 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ i njihovih kombinacija sa 125, 250 i 500 μM cisteinom (cys) prikazan je kao srednja vrijednost ± standardna pogreška iz dva nezavisna pokusa, svaki sa po 6 bioloških replika. Stupci označeni različitim slovima označavaju značajne razlike (p ≤ 0,05, jednosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test) između različitih koncentracija istog tretmana i kontrole (mala slova) ili istih koncentracija različitih tretmana (velika slova). Zvezdica (*) označava značajnu razliku između tretmana sa i bez cisteina pri odgovarajućoj koncentraciji, dok ljestve (#) označavaju značajnu razliku između kombiniranih tretmana s cisteinom i kontrole. sv.t. – svježe tkivo.

	Konc. (μM)	Sadržaj H ₂ O ₂ (μmol g ⁻¹ s.tv.)	• (% od kontrole)	MDA (nmol g ⁻¹ sv.t)	Proteinski karbonili (μmol mg ⁻¹ proteina)	% DNA u repu
Kontrola	0	0,33 ± 0,02 ^a	100 ± 11,18 ^{ab}	157,51 ± 4,13 ^a	0,022 ± 0,002 ^a	4,20 ± 0,165 ^b
AgNP-PVP	25	0,21 ± 0,07 ^{a, B}	72,15 ± 12,82 ^{b, A}	180,07 ± 7,20 ^{a, A}	0,023 ± 0,001 ^{a, B}	5,46 ± 0,49 ^{a, A}
	50	0,29 ± 0,03 ^{a, B}	100,45 ± 6,70 ^{ab, A}	165,19 ± 11,88 ^{a, A}	0,019 ± 0,001 ^{a, B}	3,87 ± 0,36 ^{b, A}
	100	0,22 ± 0,08 ^{a, C}	119,08 ± 14,12 ^{a, A}	161,47 ± 7,46 ^{a, A}	0,019 ± 0,002 ^{a, B}	4,39 ± 0,39 ^{ab, A}
AgNP-PVP + cys	25 + 125	0,22 ± 0,01	108,68 ± 5,77 [*]	148,71 ± 6,72 [*]	0,024 ± 0,001	5,70 ± 0,49 [#]
	50 + 250	0,18 ± 0,04	78,18 ± 8,88	143,68 ± 6,32	0,017 ± 0,001	6,65 ± 0,54 ^{*, #}
	100 + 500	0,24 ± 0,05	111,38 ± 9,32	152,23 ± 7,16	0,017 ± 0,002	5,03 ± 0,45
Kontrola	0	1,00 ± 0,042 ^b	100 ± 11,14 ^a	157,51 ± 2,55 ^b	0,022 ± 0,002 ^b	4,20 ± 0,16 ^a
AgNP-CTAB	25	1,54 ± 0,11 ^{a, A}	103,16 ± 17,26 ^{a, A}	170,29 ± 6,47 ^{ab, A}	0,033 ± 0,001 ^{a, A}	5,12 ± 0,48 ^{a, A}
	50	0,85 ± 0,24 ^{b, A}	98,81 ± 12,58 ^{a, A}	195,36 ± 6,88 ^{a, A}	0,033 ± 0,001 ^{a, A}	4,71 ± 0,49 ^{a, A}
	100	1,53 ± 0,11 ^{a, A}	111,47 ± 13,49 ^{a, A}	155,19 ± 4,77 ^{b, A}	0,033 ± 0,002 ^{a, A}	4,27 ± 0,58 ^{a, A}
AgNP-CTAB + cys	25 + 125	0,40 ± 0,09 ^{*, #}	109,70 ± 8,47	187,36 ± 7,59 ^{*, #}	0,024 ± 0,003 [*]	6,19 ± 0,63 [#]
	50 + 250	0,34 ± 0,08	67,13 ± 5,20	177,63 ± 7,45	0,027 ± 0,003	4,09 ± 0,38
	100 + 500	0,77 ± 0,19 [*]	95,66 ± 7,27	153,76 ± 7,31	0,028 ± 0,003	4,72 ± 0,38
Kontrola	0	0,42 ± 0,07 ^{ab}	100 ± 3,96 ^b	157,51 ± 5,19 ^a	0,022 ± 0,002 ^a	4,20 ± 0,16 ^a
AgNO₃	25	0,25 ± 0,09 ^{b, B}	70,61 ± 4,90 ^{c, A}	158,75 ± 5,21 ^{a, A}	0,023 ± 0,001 ^{a, B}	3,15 ± 0,35 ^{a, B}
	50	0,23 ± 0,09 ^{b, B}	77,20 ± 8,15 ^{c, A}	171,73 ± 8,43 ^{a, A}	0,020 ± 0,002 ^{a, B}	4,07 ± 0,37 ^{a, A}
	100	0,68 ± 0,14 ^{a, B}	123,47 ± 4,46 ^{a, A}	173,78 ± 9,50 ^{a, A}	0,022 ± 0,002 ^{a, B}	3,87 ± 0,42 ^{a, A}
AgNO₃ + cys	25 + 125	0,40 ± 0,08	126,9 ± 8,21 ^{*, #}	155,05 ± 5,28	0,019 ± 0,002	5,07 ± 0,42 [*]
	50 + 250	0,46 ± 0,27	89,65 ± 17,16	157,24 ± 4,31	0,019 ± 0,002	5,51 ± 0,52 ^{*, #}
	100 + 500	0,51 ± 0,07	104,99 ± 16,55	156,48 ± 8,86	0,022 ± 0,001	6,56 ± 0,46 ^{*, #}

4.4.2. Aktivnost antioksidacijskih enzima

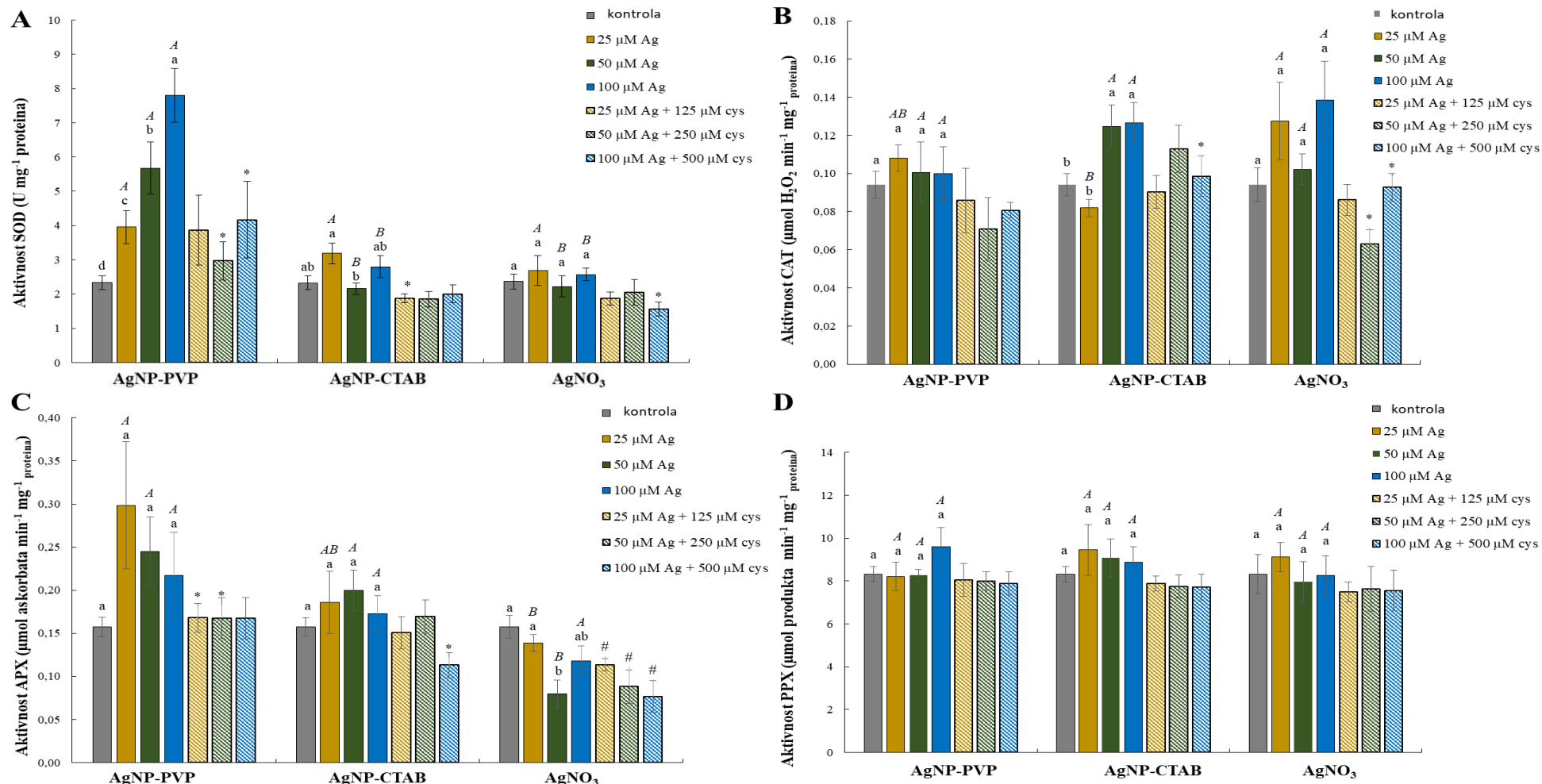
4.4.2.1. Korijen

Tretmani s AgNP-PVP povećali su aktivnosti SOD proporcionalno povećanju koncentracije AgNP. Dodatak cisteina tretmanima s 50 i 100 μM AgNP-PVP značajno je smanjio aktivnost SOD u odnosu na tretmane bez cisteina. Tretmani s AgNP-CTAB i AgNO_3 nisu značajno promijenili aktivnost SOD u odnosu na kontrolu. Dodatak cisteina smanjio je aktivnost SOD u kombiniranim tretmanima 25 μM AgNP-CTAB i 125 μM cistein te 100 μM AgNO_3 i 500 μM cistein u odnosu na odgovarajuće tretmane bez cisteina. Usporedba učinaka istih koncentracija različitih tretmana pokazala je da su 50 i 100 μM AgNP-PVP imali značajno jači učinak na aktivnost SOD u odnosu na tretmane s AgNP-CTAB i AgNO_3 (Slika 24.A).

Tretmani s AgNP-PVP ni njihove kombinacije s cisteinom nisu značajno promijenile aktivnost CAT, dok su je 50 i 100 μM AgNP-CTAB značajno povećale, što je bilo ublaženo dodatkom cisteina, iako je statistički značajno samo kod najviše koncentracije kombiniranog tretmana u odnosu na tretman bez cisteina. Vrijednosti u kombiniranim tretmanima s cisteinom bile su slične onima u kontroli. Sve koncentracije AgNO_3 povećale su aktivnost CAT, iako ne statistički značajno. Dodatak cisteina ublažio je učinak AgNO_3 , iako statistički značajno samo za veće koncentracije kombiniranog tretmana u odnosu na tretmane bez cisteina. Usporedbom učinaka istih koncentracija različitih tipova tretmana uočen je značajno veći učinak 25 μM AgNO_3 na aktivnost CAT u odnosu na istu koncentraciju AgNP-CTAB (Slika 24.B).

Svi tretmani s AgNP povećali su aktivnost APX u odnosu na kontrolu, iako ne statistički značajno. Kombinirani tretmani s cisteinom ublažili su učinak za sve koncentracije AgNP-PVP i najveću koncentraciju AgNP-CTAB. Tretman s 50 μM AgNO_3 smanjio je aktivnosti APX, a svi kombinirani tretmani s AgNO_3 i cisteinom smanjili su aktivnosti na vrijednosti niže od kontrole. Usporedba različitih tipova tretmana istih koncentracija pokazala je jači učinak 25 i 50 μM AgNP, posebice AgNP-PVP, u odnosu na AgNO_3 (Slika 24.C).

100 μM AgNP-PVP povećao je aktivnosti PPX u odnosu na kontrolu, što je ublaženo dodatkom cisteina. Sve koncentracije AgNP-CTAB povećale su aktivnost PPX u odnosu na kontrolu, iako ne statistički značajno. Kombinirani tretmani AgNP-CTAB i cisteina smanjili su vrijednosti na one slične kontroli i vrijednosti manje u odnosu na tretmane AgNP-CTAB bez cisteina. AgNO_3 je povećao aktivnost PPX samo pri najnižoj koncentraciji, iako ne statistički značajno (Slika 24.D). U kombiniranim tretmanima s AgNO_3 i cisteinom, vrijednosti su bile smanjene u odnosu na kontrolu i odgovarajuće tretmane bez cisteina, iako ne statistički značajno (Slika 24.D).



Slika 24. Aktivnosti antioksidacijskih enzima **A**) superoksid dismutaze (SOD), **B**) katalaze (CAT), **C**) askorbat peroksidaze (APX), **D**) pirogalol peroksidaze (PPX) u korijenu nakon tretmana s 25, 50, i 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ i njihovih kombinacija sa 125, 250 i 500 μM cisteinom (cys). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška iz dva nezavisna pokusa, svaki sa po 6 bioloških replika. Stupci označeni različitim slovima označavaju značajne razlike ($p \leq 0,05$, jednosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test) između različitih koncentracija istog tretmana i kontrole (mala slova) ili istih koncentracija različitih tretmana (velika slova). Zvezdica (*) označava značajnu razliku između tretmana sa i bez cisteina pri odgovarajućoj koncentraciji, dok ljestve (#) označavaju značajnu razliku između kombiniranih tretmana s cisteinom i kontrole.

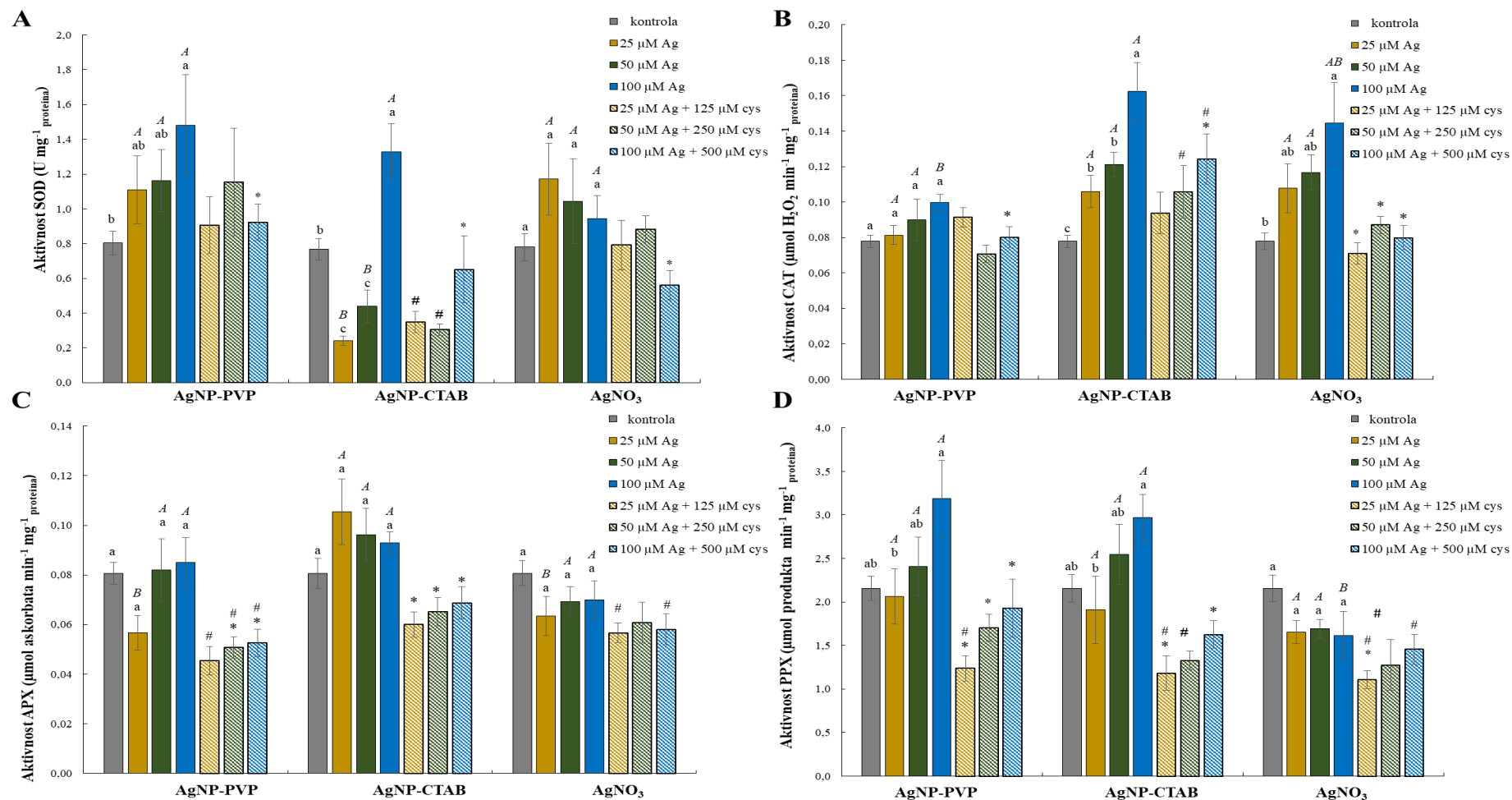
4.4.2.2. List

Svi tretmani s AgNP-PVP povećali su aktivnost SOD u usporedbi s kontrolom, iako statistički značajno samo za 100 μM koncentraciju. Dodatak cisteina smanjio je aktivnost u odnosu na tretmane bez cisteina, ali statistički značajno samo za najveću koncentraciju. 25 i 50 μM AgNP-CTAB smanjili su aktivnost SOD, dok je 100 μM koncentracija rezultirala značajnim povećanjem. Najveća koncentracija AgNP-CTAB i cisteina dovela je do značajnog smanjenja aktivnosti SOD u odnosu na tretman bez cisteina. AgNO_3 nije imao utjecaj na aktivnost SOD, osim najveće koncentracije AgNO_3 s cisteinom koji je dao manju aktivnost u odnosu na tretman bez cisteina. Smanjenje aktivnosti SOD zabilježeno je nakon izlaganja 25 i 50 μM AgNP-CTAB u odnosu na iste koncentracije AgNP-PVP i AgNO_3 (Slika 25.A).

Tretmani s AgNP-PVP i njihove kombinacije s cisteinom nisu utjecali na aktivnost CAT. Svi tretmani s AgNP-CTAB i AgNO_3 povećali su aktivnost CAT, statistički značajno za sve koncentracije AgNP-CTAB i 100 μM AgNO_3 . Kombinirani tretmani AgNP-CTAB i cisteina povećali su aktivnost CAT u odnosu na kontrolu, iako su vrijednosti bile značajno niže u odnosu na tretmane bez cisteina. Dodatak cisteina tretmanima s AgNO_3 rezultirao je vrijednostima sličnim kao u kontroli. Usporedbom učinaka istih koncentracija različitih tipova tretmana, zabilježena je značajno veća aktivnost CAT nakon tretmana sa 100 μM AgNP-CTAB u odnosu na istu koncentraciju AgNP-PVP (Slika 25.B).

Niti jedan tretman sa srebrom nije značajno utjecao na aktivnost APX, dok je dodatak cisteina tretmanima s AgNP smanjio aktivnost u odnosu na tretmane bez cisteina. Svi kombinirani tretmani AgNP-PVP s cisteinom te najmanja i najveća koncentracija kombiniranog tretmana AgNO_3 s cisteinom rezultirali su značajno nižim vrijednostima od onih izmjerenih u kontroli. Usporedbom različitih tipova tretmana istih koncentracija, zabilježen je značajno jači učinak 25 μM AgNP-CTAB u odnosu na iste koncentracije AgNP-PVP i AgNO_3 (Slika 25.C).

Aktivnost PPX nije se značajno promijenila nakon tretmana s AgNP, ali su 100 μM AgNP-PVP i AgNP-CTAB dali značajno više vrijednosti u usporedbi s 25 μM koncentracijom. Dodatak cisteina tretmanima s AgNP smanjio je aktivnost PPX u odnosu na tretmane bez cisteina, dok je pri nižim koncentracijama tretmana AgNP i cisteina aktivnost bila čak niža od vrijednosti u kontroli. Tretmani s AgNO_3 nisu utjecali na aktivnost PPX, iako je dodatak cisteina izazvao blago sniženje aktivnosti u odnosu na kontrolu, statistički značajno samo za 25 μM koncentraciju. Značajno povećanje aktivnosti PPX izmjereno je nakon tretmana sa 100 μM koncentracijom oba tipa AgNP u odnosu na istu koncentraciju AgNO_3 (Slika 25.D).



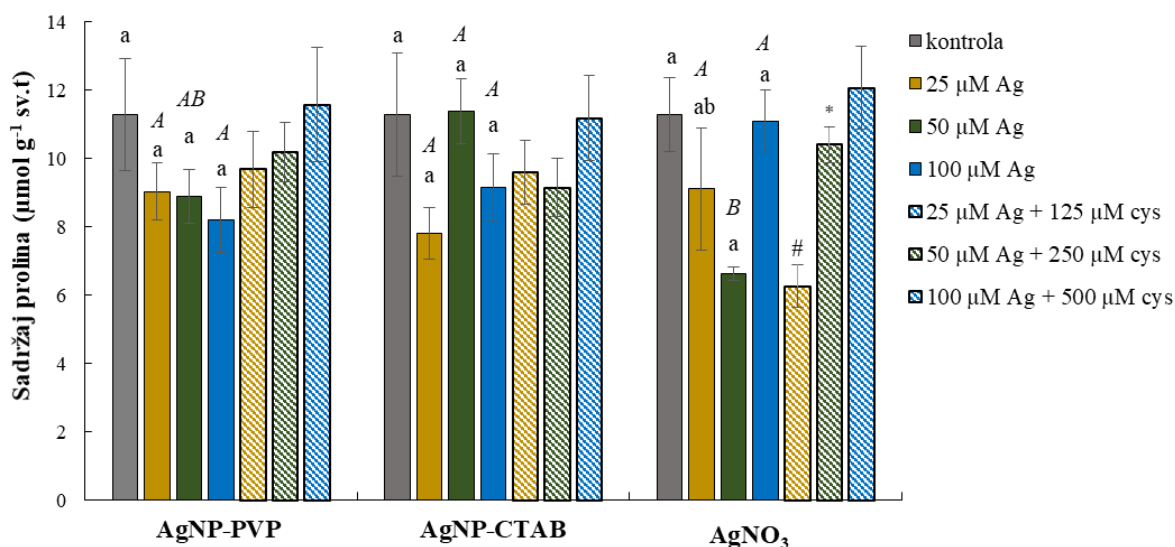
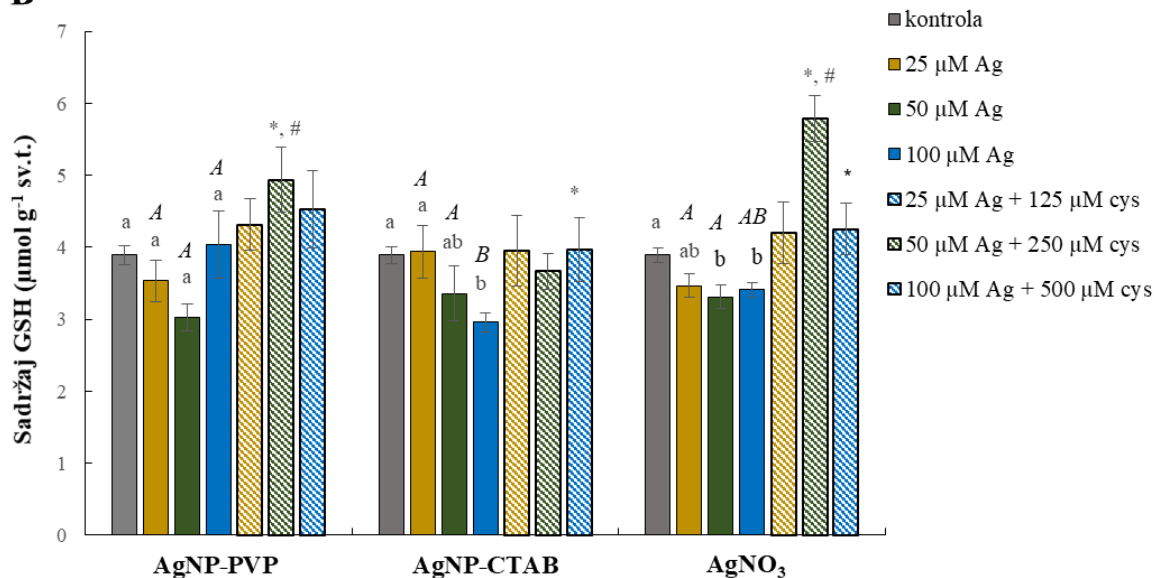
Slika 25. Aktivnosti antioksidacijskih enzima **A**) superoksid dismutaze (SOD), **B**) katalaze (CAT), **C**) askorbat peroksidaze (APX), **D**) pirogalol peroksidase (PPX) u listu nakon tretmana s 25, 50, i 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ i njihovih kombinacija sa 125, 250 i 500 μM cisteinom (cys). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška iz dva nezavisna pokusa, svaki sa po 6 bioloških replika. Stupci označeni različitim slovima označavaju značajne razlike ($p \leq 0,05$, jednosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test) između različitih koncentracija istog tretmana i kontrole (mala slova) ili istih koncentracija različitih tretmana (velika slova). Zvezdica (*) označava značajnu razliku između tretmana sa i bez cisteina pri odgovarajućoj koncentraciji, dok ljestve (#) označavaju značajnu razliku između kombiniranih tretmana s cisteinom i kontrole.

4.4.3. Sadržaj neenzimskih antioksidansa

4.4.3.1. Korijen

Tretmani s AgNP nisu značajno promijenili sadržaj prolina u odnosu na kontrolu, a dodatak cisteina nije rezultirao promjenama vrijednosti u odnosu na kontrolu i odgovarajuće tretmane bez cisteina. Među tretmanima s AgNO₃, samo 50 μM koncentracija značajno je smanjila sadržaja prolina u odnosu na kontrolu. Dodatak cisteina tretmanima s AgNO₃ smanjio je sadržaj prolina u odnosu na kontrolu kod najniže koncentracije, a u odnosu na odgovarajući tretman bez cisteina kod srednje koncentracije AgNO₃. Usporedba učinaka različitih tipova tretmana istih koncentracija pokazala je da je tretman s AgNP-CTAB imao jači učinak od AgNO₃ u 50 μM koncentraciji (Slika 26.A).

Tretmani s AgNP-PVP doveli su do smanjenja sadržaja GSH u odnosu na kontrolu, iako ne statistički značajno, dok je dodatak cisteina 50 μM tretmanu rezultirao povećanim sadržajem GSH u odnosu na kontrolu i odgovarajući tretman bez cisteina. Tretman s AgNP-CTAB u koncentraciji 100 μM smanjio je sadržaj GSH u usporedbi s kontrolom i dvije niže koncentracije, ali takvog učinka nije bilo nakon dodatka cisteina. Tretmani s 50 i 100 μM AgNO₃ izazvali su smanjenje sadržaja GSH u odnosu na kontrolu; dodatak cisteina rezultirao je povećanjem vrijednosti u odnosu na odgovarajući tretman bez cisteina za obje koncentracije, dok je kod 50 μM koncentracije vrijednost bila značajno povećana i u odnosu na kontrolu. Nakon usporedbe učinaka istih koncentracija različitih tipova AgNP, značajno veći učinak na sadržaj GSH utvrđen je za 100 μM koncentraciju AgNP-PVP u odnosu na AgNP-CTAB (Slika 26.B).

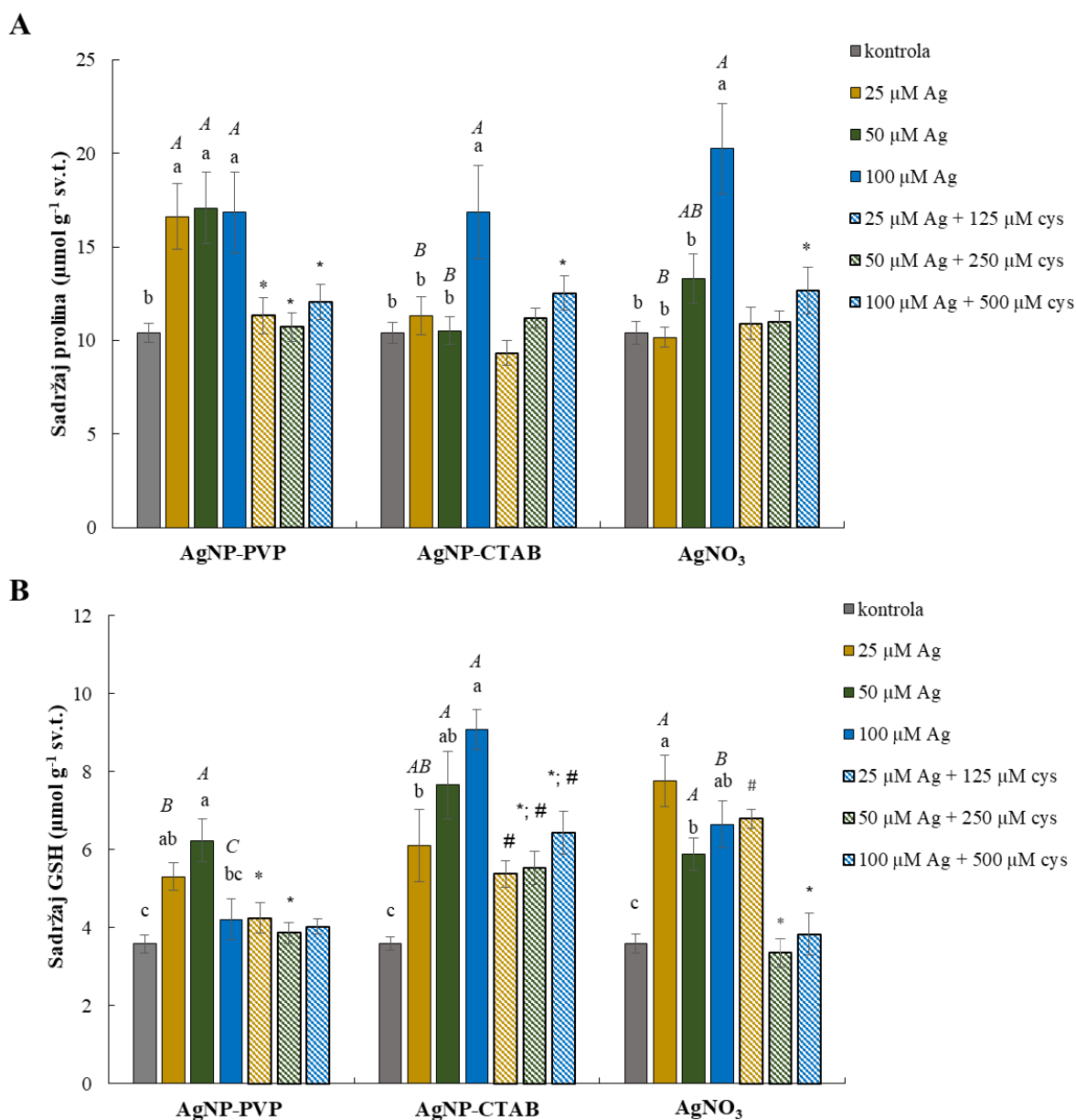
A**B**

Slika 26. Sadržaj **A)** prolina i **B)** reduciranog glutationa (GSH) u korijenu nakon tretmana s 25, 50, i 100 µM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ i njihovih kombinacija sa 125, 250 i 500 µM cisteinom (cys). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost ± standardna pogreška iz dva nezavisna pokusa, svaki sa po 6 bioloških replika. Stupci označeni različitim slovima označavaju značajne razlike ($p \leq 0,05$, jednosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test) između različitih koncentracija istog tretmana i kontrole (mala slova) ili istih koncentracija različitih tretmana (velika slova). Zvezdica (*) označava značajnu razliku između tretmana sa i bez cisteina pri odgovarajućoj koncentraciji, dok ljestve (#) označavaju značajnu razliku između kombiniranih tretmana s cisteinom i kontrole. sv.t. – svježe tkivo.

4.4.3.2. List

Svi tretmani s AgNP povećali su sadržaj prolina u usporedbi s kontrolom, pri čemu je AgNP-PVP izazvao statistički značajno povećanje pri svim koncentracijama, a AgNP-CTAB samo pri najvećoj. Dodatak cisteina tretmanima s AgNP rezultirao je smanjenjem sadržaja prolina u odnosu na odgovarajuće tretmane bez cisteina, na vrijednosti slične kontroli. Veće koncentracije AgNO₃ (50 i 100 μM) povećale su sadržaj prolina, što je bilo statistički značajno samo za najveću koncentraciju, a vrijednosti su smanjene dodatkom cisteina. Uspoređujući učinke istih koncentracija različitih tretmana, vidljivo je da je 25 μM AgNP-PVP imao jači učinak u odnosu na iste koncentracije AgNP-CTAB i AgNO₃, dok je 50 μM AgNP-PVP pokazao jači učinak u odnosu na AgNP-CTAB iste koncentracije (Slika 27.A).

Tretmani s AgNP-PVP povećali su sadržaj reduciranog GSH, što je bilo statistički značajno pri 25 i 50 μM koncentraciji i uspješno ublaženo dodatkom cisteina. Sadržaj GSH povećavao se proporcionalno koncentraciji AgNP-CTAB, i u svim tretmanima bio je značajno veći u usporedbi s kontrolom. Nakon kombiniranih tretmana s cisteinom, sadržaj GSH bio je značajno manji u odnosu na odgovarajuće koncentracije AgNP-CTAB bez cisteina, iako su vrijednosti još uvijek bile značajno veće u odnosu na kontrolu. Svi tretmani s AgNO₃ povećali su sadržaj GSH u odnosu na kontrolu, a najveća vrijednost izmjerena je nakon izlaganja 25 μM AgNO₃. Učinak tretmana s AgNO₃ ublažen je u kombiniranim tretmanima s cisteinom, što je bilo statistički značajno za 50 i 100 μM koncentracije. Značajno veći učinak na sadržaj GSH pokazao je tretman s 25 μM AgNO₃ u odnosu na istu koncentraciju AgNP-PVP, dok je pri najvećoj koncentraciji (100 μM) najjači učinak pokazao tretman s AgNP-CTAB u odnosu na druga dva tipa tretmana (Slika 27.B).

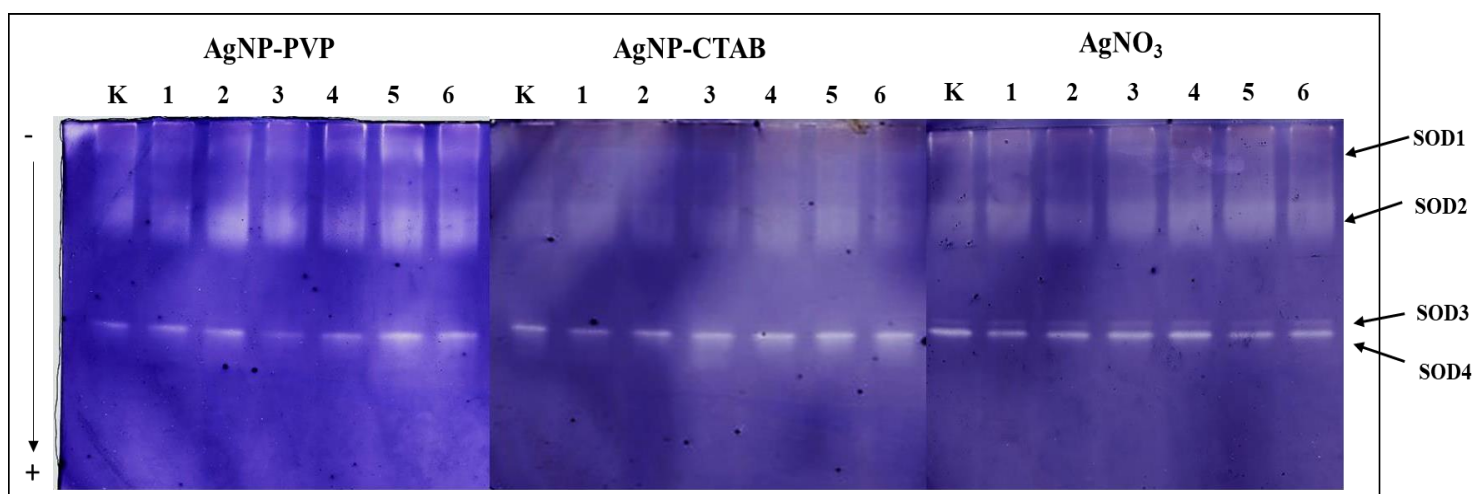


Slika 27. Sadržaj **A)** prolina i **B)** reduciranog glutationa (GSH) u listu nakon tretmana s 25, 50, i 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ i njihovih kombinacija sa 125, 250 i 500 μM cisteinom (cys). Rezultati su prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška iz dva nezavisna pokusa, svaki sa po 6 bioloških replika. Stupci označeni različitim slovima označavaju značajne razlike ($p \leq 0,05$, jednosmjerna ANOVA i post-hoc Duncan test) između različitih koncentracija istog tretmana i kontrole (mala slova) ili istih koncentracija različitih tretmana (velika slova). Zvezdica (*) označava značajnu razliku između tretmana sa i bez cisteina pri odgovarajućoj koncentraciji, dok ljestve (#) označavaju značajnu razliku između kombiniranih tretmana s cisteinom i kontrole. sv.t. – svježe tkivo.

4.4.4. Detekcija izoformi antioksidacijskih enzima u gelu

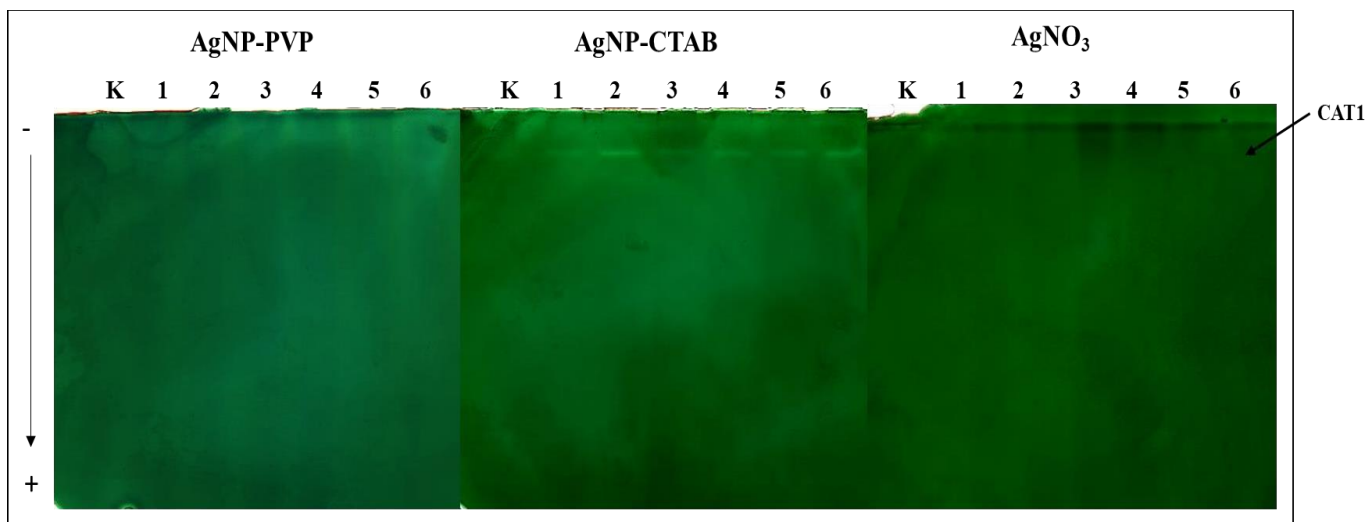
4.4.4.1. Korijen

Nakon razdvajanja proteina korijena nativnom PAG elektroforezom, u gelovima su detektirane četiri izoforme enzima SOD različitih elektroforetskih pokretljivosti, označene kao SOD1-4 (Slika 28). U tretmanima s oba tipa AgNP detektirane su tri izoforme enzima SOD (SOD1, SOD2 i SOD4), dok su u kontroli i tretmanima s AgNO₃ detektirane sve četiri izoforme. Iz intenziteta pojedinih vrpca moguće je zaključiti o aktivnosti pojedine izoforme enzima SOD u odgovoru na određeni tretman. Izoforme SOD1 i SOD2 pokazale su povećanu aktivnost u odnosu na kontrolu u svim tretmanima s AgNP-PVP, dok tretmani s AgNP-CTAB i AgNO₃ nisu rezultirali promjenama u odnosu na kontrolu, što je u skladu s rezultatima aktivnosti izmjerenim spektrofotometrijski (Slika 24.A). Izoforma SOD3 detektirana je samo nakon tretmana s AgNO₃, dok je izoforma SOD4 u odnosu na kontrolu pokazala povećanu aktivnost nakon tretmana s 25 i 50 μM AgNP-PVP i kombinacije 50 μM AgNP-PVP i 250 μM cisteina, 100 μM AgNP-CTAB i AgNO₃ te nakon svih kombiniranih tretmana AgNP-CTAB s cisteinom.



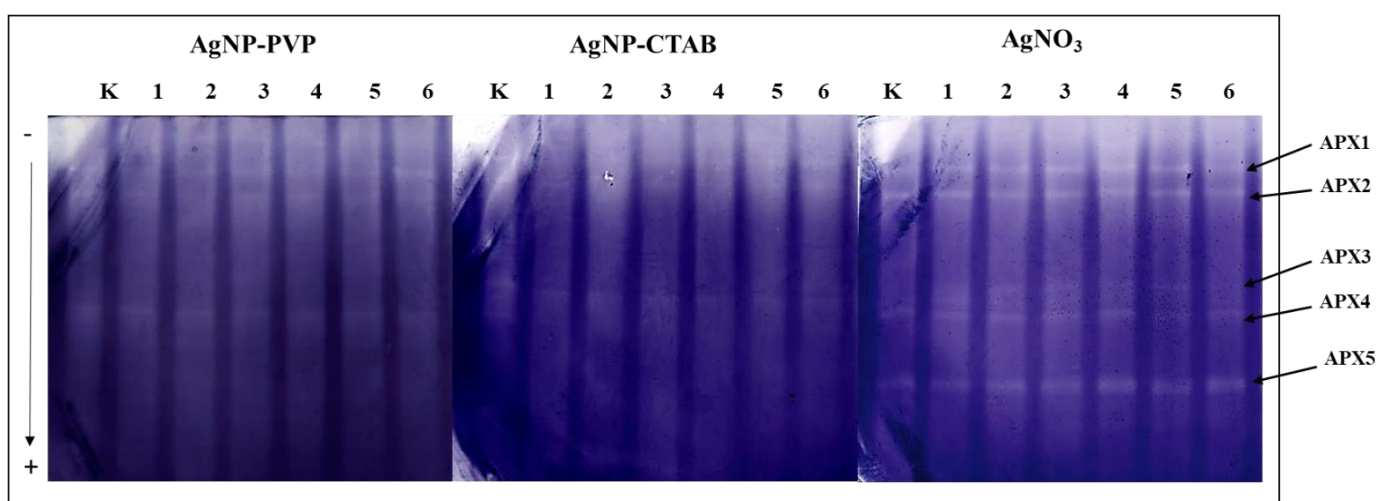
Slika 28. Izoforme superoksid dismutaze (SOD) u korijenu nakon tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB, AgNO₃ i njihovih kombinacija s cisteinom (cys) nakon razdvajanja proteina nativnom 10% PAG elektroforezom. K – kontrola, 1 – 25 μM Ag, 2 – 50 μM Ag, 3 – 100 μM Ag, 4 – 25 μM Ag + 125 μM cys, 5 – 50 μM Ag + 250 μM cys, 6 – 100 μM Ag + 500 μM cys.

Enzim CAT, označena kao CAT1 detektiran je samo nakon tretmana s AgNP-CTAB (Slika 29.), a povećana aktivnost u skladu je s rezultatima dobivenim spektrofotometrijskim mjerenjima (Slika 24.B). U kontrolnim uzorcima, kao i u uzorcima nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO₃, CAT nije detektirana.



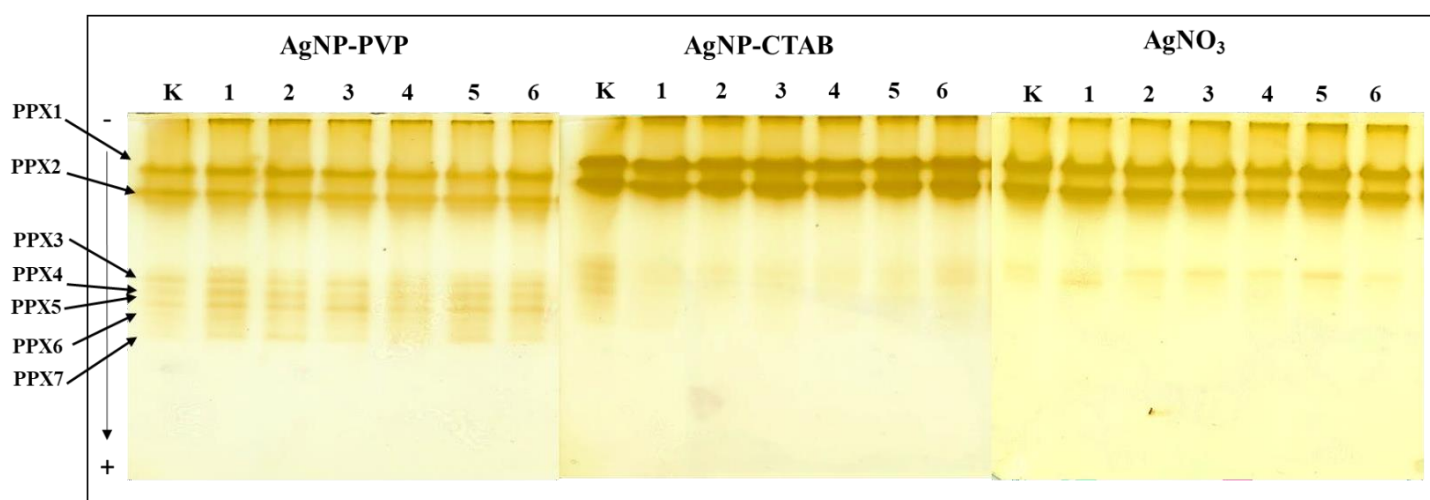
Slika 29. Izoforme katalaze (CAT) u korijenu nakon tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB, AgNO₃ i njihovih kombinacija s cisteinom (cys) nakon razdvajanja proteina nativnom 10% PAG elektroforezom. K – kontrola, 1 – 25 μM Ag, 2 – 50 μM Ag, 3 – 100 μM Ag, 4 – 25 μM Ag + 125 μM cys, 5 – 50 μM Ag + 250 μM cys, 6 – 100 μM Ag + 500 μM cys.

Detektirano je pet izoformi APX, koje su označene kao APX1-5 prema elektroforetskoj pokretljivosti, a broj izoformi razlikovao se u tretmanima (Slika 30). U kontroli su zabilježene sve izoforme, dok su izoforme APX1, APX2 i APX4 detektirane u tretmanima s AgNP-PVP i AgNP-CTAB i njihovim kombinacijama s cisteinom. Iz intenziteta vrpce vidljivo je da se aktivnost APX nije promijenila u odnosu na kontrolu, što je u skladu s rezultatima aktivnosti (Slika 24.C). Nakon tretmana s AgNO₃ i njegovim kombinacijama s cisteinom zabilježeno je svih pet izoformi, čiji se intenzitet nije značajno promijenio u odnosu na kontrolu.



Slika 30. Izoforme askorbat peroksidaze (APX) u korijenu nakon tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB, AgNO₃ i njihovih kombinacija s cisteinom (cys) nakon razdvajanja proteina nativnom 10% PAG elektroforezom. K – kontrola, 1 – 25 μM Ag, 2 – 50 μM Ag, 3 – 100 μM Ag, 4 – 25 μM Ag + 125 μM cys, 5 – 50 μM Ag + 250 μM cys, 6 – 100 μM Ag + 500 μM cys.

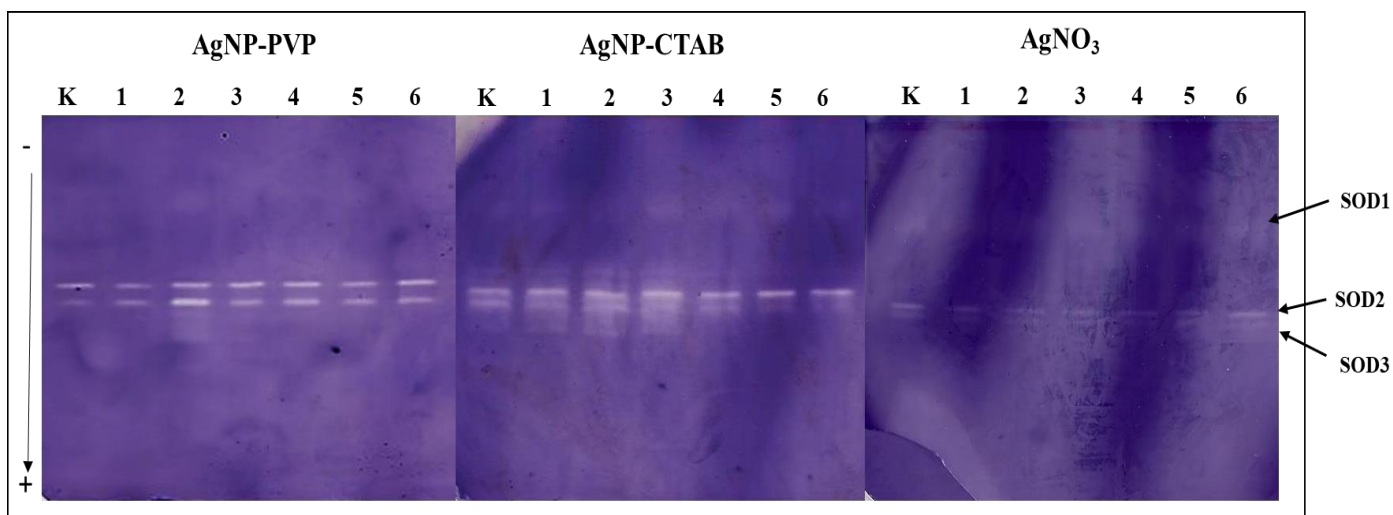
Detektirano je 7 izoformi PPX, koje su označene kao PPX1-7 (Slika 31.) i zabilježene nakon tretmana s oba tipa AgNP, dok su nakon tretmana s AgNO₃ detektirane samo četiri (PPX1-4). Aktivnosti izoformi PPX1 i PPX2 nisu se značajno promijenile u odnosu na kontrolu niti nakon jednog tipa tretmana, dok je pojačana aktivnost vrpce PPX4-7 zabilježena nakon tretmana s 25 i 50 μM AgNP-PVP i njihovih kombinacija s cisteinom, a 100 μM AgNP-PVP i njegova kombinacija s cisteinom povećale su aktivnost izoformi PPX4 i PPX6. Aktivnosti izoformi PPX3-7 bile su smanjene nakon svih tretmana s AgNP-CTAB u usporedbi s kontrolom. Izoforma PPX3 pokazala je povećanu aktivnost u odnosu na kontrolu u većini tretmana s AgNO₃, s iznimkama 25 μM AgNO₃ i 100 μM AgNO₃ s 500 μM cisteinom .



Slika 31. Izoforme pirogalol peroksidaze (PPX) u korijenu nakon tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB, AgNO₃ i njihovih kombinacija s cisteinom (cys) nakon razdvajanja proteina nativnom 10% PAG elektroforezom. K – kontrola, 1 – 25 μM Ag, 2 – 50 μM Ag, 3 – 100 μM Ag, 4 – 25 μM Ag + 125 μM cys, 5 – 50 μM Ag + 250 μM cys, 6 – 100 μM Ag + 500 μM cys.

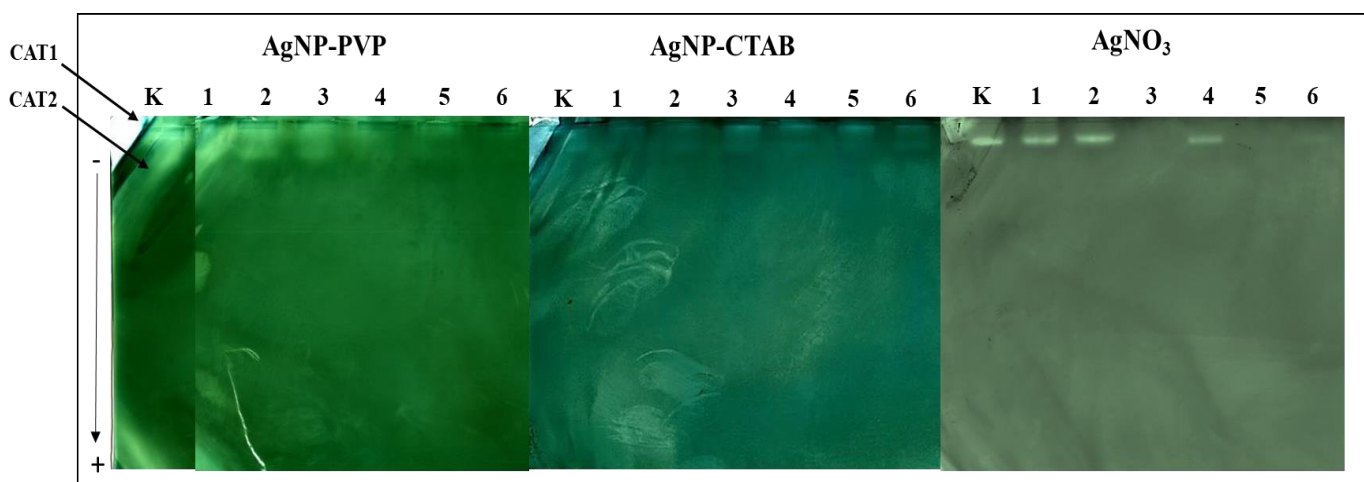
4.4.4.2. List

U proteinima lista detektirane su tri izoforme enzima SOD (SOD1-3), od kojih su SOD2 i SOD3 bile vidljive u kontroli, a sve tri vrpce u tretmanima s AgNP i AgNO₃ (Slika 32). Povećana aktivnost SOD2 zabilježena je nakon tretmana s 50 i 100 μM AgNP-PVP i 100 μM AgNP-CTAB u odnosu na kontrolu, što je u skladu s rezultatima izmjerenim spektrofotometrijski (Slika 25.A). Dodatak cisteina nije doveo do promjena u odnosu na odgovarajuće tretmane bez cisteina. Jači intenzitet vrpce SOD3 zabilježen je nakon tretmana s AgNP-PVP (Slika 25.A), što je djelomično u skladu s rezultatima spektrofotometrijskog mjerenja. Tretmani s AgNP-CTAB povećali su aktivnost izoforme SOD3, dok ga je dodatak cisteina smanjio. Tretmani s AgNO₃ nisu izazvali promjene u aktivnosti u odnosu na kontrolu.



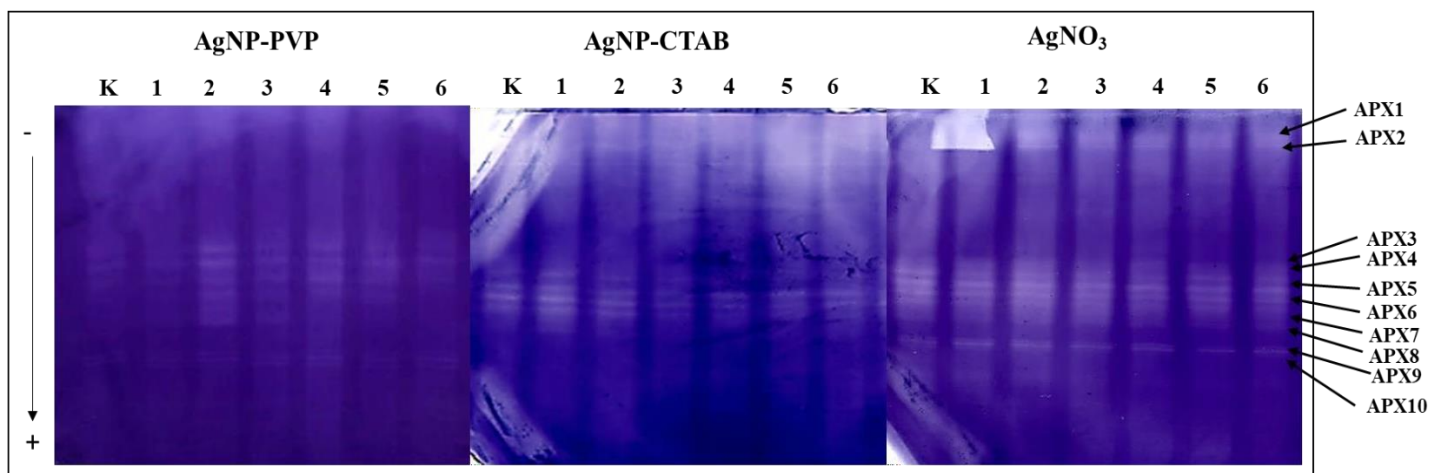
Slika 32. Izoforme superoksid dismutaze (SOD) u listu nakon tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB, AgNO₃ i njihovih kombinacija s cisteinom (cys) nakon razdvajanja proteina nativnom 10% PAG elektroforezom. K – kontrola, 1 – 25 μM Ag, 2 – 50 μM Ag, 3 – 100 μM Ag, 4 – 25 μM Ag + 125 μM cys, 5 – 50 μM Ag + 250 μM cys, 6 – 100 μM Ag + 500 μM cys.

U proteinima lista zabilježene su dvije vrpce enzima CAT (CAT1 i CAT2), obje prisutne u kontroli i nakon tretmana s AgNP i njihovih kombinacija s cisteinom. Nakon tretmana s AgNO₃ i njegove kombinacije s cisteinom, detektirana je samo izoforma CAT1 (Slika 33.). Nakon izlaganja AgNP-PVP, intenzitet obje vrpce bio je podjednak kao u kontroli, no slabiji u usporedbi s kombiniranim tretmanima s cisteinom. To je bilo osobito izraženo na najvećoj koncentraciji kombiniranog tretmana AgNP-PVP s cisteinom i u skladu s rezultatima izmjerenim spektrofotometrijski (Slika 25.B). Najveća aktivnost obje izoforme CAT zabilježena je nakon tretmana sa 100 μM AgNP-CTAB (Slika 33.), što je također u skladu s rezultatima dobivenim spektrofotometrijski (Slika 25.B). Tretmani s AgNP-CTAB u kombinaciji s cisteinom povećali su aktivnost CAT1 i CAT2 u odnosu na kontrolu, a rezultat je bio u skladu sa spektrofotometrijskim mjerenjem aktivnosti (Slika 25.B). Tretmani sa 100 μM AgNO₃ te kombinirani tretmani 50 i 100 μM AgNO₃ s cisteinom rezultirali su potpunom inhibicijom aktivnosti izoforme CAT2.



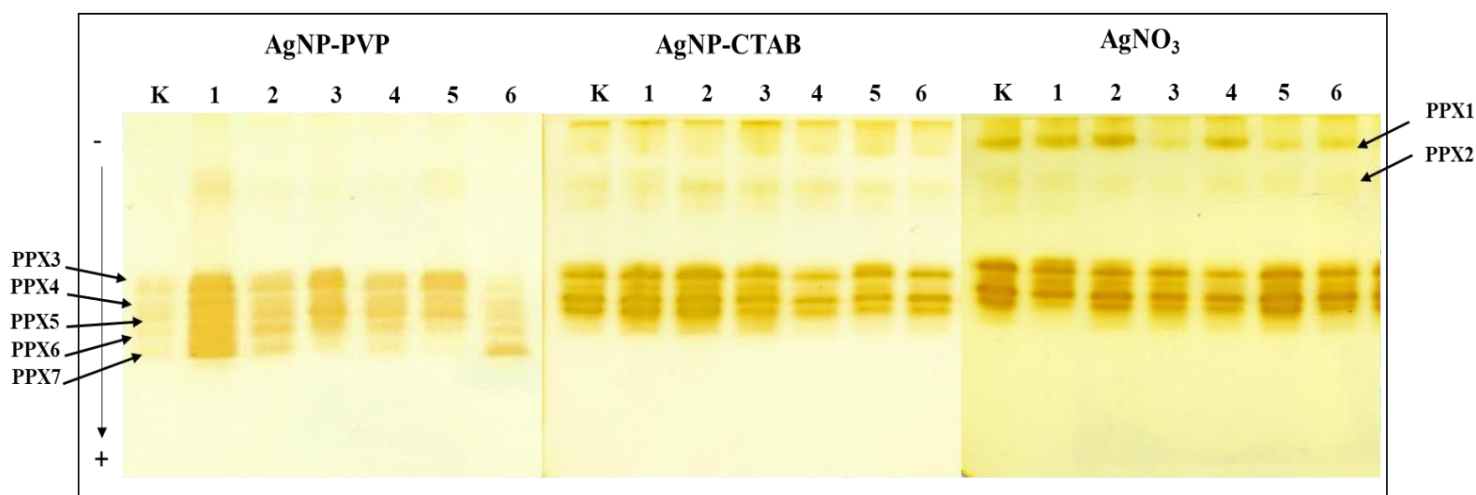
Slika 33. Izoforme katalaze (CAT) u listu nakon tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB, AgNO₃ i njihovih kombinacija s cisteinom (cys) nakon razdvajanja proteina nativnom 10% PAG elektroforezom. K – kontrola, 1 – 25 μM Ag, 2 – 50 μM Ag, 3 – 100 μM Ag, 4 – 25 μM Ag + 125 μM cys, 5 – 50 μM Ag + 250 μM cys, 6 – 100 μM Ag + 500 μM cys.

Ukupno 10 izoformi enzima APX (označenih kao APX1-10) detektirano je u kontroli (Slika 34). U tretmanima s AgNP-PVP zabilježeno je 8 vrpca (APX3-10), među kojima su najveći porast aktivnosti u odnosu na kontrolu i odgovarajući kombinirani tretman s cisteinom pokazale izoforme APX3-8 nakon tretmana s 50 μM koncentracijom, dok se intenzitet vrpca APX9 i APX10 nije promijenio. U tretmanima s AgNP-CTAB također su detektirane izoforme APX3-10, a aktivnost vrpca APX3-8 nešto je opadala s povećanjem koncentracije tretmana, dok je u kombiniranim tretmanima s cisteinom intenzitet bio sličan kao u kontroli. Vrpce APX9 i APX 10 imale su sličan intenzitet u kontroli i svim tretmanima s AgNP-CTAB. Svih 10 izoformi APX detektirano je nakon tretmana s AgNO₃, međutim nijedna od njih nije pokazala promjenu u aktivnosti u odnosu na kontrolu, što je u skladu s rezultatima dobivenim spektrofotometrijski (Slika 25.C).



Slika 34. Izoforme askorbat peroksidaze (APX) u listu nakon tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB, AgNO₃ i njihovih kombinacija s cisteinom (cys) nakon razdvajanja proteina nativnom 10% PAG elektroforezom. K – kontrola, 1 – 25 μM Ag, 2 – 50 μM Ag, 3 – 100 μM Ag, 4 – 25 μM Ag + 125 μM cys, 5 – 50 μM Ag + 250 μM cys, 6 – 100 μM Ag + 500 μM cys.

Ukupno je detektirano 7 izoformi enzima PPX, označene kao PPX1-7 (Slika 34.). U tretmanima s AgNP-PVP detektirano je 6 izoformi (PPX2-7), među kojima je vrpca PPX2 imala pojačanu aktivnost nakon tretmana s 25 μM koncentracijom u odnosu na kontrolu. Povećanje aktivnosti izoformi PPX3-7 zabilježeno nakon svih tretmana s AgNP-PVP, što je dodatkom cisteina ublaženo samo u kombiniranim tretmanima sa 25 i 100 μM koncentracijom AgNP-PVP. U tretmanima s AgNP-CTAB detektirano je 7 vrpca. Izoforma PPX2 imala je podjednaku aktivnost u kontroli i tretmanima s AgNP-CTAB, uz iznimku 100 μM AgNP-CTAB s 500 μM cisteinom, gdje je njena aktivnost bila smanjena. Tretmani s AgNP-CTAB blago su povećali aktivnost izoformi PPX3-7, iako je učinak ublažen dodatkom cisteina u kombiniranim tretmanima. Nakon tretmana s AgNO₃ detektirano je 6 vrpca. Izoforma PPX1 detektirana je samo nakon tretmana s AgNO₃, a aktivnost joj je bila inhibirana 100 μM koncentracijom te nakon kombiniranih tretmana 50 i 100 μM AgNO₃ s cisteinom. Nešto slabiji intenzitet vrpca PPX3-6 zabilježen je nakon svih koncentracija tretmana s AgNO₃ i njihovih kombinacija s cisteinom, osim kod 50 μM koncentracije u kombinaciji s cisteinom, gdje je aktivnost navedenih izoformi bila najslabija kontroli. Rezultati aktivnosti izoformi PPX na gelu nakon sva tri tipa tretmana u skladu su sa rezultatima dobivenim spektrofotometrijski (Slika 25.D).

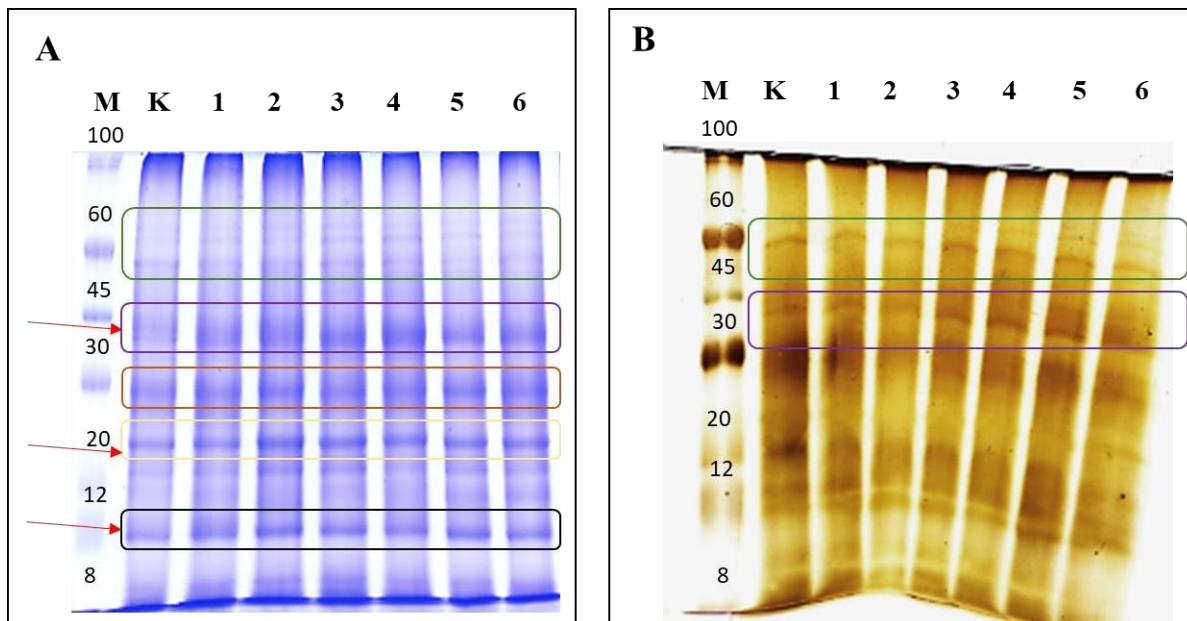


Slika 35. Aktivnost izoformi pirogalol peroksidaze (PPX) u listu nakon tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB, AgNO₃ i njihovih kombinacija s cisteinom (cys) nakon razdvajanja proteina nativnom 10% PAG elektroforezom. K – kontrola, 1 – 25 μM Ag, 2 – 50 μM Ag, 3 – 100 μM Ag, 4 – 25 μM Ag + 125 μM cys, 5 – 50 μM Ag + 250 μM cys, 6 – 100 μM Ag + 500 μM cys.

4.4.5. Ekspresija antioksidacijskih enzima

4.4.5.1. Korijen

Kao provjeru uspješnosti izolacije proteina, a prije imunodetekcije antioksidacijskih enzima metodom *Western blotting*, ukupne topive protein korijena razdvojila sam metodom SDS-PAGE, a proteinske vrpce vizualizirala bojom CBB (Slika 36.A) te bojanjem s AgNO₃ (Slika 36.B). Diferencijalna ekspresija između kontrole i tretmana, te između različitih tipova tretmana uočena je za većinu proteinskih vrpce koje su prema molekulskim masama označene linijama različitih boja (crna – 12 kDa, žuta – 25 kDa, narančasta – 30 kDa, ljubičasta – 40 kDa, zelena – 60-75 kD) (Slika 36.). Najveće povećanje ekspresije nakon svih tipova tretmana u odnosu na kontrolu pokazale su vrpce od otprilike 12 (crna linija), 25 (žuta linija) i 40 kDa, (ljubičasta linija; Slika 36.A). Na gelu obojanom s AgNO₃ teško je uočiti razlike u intenzitetu pojedinih vrpce.



Slika 36. Razlike u ekspresiji ukupnih topivih proteina u korijenu nakon tretmana sa 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, te njihovim kombinacijama s 500 μM cisteinom (cys) nakon razdvajanja proteina 12% SDS-PAG elektroforezom i vizualizacije **A**) bojom CBB i **B**) s AgNO₃. M – biljezi molekularnih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 100 μM AgNP-PVP, 2 – 100 μM AgNP-CTAB, 3 – 100 μM AgNO₃, 4 – 100 μM AgNP-PVP + 500 μM cys, 5 – 100 μM AgNP-CTAB + 500 μM cys, 6 – 100 μM AgNO₃ + 500 μM cys. Skupine diferencijalno eksprimiranih proteina označene su različito obojanim linijama: crna – 12 kDa, žuta – 25 kDa, narančasta – 30 kDa, ljubičasta – 40-45 kDa, zelena – 60-75 kDa. Strelice označavaju vrpce kod kojih je zabilježena najveća promjena u ekspresiji u tretmanima u odnosu na kontrolu.

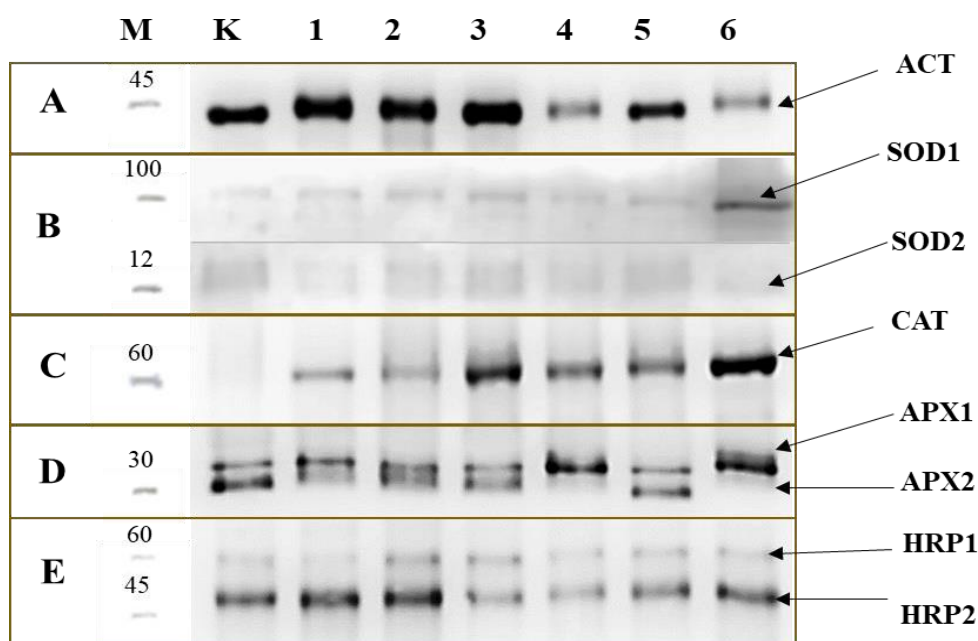
Ukupni topivi proteini korijena razdvojeni su SDS-PAG elektroforezom i preneseni s gelova na nitrocelulozne membrane, koje su potom inkubirane u različitim primarnim antitijelima s ciljem detekcije antioksidacijskih enzima SOD, CAT, APX i HRP. Kao kontrola nanošenja uzoraka (tzv. *loading control*) trebao je biti aktin (ACT) za kojeg je pretpostavljena konstitutivna ekspresija u svim tipovima stanica (An i sur. 1996). Međutim, svi tretmani s AgNP i AgNO₃ izazvali su povećanje ekspresije proteina ACT u odnosu na kontrolu, dok su kombinirani tretmani s cisteinom uglavnom smanjili njegovu ekspresiju u odnosu na kontrolu i tretmane bez cisteina (Slika 37.A).

Na membrani inkubiranoj s primarnim antitijelom specifičnim za izoformu Cu/Zn enzima SOD, zabilježene su dvije vrpce od oko 100 i 15 kDa, označene kao SOD1 i SOD2 (Slika 37.B). Vrpca SOD1 bila je podjednakog intenziteta u kontroli i svim tretmanima, osim kombiniranog tretmana AgNO₃ s cisteinom gdje je došlo do povećane ekspresije SOD1 u odnosu na kontrolu. U odnosu na kontrolu, intenzitet vrpce SOD2 bio je nešto slabiji nakon tretmana s AgNP-PVP i njegove kombinacije s cisteinom, te nakon kombiniranog tretmana AgNO₃ s cisteinom.

Enzim CAT detektiran je kao jedna izoforma na oko 60 kDa (Slika 37.C). Ekspresija ove vrpce bila je povećana u svim tretmanima u odnosu na kontrolu, a najjači intenzitet zabilježen je nakon kombiniranog tretmana AgNO₃ i cisteina.

Detektirane su dvije izoforme enzima APX, od oko 38 kDa (APX1) i 30 kDa (APX2), koje su pokazale različite promjene u ekspresiji (Slika 37.D). Izoforma APX1 imala je povećanu ekspresiju u odnosu na kontrolu u kombiniranim tretmanima AgNP-PVP i AgNO₃ s cisteinom, dok je smanjenje ekspresije vrpce APX2 zabilježeno nakon tretmana s AgNP-PVP i njegove kombinacije s cisteinom te kombiniranog tretmana AgNO₃ s cisteinom.

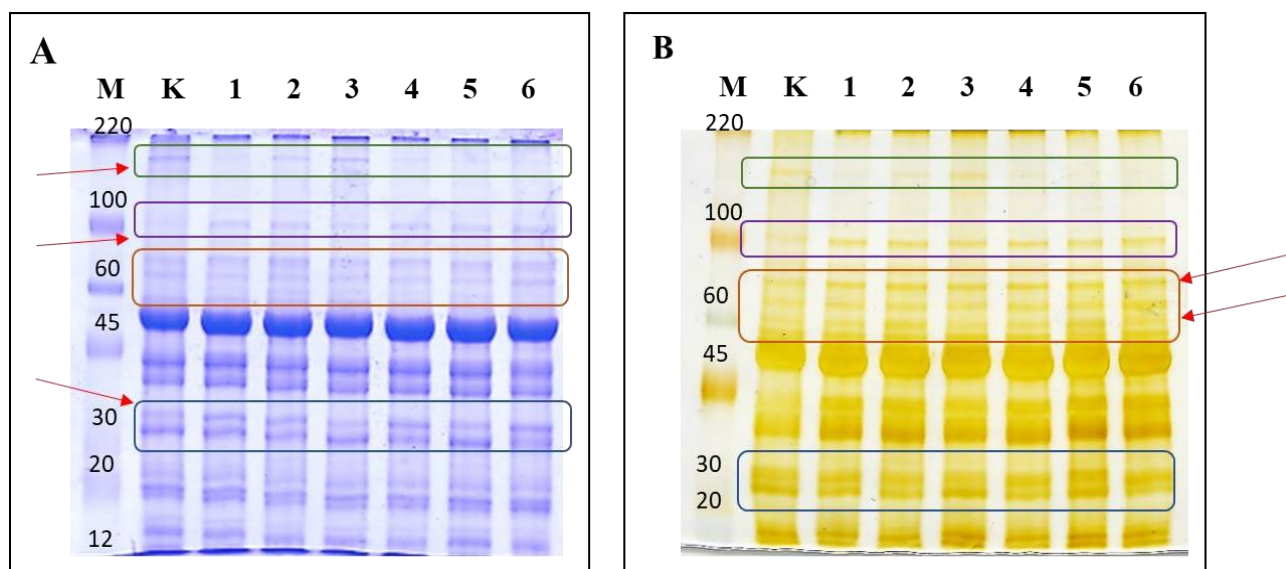
Dvije izoforme enzima HRP detektirane su na oko 60 (HRP1) i 45 kDa (HRP2) (Slika 37.E). Ekspresija izoforme HRP1 nije se promijenila nakon tretmana, dok je vrpca HRP2 u usporedbi s kontrolom pokazala pojačanu ekspresiju nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNP-CTAB, a smanjenu nakon tretmana s AgNO₃ i kombiniranog tretmana AgNP i cisteina. Dodatak cisteina tretmanima s oba tipa AgNP doveo je do smanjenja ekspresije HRP2 u odnosu na kontrolu i odgovarajuće tretmane bez cisteina, dok je dodatak cisteina tretmanu s AgNO₃ rezultirao izjednačavanjem razine ekspresije HRP2 s kontrolnom.



Slika 37. Imunodetekcija proteina A) ACT, B) SOD, C) CAT, D) APX, E) HRP u korijenu nakon tretmana sa 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, te njihovim kombinacijama s 500 μM cisteinom (cys) nakon razdvajanja proteina 12% SDS-PAG elektroforezom, prijenosa na nitroceluloznu membranu te inkubacije sa specifičnim primarnim antitijelima. M – biljezi molekulske mase (kDa), K – kontrola, 1 – 100 μM AgNP-PVP, 2 – 100 μM AgNP-CTAB, 3 – 100 μM AgNO₃, 4 – 100 μM AgNP-PVP + 500 μM cys, 5 – 100 μM AgNP-CTAB + 500 μM cys, 6 – 100 μM AgNO₃ + 500 μM cys.

4.4.5.2. List

Nakon razdvajanja proteina lista metodom SDS-PAG zabilježene su razlike u ekspresiji ukupnih topivih proteina lista (Slike 38.A,B). Zabilježene su četiri skupine proteina čija se ekspresija razlikovala ovisno o tipu tretmana, koje su prema molekulskim masama označene linijama različitih boja (plava – 25-30 kDa, narančasta – 50-80 kDa, ljubičasta – 100 kDa, zelena – 200 kDa). Proteinske vrpce od oko 30 kDa (plava linija) pokazale su promjene u ekspresiji u odnosu na kontrolu ovisno o tipu tretmana: povećanje ekspresije u tretmanima s AgNP, a smanjenje ekspresije u tretmanu s AgNO₃ i kombiniranom tretmanu AgNP-CTAB s cisteinom. Skupina proteina od 60-80 kDa (narančasta linija) te proteinske vrpce od oko 100 kDa (ljubičasta linija) imale su jači intenzitet nakon svih tretmana u odnosu na kontrolu, što je nešto uočljivije na gelu obojanom s AgNO₃. Vrpca od oko 150 kDa (zelena linija) bila je smanjenog intenziteta u svim tretmanima u odnosu na kontrolu, osim tretmana sa 100 μM AgNO₃.



Slika 38. Razlike u ekspresiji ukupnih topivih proteina u listu tretiranom sa 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, te njihovim kombinacijama s 500 μM cisteinom (cys) nakon razdvajanja proteina 12% SDS-PAG elektroforezom i vizualizacije **A)** bojom CBB i **B)** s AgNO₃. M – biljezi molekulskih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 100 μM AgNP-PVP, 2 – 100 μM AgNP-CTAB, 3 – 100 μM AgNO₃, 4 – 100 μM AgNP-PVP + 500 μM cys, 5 – 100 μM AgNP-CTAB + 500 μM cys, 6 – 100 μM AgNO₃ + 500 μM cys. Skupine diferencijalno eksprimiranih proteina označene su različito obojanim linijama: crna – 12 kDa, žuta – 25 kDa, narančasta – 30 kDa, ljubičasta – 40-45 kDa, zelena – 60-75 kDa. Strelice označavaju vrpce kod kojih je zabilježena najveća promjena u ekspresiji u tretmanima u odnosu na kontrolu.

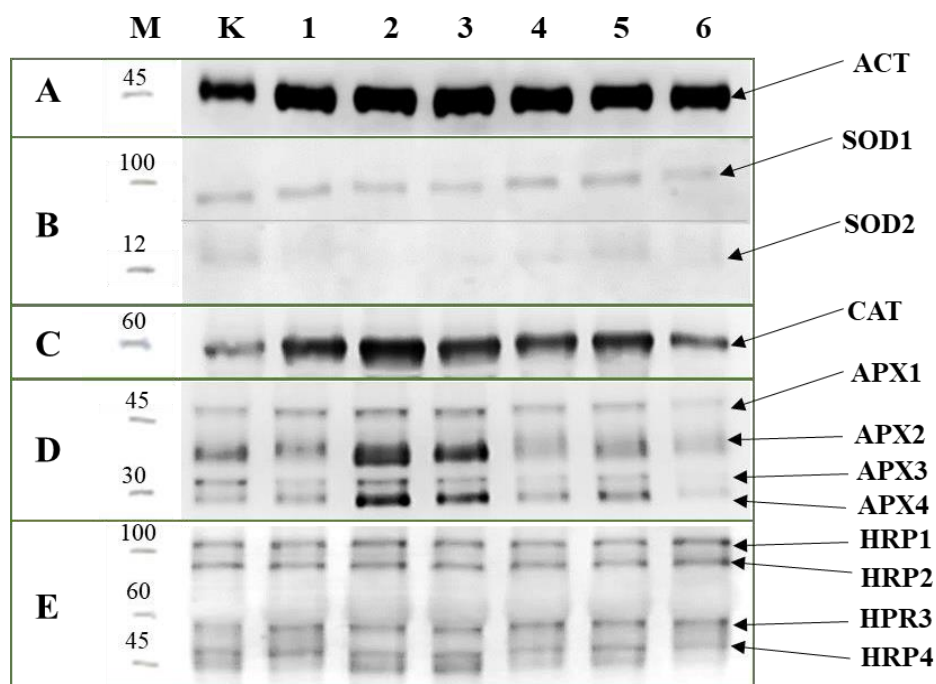
Metodom *Western blotting* analizirana je ekspresija antioksidacijskih enzima u listu duhana nakon tretmana sa 100 μM koncentracijom AgNP-PVP, AgNP-CTAB ili AgNO₃, te njihovih kombinacija sa 500 μM cisteinom. Ekspresija proteina ACT (*loading* kontrola) bila je podjednaka nakon svih ispitanih tretmana te nešto jača u odnosu na kontrolu (Slika 39.A).

Kao i u korijenu, i u listu su detektirane dvije izoforme enzima SOD molekulskih masa od oko 100 i 15 kDa (SOD1 i SOD2) (Slika 39.B). Intenzitet vrpce SOD1 nije se promijenio nakon tretmana, dok je intenzitet izoforme SOD2 bio podjednako smanjen nakon svih tretmana u odnosu na kontrolu.

Detektirana je jedna izoforma enzima CAT, čija je ekspresija bila povećana nakon svih tretmana u odnosu na kontrolu (Slika 39.C). Najveći intenzitet ove vrpce zabilježen je nakon tretmana s AgNP-CTAB, a u pozitivnoj je korelaciji s povećanom aktivnosti CAT izmjerenoj spektrofotometrijski (Slika 25.B). Dodatak cisteina u kombiniranim tretmanima doveo je do smanjenja ekspresije izoforme CAT u odnosu na tretmane bez cisteina, što je bilo najizraženije u tretmanu AgNO₃ s cisteinom, iako je u svim kombiniranim tretmanima ekspresija i dalje bila veća u odnosu na kontrolu.

Detektirane su četiri izoforme enzima APX molekulskih masa između 25 i 45 kDa (označene kao APX1-4, Slika 39.D). Pojačana ekspresija svih izoformi zabilježena je nakon tretmana s AgNP-CTAB i AgNO₃. Dodatak cisteina u tretman s AgNP-CTAB smanjio je ekspresiju svih izoformi na razine slične kontroli, dok je u kombiniranom tretmanu AgNO₃ s cisteinom ekspresija bila smanjena u odnosu na kontrolu.

Četiri izoforme enzima HRP (HRP1-4) molekulskih masa između 45 i 100 kDa detektirane su nakon svih tretmana, a intenzitet svih vrpce bio je podjednak u svim uzorcima (Slika 39.E). Nepromijenjena ekspresija enzima HRP u pozitivnoj je korelaciji s izostankom povećanja aktivnosti enzima PPX izmjerenoj spektrofotometrijski (Slika 25.D).



Slika 39. Razlike u ekspresiji proteina **A)** ACT, **B)** SOD, **C)** CAT, **D)** APX, **E)** HRP u listu nakon tretmana sa 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃, te njihovim kombinacijama s 500 μM cisteinom (cys) nakon razdvajanja proteina 12% SDS-PAG elektroforezom, prijenosa na nitroceluloznu membranu te inkubacije u specifičnim primarnim antitijelima. M – biljezi molekularnih masa (kDa), K – kontrola, 1 – 100 μM AgNP-PVP, 2 – 100 μM AgNP-CTAB, 3 – 100 μM AgNO₃, 4 – 100 μM AgNP-PVP + 500 μM cys, 5 – 100 μM AgNP-CTAB + 500 μM cys, 6 – 100 μM AgNO₃ + 500 μM cys.

4.5. Rani fiziološki odgovor *in situ* i detekcija AgNP u tkivu

4.5.1. Korijen

Za ispitivanje pojave oksidacijskog stresa *in situ*, tkivo korijena tretiranog 24 h sa 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB ili AgNO₃, inkubirala sam u otopinama fluorescentnih proba specifičnih za parametre oksidacijskog stresa i analizirala konfokalnim fluorescencijskim mikroskopom. Upotrebom tehnike optičkog seciranja snimljeni su signali iz 30 – 40 fokalnih ravnina, a rezultati su prikaz preklopljenih signala svih vidljivih ravnina duž z-osi.

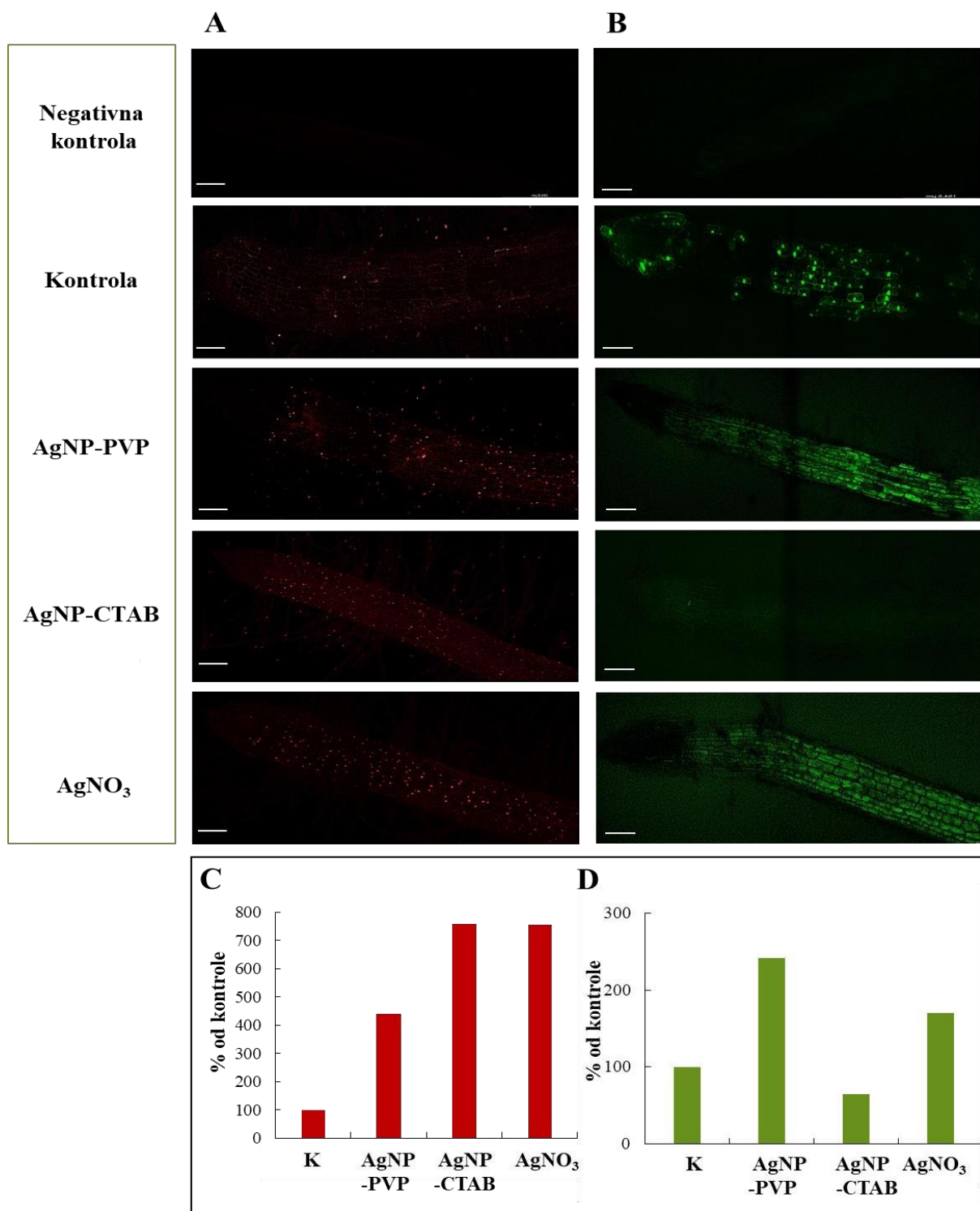
Za detekciju O₂^{•-} u tkivu, koristila sam probu DHE, koja se u interakciji s O₂^{•-} oksidira u fluorescentni produkt EOH i rezultira pojavom crvenih signala (Slika 40.A). Prema intenzitetu signala vidljivo je da su sva tri tipa tretmana izazvala povećanje sadržaja O₂^{•-} u odnosu na kontrolu, što je bilo naročito izraženo nakon tretmana s AgNP-CTAB i AgNO₃ (Slika 40.A).

Slika 40.B prikazuje rezultate analize unutarstaničnog H₂O₂ (zeleno fluorescencija), detektiranog primjenom probe H₂DCF-DA. Intenzitet signala, koji je direktno proporcionalan sadržaju H₂O₂, bio je povećan nakon tretmana s AgNP-PVP, dok je tretman s AgNP-CTAB

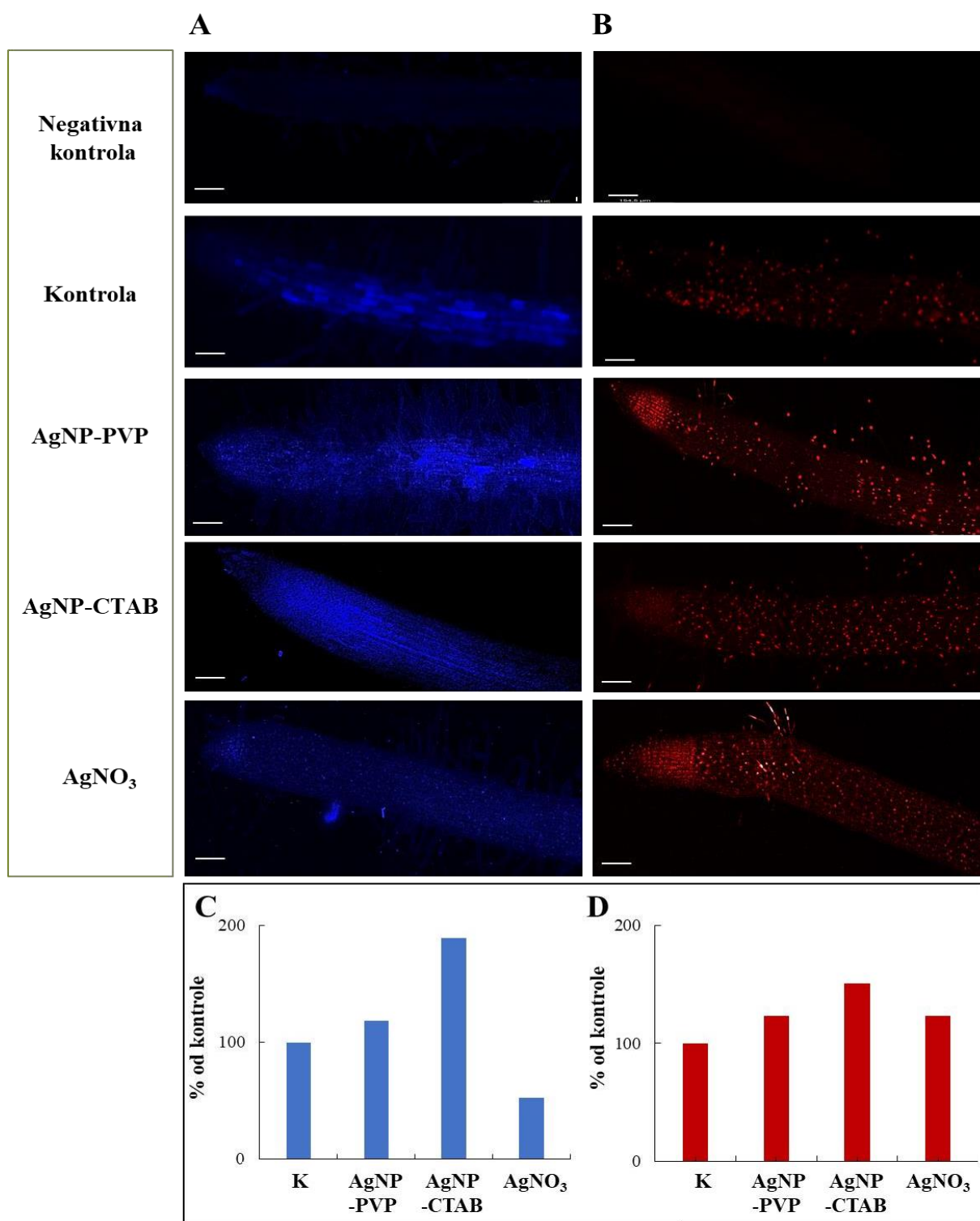
smanjio njegov sadržaj. Tretman s AgNO_3 rezultirao je povećanjem intenziteta signala u odnosu na kontrolu i tretman s AgNP-CTAB, ali je bio smanjen u odnosu na tretman s AgNP-PVP (Slika 40.B).

Za detekciju reduciranog GSH koristila sam probu MCB, koja specifično reagira sa reduciranim GSH, dajući fluorescentni kompleks GSH-MCB (plava fluorescencija; Slika 41.A). Mjerenje intenziteta pokazalo je da su tretmani s AgNP izazvali povećanje sadržaja reduciranog GSH u odnosu na kontrolu, pri čemu je učinak AgNP-CTAB bio jači u odnosu na AgNP-PVP. Zanimljivo je da je tretman s AgNO_3 imao suprotan učinak, smanjivši razinu GSH ispod razine kontrole (Slika 41.A).

Za ispitivanje vijabilnosti stanica koristila sam probu PI koja specifično obilježava jezgre mrtvih stanica (crvena fluorescencija; Slika 41.B). Pojačani signal zabilježen je nakon sva tri tipa tretmana, a pretežno je lokaliziran u području korijenove kape, vršnog meristema i korijenovih dlačica. U kontroli je zabilježen mali broj mrtvih stanica samo u vršku korijena. Mjerenje intenziteta signala pokazalo je da su sva tri tipa tretmana izazvala pojačano umiranje stanica u odnosu na kontrolu, pri čemu je tretman s AgNP-CTAB pokazao najjači učinak (Slika 41.B).

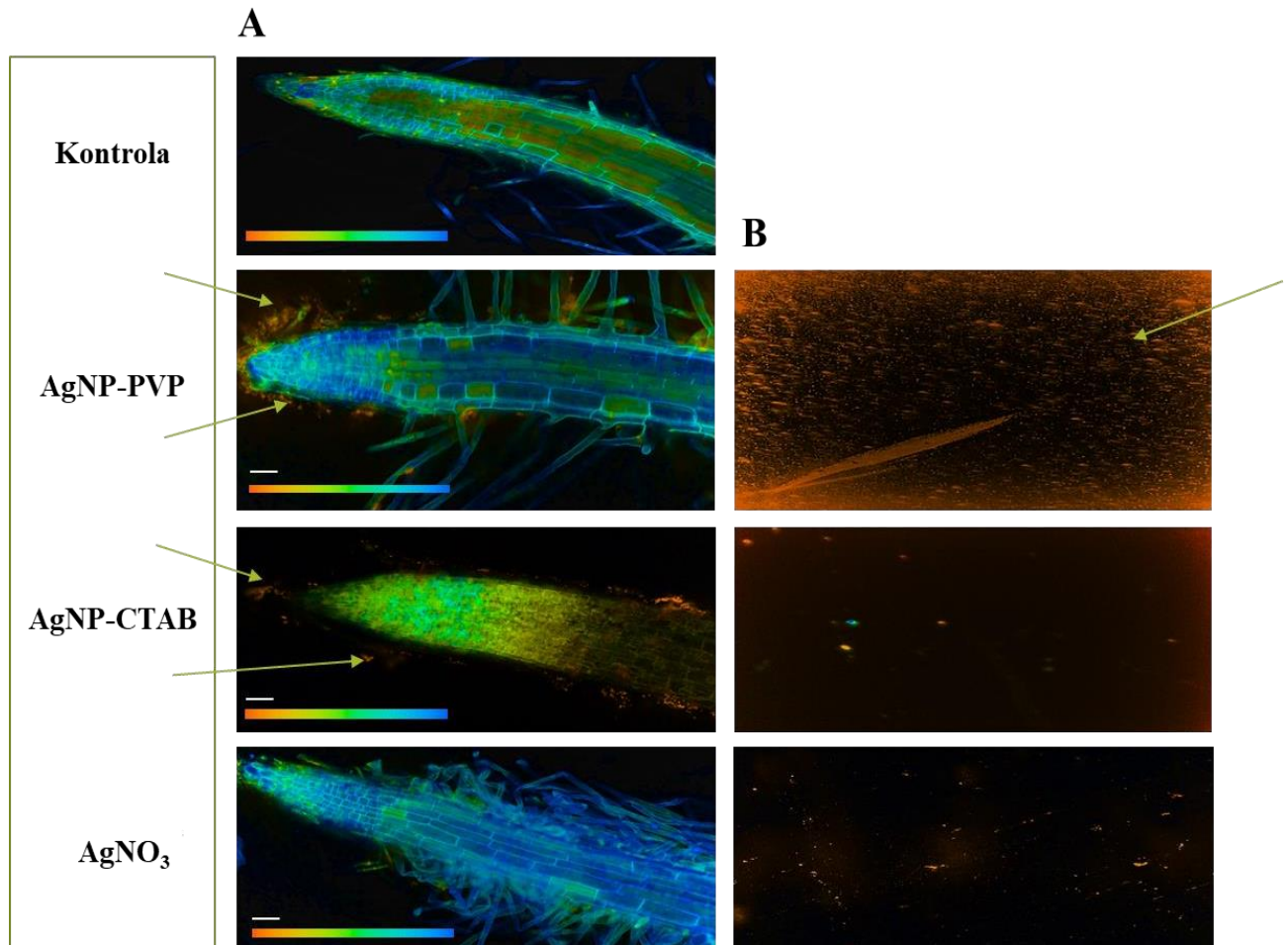


Slika 40. Detekcija unutarstaničnog **A)** $O_2^{\bullet-}$ (primjenom probe DHE) i **B)** H_2O_2 (primjenom probe $H_2DCF-DA$) u tkivu kontrolnog korijena duhana (kontrola) i korijena tretiranih sa $100 \mu M$ AgNP-PVP, AgNP-CTAB i $AgNO_3$ primjenom konfokalnog laserskog pretražnog mikroskopa. Slike prikazuju maksimalnu projekciju dobivenu preklapanjem signala svih vidljivih ravnina duž z-osi (z-korak = 30 nm, povećanje = 20 \times , bar = 100 μm). Negativna kontrola – korijen inkubiran u ultra-čistoj vodi, bez dodatka DHE ili $H_2DCF-DA$. Intenziteti signala fluorescencije probe **C)** DHE i **D)** $H_2DCF-DA$ iskazani kao srednja gustoća piksela izmjerena iz maksimalne projekcije svih vidljivih ravnina duž z-osi i izraženi su kao % od kontrole, gdje kontrola predstavlja 100%. Rezultati su prikaz analize signala iz jedne biološke replike.



Slika 41. Detekcija **A)** reduciranog GSH (primjenom probe MCB) i **B)** mrtvih stanica (primjenom probe PI) u tkivu kontrolnog korijena duhana (kontrola) i korijena tretiranih sa 100 μ M AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ primjenom konfokalnog laserskog pretražnog mikroskopa. Slike prikazuju maksimalnu projekciju dobivenu preklapanjem signala svih vidljivih ravnina duž z-osi (z-korak = 30 nm, povećanje = 20 \times , bar = 100 μ m). Negativna kontrola – korijen inkubiran u ultra-čistoj vodi, bez dodatka MCB ili PI. Intenziteti signala fluorescencije probe **C)** MCB i **D)** PI, iskazani kao srednja gustoća piksela izmjerena iz maksimalne projekcije svih vidljivih ravnina duž z-osi i izraženi su kao % od kontrole, gdje kontrola predstavlja 100%. Rezultati su prikaz analize signala iz jedne biološke replike.

Fluorescencijskom konfokalnom mikroskopijom, primjenom modula FLIM, nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNP-CTAB, čestice AgNP su pretežno detektirane na površini korijena, a vrijeme života fluorescencije im je procijenjeno na oko 50-100 ps (Slika 42.A). FLIM snimanjem matičnih suspenzija AgNP potvrđeno je da signal dobiven u korijenu doista potječe od AgNP (Slika 42.B).



4.5.2. List

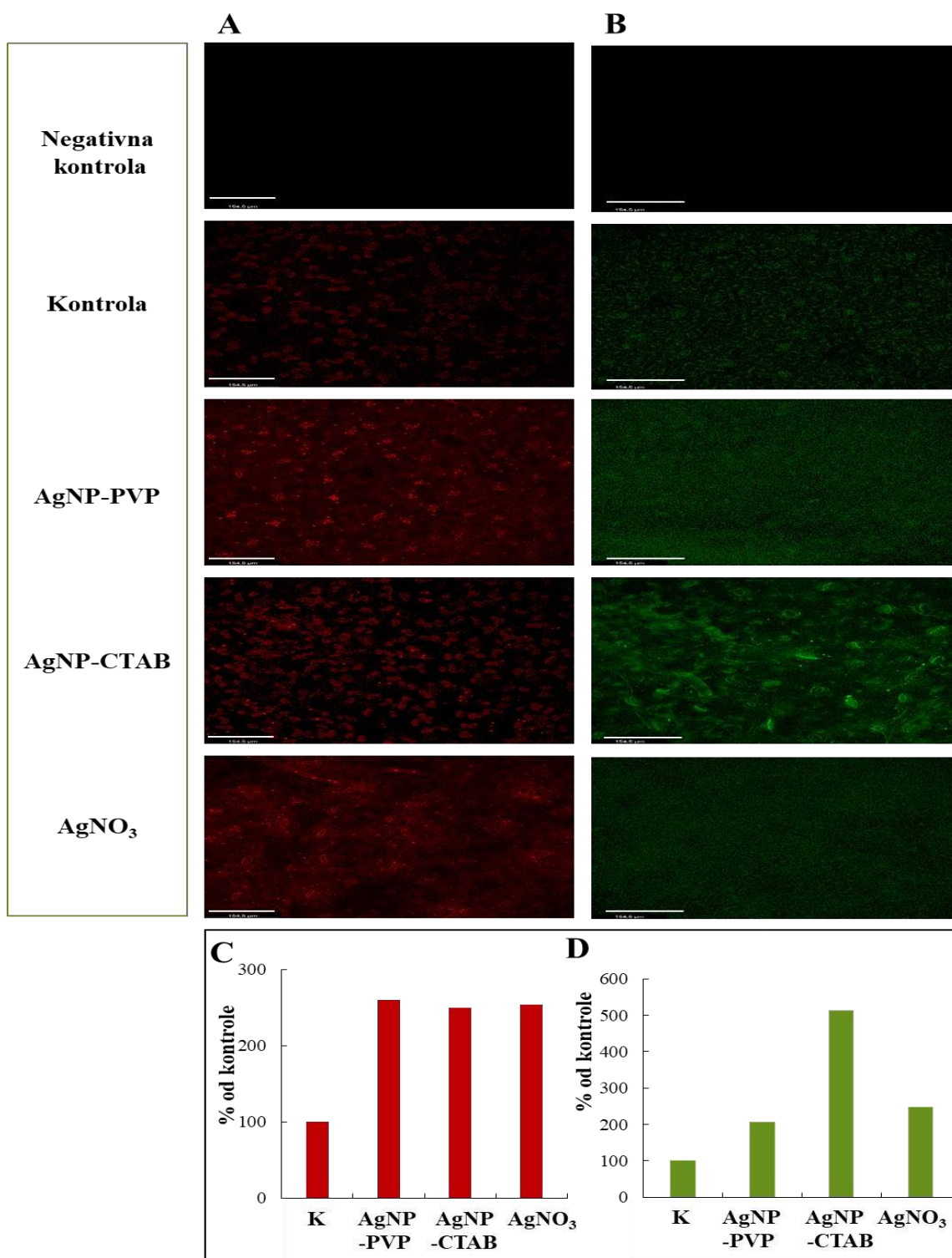
Nakon tretmana lisnih diskova sa 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB ili AgNO₃ 24 h, tkivo je inkubirano u otopinama fluorescentnih proba navedenim u prethodnom poglavlju, a signali su snimani konfokalnim fluorescencijskim mikroskopom kroz sve vidljive ravnine duž z-osi.

Signali crvene fluorescencije u tkivu lista prikazani na Slici 43.A potječu od produkta EOH nastalog u interakciji O₂^{•-} s probom DHE. Mjerenjem intenziteta signala zabilježeno je da su sva tri tipa tretmana dovela do podjednakog povećanja razine O₂^{•-} u odnosu na kontrolu (Slika 43.A).

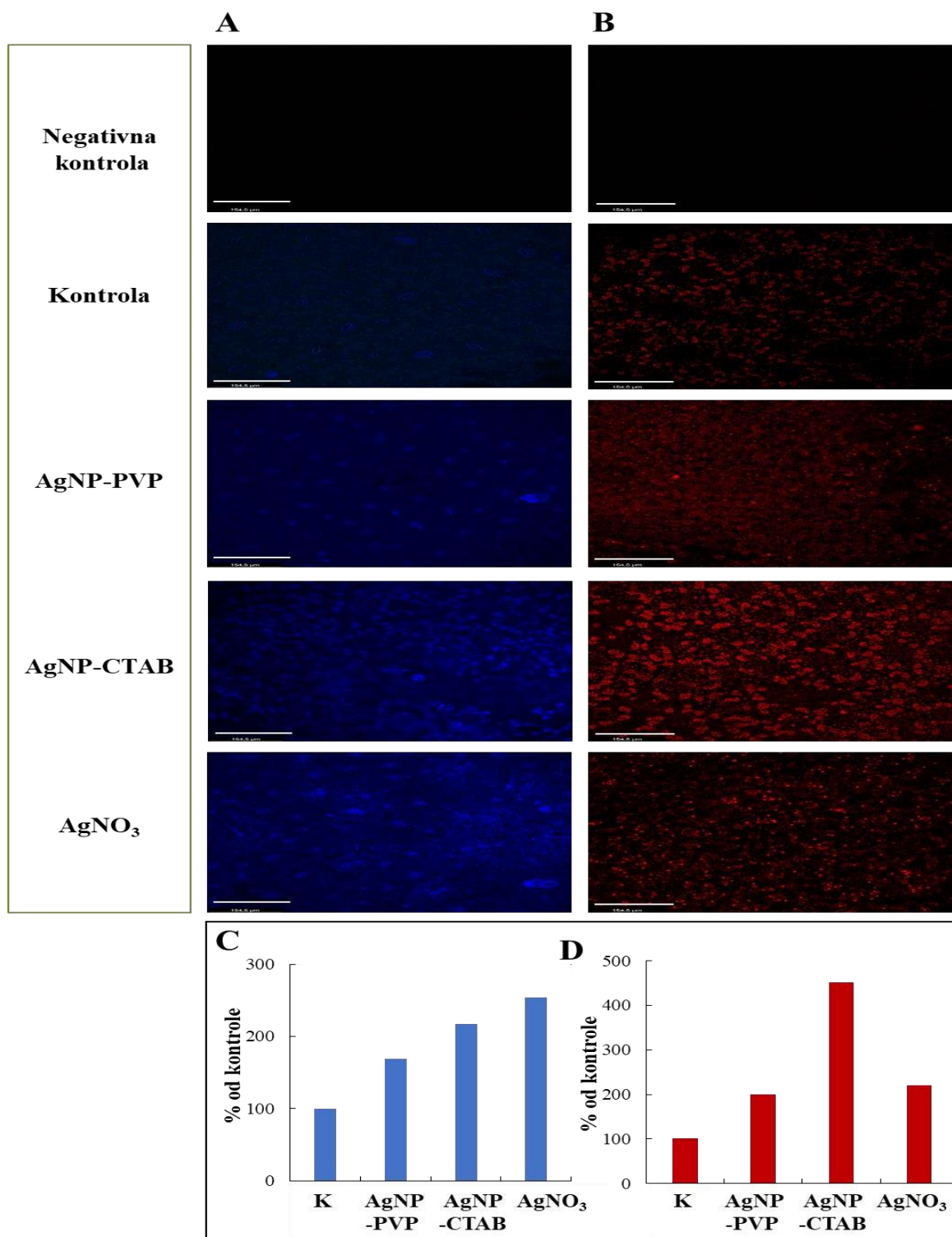
Na temelju izmjerenog intenziteta signala nastalog nakon inkubacije u otopini probe H₂DCF-DA (Slika 43.B), vidljivo je da se razina H₂O₂ povećala nakon svih tretmana u odnosu na kontrolu (Slika 43.B), pri čemu je učinak bio najizraženiji nakon tretmana s AgNP-CTAB.

Nakon inkubacije lisnog diska u otopini probe MCB (Slika 44.A), prema intenzitetu signala vidljivo je da su svi tretmani izazvali povećanje razine reduciranog GSH u odnosu na kontrolu, pri čemu je najznačajnije povećanje zabilježeno nakon tretmana s AgNO₃ (Slika 44.A).

Na slici 44.B prikazani su lisni diskovi inkubirani u otopini probe PI, a prema intenzitetu fluorescencije vidljivo je da su svi tretmani izazvali veću smrt stanica u usporedbi s kontrolom, pri čemu je najjači učinak imao tretman s AgNP-CTAB (Slika 44.B).



Slika 43 Detekcija unutarstaničnog **A)** O₂^{•-} (primjenom probe DHE) i **B)** H₂O₂ (primjenom probe H₂DCF-DA) u kontrolnom listu duhana (kontrola) i listovima tretiranim sa 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ primjenom konfokalnog laserskog pretražnog mikroskopa. Slike prikazuju maksimalnu projekciju dobivenu preklapanjem signala svih vidljivih ravnina duž z-osi (z-korak = 30 nm, povećanje = 20×, bar = 100 μm). Negativna kontrola – list inkubiran u ultra-čistoj vodi, bez dodatka DHE i H₂DCF-DA. Intenziteti signala fluorescencije probe **C)** DHE i **D)** H₂DCF-DA iskazani kao srednja gustoća piksela izmjerena iz maksimalne projekcije svih vidljivih ravnina duž z-osi i izraženi su kao % od kontrole, gdje kontrola predstavlja 100%. Rezultati su prikaz analize signala iz jedne biološke replike.



Slika 44. Detekcija **A**) reduciranog GSH (primjenom probe MCB) i **B**) mrtvih stanica (primjenom probe PI) u kontrolnom listu duhana (kontrola) i listovima tretiranim sa 100 µM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ primjenom konfokalnog laserskog pretražnog mikroskopa. Slike prikazuju maksimalnu projekciju dobivenu preklapanjem signala svih vidljivih ravnina duž z-osi (z-korak = 30 nm, povećanje = 20×, bar = 100 µm). Negativna kontrola – list inkubiran samo u ultra-čistoj vodi, bez dodatka MCB ili PI. Intenziteti signala fluorescencije probe **C**) MCB i **D**) PI iskazani su kao srednja gustoća piksela izmjerena iz maksimalne projekcije svih vidljivih ravnina duž z-osi i izraženi su kao % od kontrole, gdje kontrola predstavlja 100%. Rezultati su prikaz analize signala iz jedne biološke replike.

4.6. Utjecaj AgNP na proces fotosinteze

4.6.1. Fluorescencija klorofila *a*

Kako bih ispitala utjecaj tretmana s AgNP ili AgNO₃ na fotosintetsku učinkovitost, izmjerila sam fluorescenciju klorofila *a* metodom saturacijskog pulsa, a rezultati su prikazani u Tablici 6. Parametar F_v/F_m, koji opisuje maksimalni kvantni prinos PSII, nije pokazao značajne razlike između kontrole i tretmana, niti pri jednoj ispitanoj koncentraciji. Značajne razlike nisu zabilježene niti između različitih koncentracija istog tretmana u većini parametara, uz nekoliko iznimaka. Vrijednost F_v/F_m bila je niža nakon tretmana s 25 μM AgNP-PVP u usporedbi s 50 i 100 μM koncentracijama, dok je tretman s 50 μM AgNP-CTAB rezultirao nižim vrijednostima u odnosu na najveću 100 μM koncentraciju. Jedina razlika nakon izlaganja česticama AgNP s različitim omotačem zabilježena je za 50 μM koncentraciju, gdje je vrijednost F_v/F_m bila manja nakon tretmana s AgNP-CTAB u odnosu na AgNP-PVP.

Smanjenje kvantnog prinosa PSII (Φ_{PSII}) izazvali su tretmani s AgNP-CTAB, statistički značajno pri 25 i 100 μM koncentraciji. Sukladno tome, vrijednosti Φ_{PSII} izmjerene nakon tretmana s AgNP-CTAB bile su značajno različite u odnosu na odgovarajuće koncentracije AgNP-PVP i AgNO₃. Dodatak cisteina tretmanima s AgNP-CTAB potpuno je umanjio negativni učinak i rezultirao vrijednostima sličnim kontroli. Između različitih koncentracija istog tipa tretmana nisu zabilježene značajne razlike u vrijednostima Φ_{PSII} .

Koeficijent fotokemijskog gašenja (qP), koji je indikator pokretanja fotokemijskih reakcija, nije pokazao značajnu promjenu nakon tretmana s AgNP-PVP u odnosu na kontrolu. Tretman s AgNP-CTAB značajno je smanjio vrijednosti qP u odnosu na kontrolu i druga dva tipa tretmana, što je posebice bilo izraženo za 25 i 100 μM koncentraciju. Negativni učinak AgNP-CTAB značajno je ublažen dodatkom cisteina kod sve tri koncentracije kombiniranog tretmana. Tretman s AgNO₃ doveo je do povećanja vrijednosti qP u odnosu na kontrolu, ali ne statistički značajno.

Sve ispitane koncentracije AgNP-CTAB smanjile su vrijednosti nefotokemijskog gašenja (NPQ), indikatora gubitka energije iz PSII u obliku topline, u odnosu na kontrolu i druga dva tipa tretmana, dok je AgNP-PVP uzrokovao smanjenje samo pri najvećoj primijenjenoj koncentraciji. Tretmani s AgNO₃ nisu značajno utjecali na vrijednosti NPQ u odnosu na kontrolu ni pri jednoj ispitanoj koncentraciji. Svi kombinirani tretmani s cisteinom izazvali su značajno povećanje vrijednosti NPQ u odnosu na odgovarajuće koncentracije tretmana bez cisteina.

Tablica 6. Parametri fluorescencije klorofila *a* izmjereni u listu nakon tretmana s 25, 50 i 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB ili AgNO₃ i njihovih kombinacija sa 125, 250 i 500 μM cisteinom izraženi kao % od kontrole i prikazani kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška iz tri nezavisna pokusa, svaki sa po tri replike. F_v/F_m – maksimalni kvantni prinos PSII, $\Phi PSII$ – efektivni prinos PSII, qP – fotokemijsko gašenje, NPQ – nefotokemijsko gašenje. Stupci označeni različitim slovima označavaju značajne razlike ($p \leq 0,05$, jednosmjerna ANOVA i post-hoc LSD test) između različitih koncentracija istog tretmana (mala slova) ili istih koncentracija različitih tretmana (velika slova). Zvezdica (*) označava značajnu razliku između tretmana i kontrole dok ljestve (#) označavaju značajnu razliku između tretmana sa i bez cisteina pri jednakoj koncentraciji tretmana.

Tretman	Konc. (μM)	F_v/F_m	$\Phi PSII$	qP	NPQ
Kontrola	0	100 \pm 0,43	100 \pm 10,85	100 \pm 9,57	100 \pm 9,23
AgNP-PVP	25	99,62 \pm 0,36 ^b	93,51 \pm 10,99 ^{AB}	92,32 \pm 9,56 ^A	94,20 \pm 7,13 ^{a,B}
	50	100,62 \pm 0,20 ^{a,A}	101,45 \pm 5,75 ^{AB}	98,62 \pm 4,85 ^{AB}	96,48 \pm 4,46 ^{a,A}
	100	100,65 \pm 0,24 ^a	108,70 \pm 8,51 ^A	99,16 \pm 6,91 ^A	76,68 \pm 5,1 ^{*,b,BC}
AgNP-PVP + cys	25 + 125	98,98 \pm 0,61	103,73 \pm 8,95	110,19 \pm 8,26	120,06 \pm 4,83 [#]
	50 + 250	99,70 \pm 0,65	100,75 \pm 7,41	108,65 \pm 6,13	115,58 \pm 8,31 [#]
	100 + 500	99,76 \pm 0,52	102,90 \pm 8,54	101,83 \pm 7,64	94,81 \pm 6,34 [#]
AgNP-CTAB	25	100,46 \pm 0,22 ^{ab}	60,71 \pm 7,65 ^{*,C}	65,02 \pm 7,79 ^{*,ab,B}	63,39 \pm 7,88 ^{*,C}
	50	99,43 \pm 0,41 ^{b,B}	78,57 \pm 12,04 ^B	82,95 \pm 10,49 ^{a,B}	69,12 \pm 8,06 ^{*,B}
	100	100,8 \pm 0,32 ^A	57,29 \pm 8,40 ^{*,B}	56,25 \pm 8,42 ^{*,b,B}	59,54 \pm 6,33 ^{*,C}
AgNP-CTAB + cys	25 + 125	100,01 \pm 0,3	103,79 \pm 4,84 [#]	96,82 \pm 3,67 [#]	85,81 \pm 5,02 [#]
	50 + 250	100,29 \pm 0,16	97,94 \pm 3,65 [#]	92,18 \pm 3,37	88,13 \pm 3,80 [#]
	100 + 500	100,37 \pm 1,07	108,12 \pm 4,60 [#]	98,24 \pm 3,62 [#]	66,60 \pm 4,35
AgNO₃	25	99,65 \pm 0,45	114,94 \pm 12,7 ^A	115,69 \pm 10,12 ^A	100,97 \pm 8,99 ^B
	50	100,00 \pm 0,35 ^{AB}	133,33 \pm 16,55 ^A	122,87 \pm 13,99 ^A	94,19 \pm 11,47 ^A
	100	100,17 \pm 0,17	128,74 \pm 8,95 ^A	113,07 \pm 7,58 ^A	88,71 \pm 5,82 ^{AB}
AgNO₃ + cys	25 + 125	100,84 \pm 0,29	123,90 \pm 6,91	70,87 \pm 6,72 [#]	119,11 \pm 6,21 [#]
	50 + 250	100,88 \pm 0,51	111,64 \pm 7,43	121,26 \pm 7,01	125,02 \pm 6,28 [#]
	100 + 500	100,80 \pm 0,21	125,07 \pm 7,28	111,67 \pm 5,58	125,08 \pm 5,29 [#]

4.6.2. Sadržaj fotosintetskih pigmenata

Metodom HPLC izmjereni su sadržaji fotosintetskih pigmenata u listu duhana nakon tretmana s AgNP ili AgNO₃ (Tablica 7.). Rezultati preliminarnih istraživanja, koja su provedena sa svim koncentracijama AgNP i AgNO₃ i njihovim kombinacijama s cisteinom, pokazala su da dodatak cisteina nije značajno utjecao na sadržaj fotosintetskih pigmenata u odnosu na odgovarajuće tretmane bez cisteina (Prilog 8.). Stoga sam kod ponavljanja pokusa izostavila kombinirane tretmane s cisteinom, kao što je prikazano u Tablici 7. Tretmani s AgNP pokazali su jači učinak na sadržaj ukupnih klorofila u odnosu na AgNO₃. Naime, značajan pad koncentracije ukupnih klorofila zabilježen je nakon izlaganja 50 i 100 μM AgNP-PVP i AgNP-CTAB u odnosu na kontrolu, dok je isti učinak nakon tretmana s AgNO₃ zabilježen samo pri najvećoj koncentraciji. Međutim, tretman s AgNO₃ izazvao je smanjenje omjera klorofila *a* i *b* pri svim ispitanim koncentracijama, dok tretmani s AgNP nisu pokazali značajne razlike u odnosu na kontrolu ni pri jednoj ispitanoj koncentraciji.

Tretmani s AgNP imali su jači učinak na sadržaj ukupnih karotenoida i pigmenata uključenih u ksantofilski ciklus (violaksantin, zeaksantin i anteraksantin, VZA), u odnosu na tretmane s AgNO₃. Pritom su sadržaji obe skupine pigmenata bili podjednako sniženi nakon tretmana sa svim koncentracijama oba tipa AgNP u odnosu na kontrolu, uz iznimku tretmana sa 100 μM AgNP-CTAB koji je pokazao najjači učinak. Značajno smanjenje koncentracije ukupnih karotenoida i VZA zabilježeno je i nakon izlaganja najvećoj (100 μM) koncentraciji AgNO₃.

Smanjeni omjer karotenoida i klorofila u odnosu na kontrolu, zabilježen je nakon tretmana sa svim koncentracijama AgNP-PVP te 25 μM AgNP-CTAB.

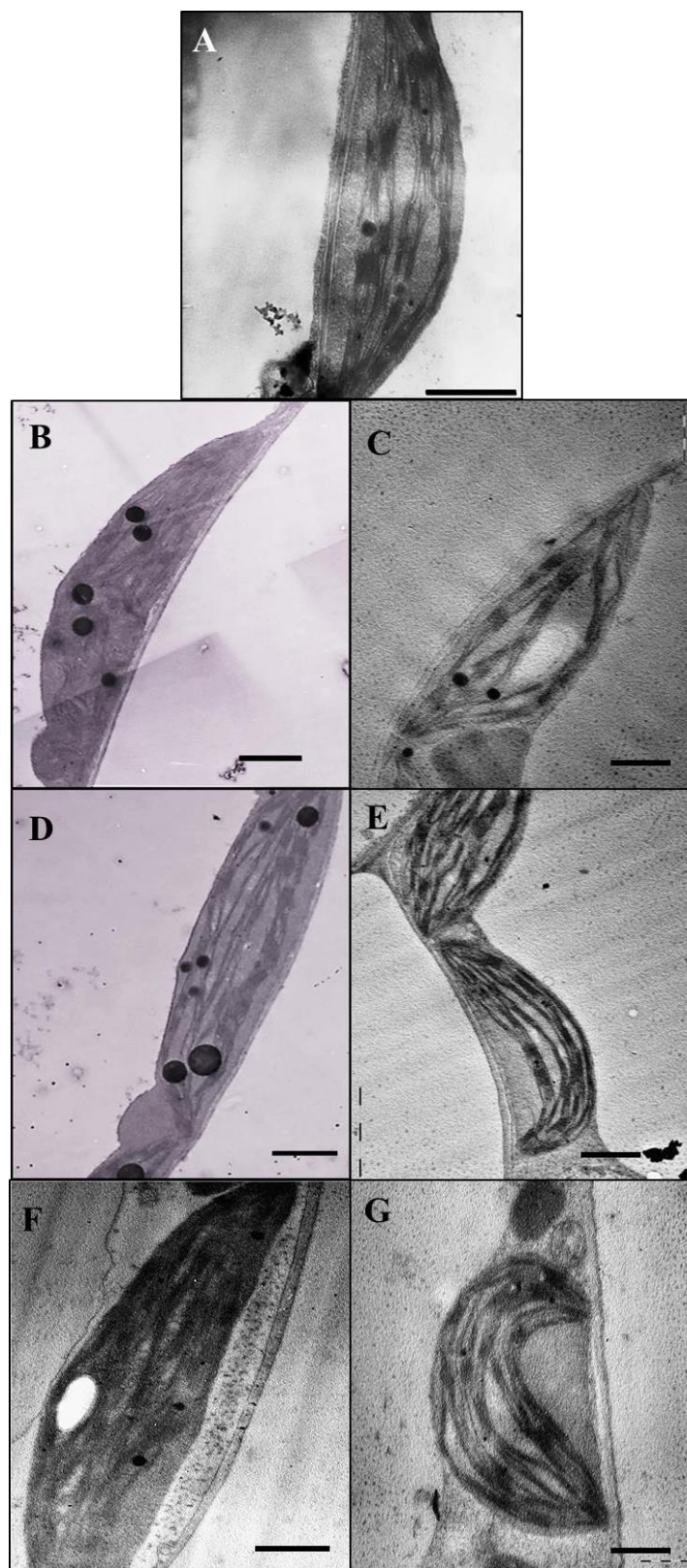
De-epoksidacijsko stanje pigmenata ksantofilskog ciklusa, izračunato prema formuli $(A+Z)/(A+Z+V)$, pokazalo je povećane vrijednosti za sve tretmane s AgNO₃, dok su najveće koncentracije AgNP-PVP i AgNP-CTAB izazvale smanjenje u odnosu na kontrolu i ostale tretmane.

Tablica 7. Sadržaj fotosintetskih pigmenata izmjerenih u listu nakon tretmana s 25, 50 i 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB ili izražen kao % od kontrole i prikazan kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška iz tri nezavisna pokusa, svaki sa po tri replike. Stupci označeni različitim slovima označavaju značajne razlike ($p \leq 0,05$, jednosmjerna ANOVA i post-hoc LSD test) između različitih koncentracija istog tretmana (mala slova) ili istih koncentracija različitih tretmana (velika slova). Zvezdica (*) označava značajnu razliku različitih tipova tretmana pri istim koncentracijama. VZA – violaksantin, zeaksantin, anteraksantin, (A+Z)/(A+Z+V) – de-epoksidacijsko stanje pigmenata ksantofilskog ciklusa.

Tretman	Konc. (μM)	Ukupni klorofili	Ukupni karotenoidi	VZA	Klorofil <i>a/b</i>	Karotenoidi/klorofili	(A+Z)/(A+Z+V)
Kontrola	0	100,00 \pm 3,10	100,00 \pm 5,17	100,00 \pm 3,80	100,00 \pm 2,54	100,00 \pm 2,16	100,00 \pm 4,78
AgNP-PVP	25	95,86 \pm 2,39 ^B	86,89 \pm 5,23 ^{*,B}	87,45 \pm 1,57 ^{*,C}	98,03 \pm 0,70 ^A	90,57 \pm 3,25 ^{*,B}	94,55 \pm 2,25 ^{ab,B}
	50	90,41 \pm 1,43 ^{*,C}	80,74 \pm 3,15 ^{*,B}	88,38 \pm 1,17 [*]	100,96 \pm 0,50 ^A	89,51 \pm 4,60 ^{*,C}	102,77 \pm 2,80 ^{a,B}
	100	91,06 \pm 0,61 ^{*,AB}	82,96 \pm 2,89 ^{*,B}	89,17 \pm 1,90 ^{*,B}	98,56 \pm 0,07 ^B	91,17 \pm 2,89 ^{*,B}	89,34 \pm 1,60 ^{*,b,B}
AgNP-CTAB	25	98,22 \pm 2,62 ^{a, AB}	88,07 \pm 3,60 ^{*,a,B}	92,09 \pm 5,05 ^{a, BC}	99,43 \pm 0,76 ^A	89,58 \pm 1,25 ^{*,a,B}	100,48 \pm 3,47 ^{a,AB}
	50	91,55 \pm 2,97 ^{*,b,C}	93,43 \pm 4,48 ^{a,A}	88,78 \pm 2,57 ^{*,b}	99,25 \pm 0,57 ^A	103,39 \pm 1,77 ^{b,AB}	105,58 \pm 1,62 ^{a,B}
	100	77,82 \pm 3,68 ^{*,c,B}	78,68 \pm 4,38 ^{*,b,B}	78,60 \pm 4,09 ^{*,b,B}	97,85 \pm 2,14 ^{BC}	101,02 \pm 1,27 ^{b,A}	85,04 \pm 0,45 ^{*,b,B}
AgNO₃	25	103,54 \pm 2,01 ^{a,A}	106,76 \pm 6,84 ^{a,A}	109,23 \pm 3,45 ^{a,A}	92,82 \pm 0,64 ^{*,B}	102,94 \pm 4,71 ^A	109,50 \pm 3,15 ^{*,A}
	50	104,77 \pm 1,42 ^{a,A}	101,60 \pm 1,76 ^{a,A}	96,89 \pm 1,39 ^a	90,69 \pm 0,58 ^{*,B}	97,02 \pm 1,92 ^{BC}	116,40 \pm 1,28 ^{*,B}
	100	86,15 \pm 7,58 ^{*,b,B}	85,97 \pm 10,0 ^{*,b,B}	83,37 \pm 7,93 ^{*,b,B}	94,50 \pm 0,35 ^{*,C}	99,27 \pm 3,56 ^A	109,97 \pm 2,15 ^{*,A}

4.6.3. Promjene u ultrastrukтури kloroplasta

Analizom ultratankih prereza lista TEM-om zabilježene su promjene ultrastrukture kloroplasta u svim tretiranim biljkama. Tanji i izduženi kloroplasti s povećanim plastoglobulima zabilježeni su u listovima biljaka tretiranih s oba tipa AgNP (Slike 45.B,D,F) u usporedbi s kontrolom (Slika 45.A) i kombiniranim tretmanima s cisteinom (Slike 45.C,E,G). Kloroplast iz lista biljke tretirane s AgNP-CTAB imao je dobro razvijen tilakoidni sustav (Slika 45.C), dok je u kloroplastu lista nakon izlaganja česticama AgNP-PVP zabilježen poremećaj u strukturi tilakoida, koji su naizgled bili gusto zbijeni (Slika 45.B). Tretman s AgNO₃ uzrokovao je najmanje promjene ultrastrukture kloroplasta, gdje je zapažen dobro razvijen tilakoidni sustav i nešto manji plastoglobuli u usporedbi s tretmanom s AgNP (Slika 45.D).



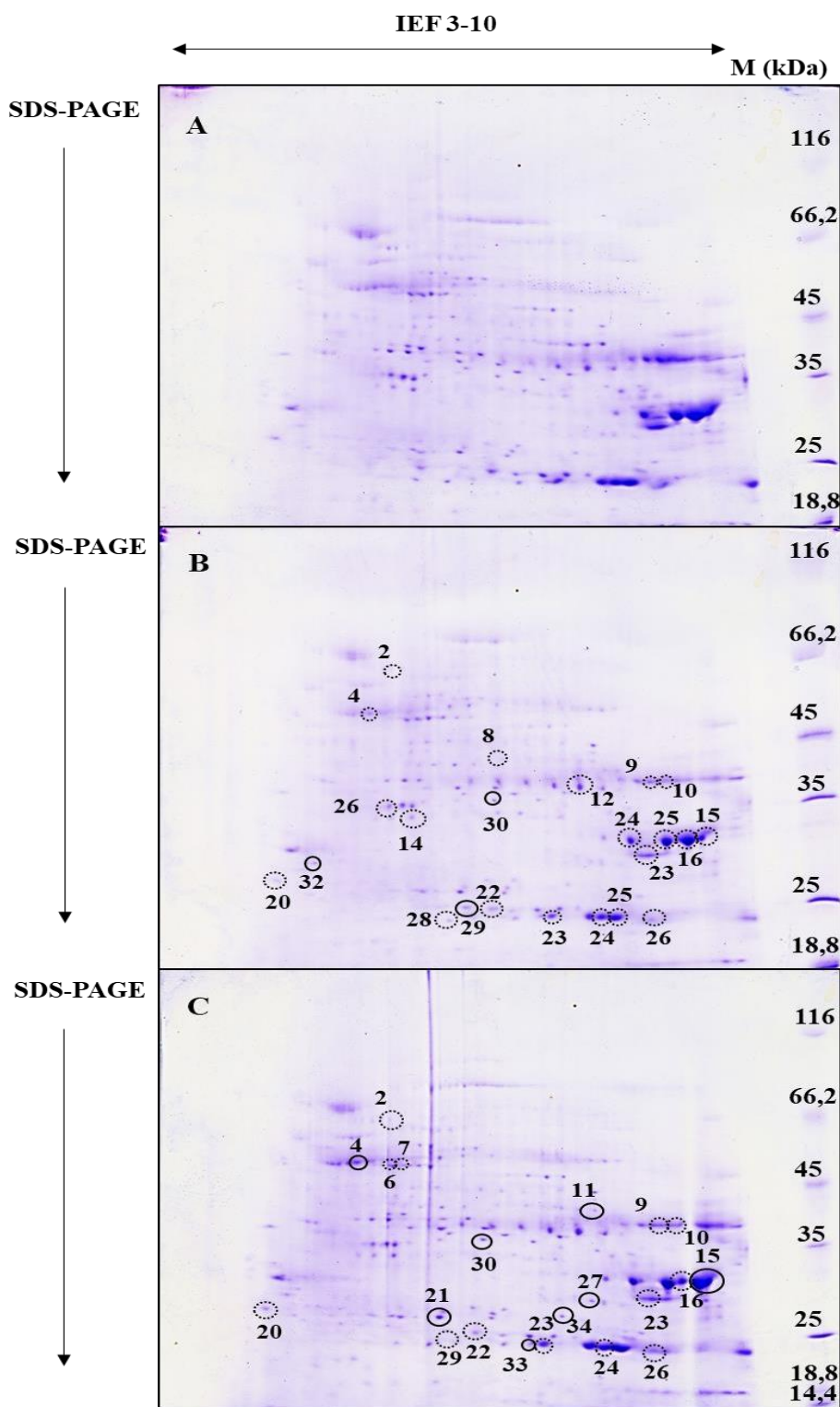
Slika 45. Ultrastruktura kloroplasta iz lista **A)** kontrolnih biljaka duhana te biljaka tretiranih s **B)** 100 μM AgNP-PVP **C)** 100 μM AgNP-PVP + 500 μM cistein **D)** 100 μM AgNP-CTAB, **E)** 100 μM AgNP-CTAB + 500 μM cistein, **F)** 100 μM AgNO₃, **G)** 100 μM AgNO₃ + 500 μM cistein, (bar = 1 μm).

4.7. Utjecaj AgNP na promjene u proteomu

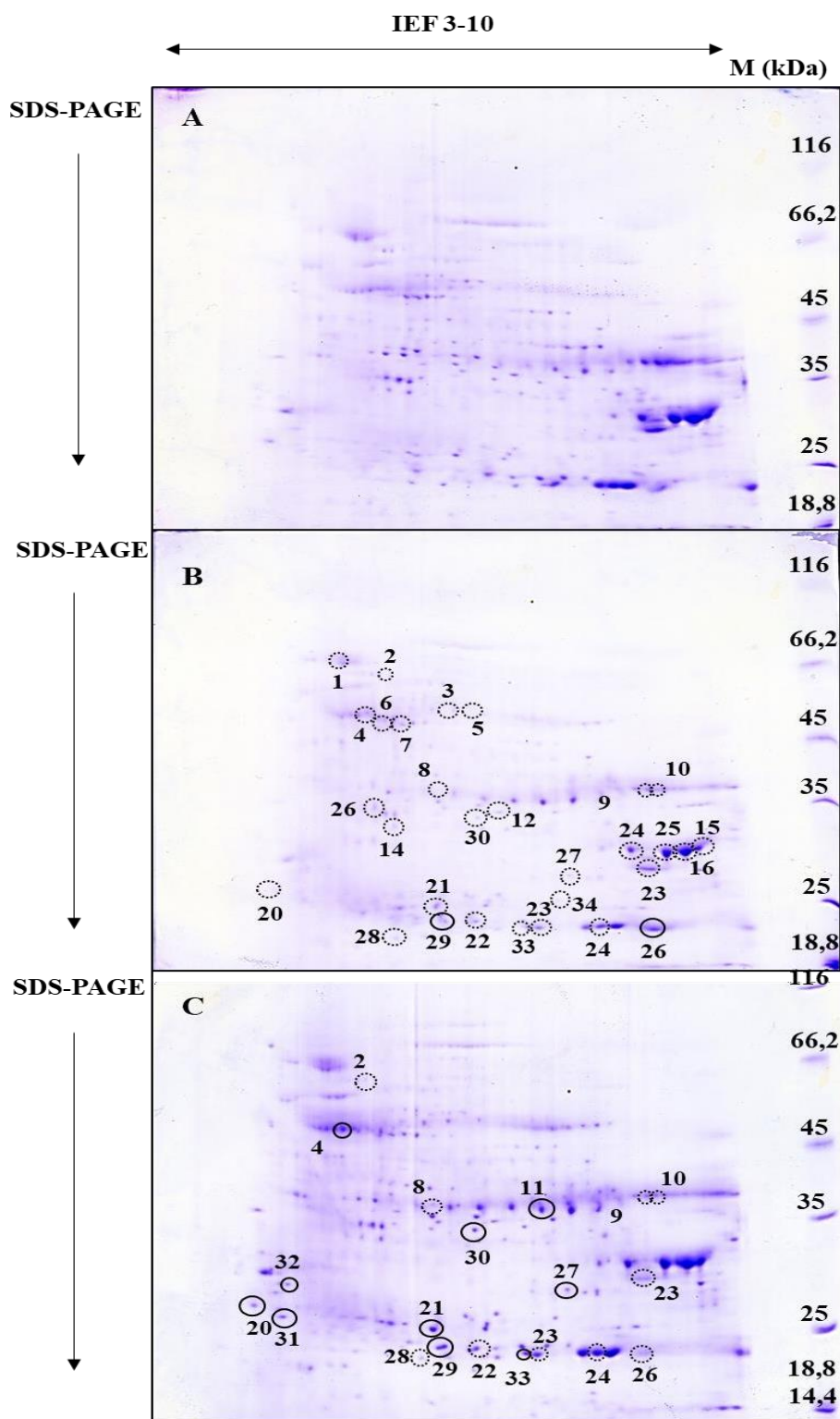
Kako bih ispitala promjene u ekspresiji proteina korijena i lista, nakon tretmana duhana sa 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ te njihovih kombinacija sa 500 μM cisteinom razdvojila sam ukupne topive proteine tehnikom 2D-E. Proteinske mrlje, čiji je intenzitet u tretmanima bio za 1,5 \times veći ili manji u odnosu na kontrolu, analizirala sam spektrometrijom masa te identificirala i kategorizirala primjenom računalnih programa i baza podataka.

4.7.1. Promjene u proteomu korijena

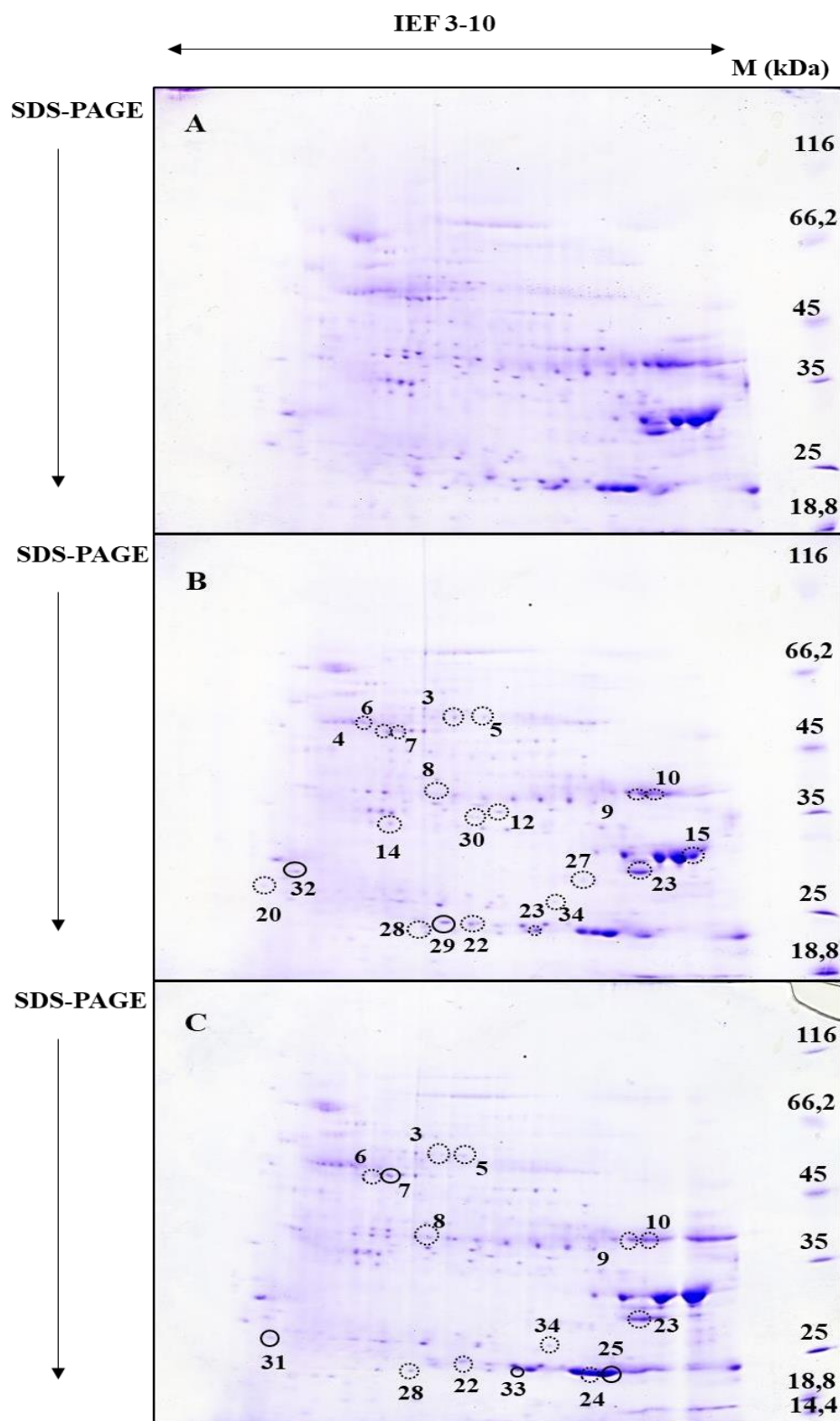
U korijenu je detektirano ukupno 60 proteinskih mrlja čija se ekspresija razlikovala u tretiranim u odnosu na kontrolne biljke, a nakon njihove analize spektrometrijom masa i računalne obrade podataka, identificirani su proteini iz ukupno 34 proteinske mrlje, od kojih je većina pokazala smanjenu ekspresiju u tretmanima u odnosu na kontrolu. Nakon tretmana s AgNP-PVP, pronađena su ukupno 23 diferencijalno eksprimirana proteina od kojih je 20 imalo smanjenu ekspresiju, a samo tri povećanu ekspresiju u odnosu na kontrolu. Dodatkom cisteina tretmanu s AgNP-PVP, ukupan broj proteina različito eksprimiranih u odnosu na kontrolu smanjio se na 21, od kojih je 13 pokazalo smanjenu, a 8 povećanu ekspresiju u odnosu na kontrolu (Slike 46.A,B,C). Najveći broj proteina s promijenjenom ekspresijom u odnosu na kontrolu zabilježen je nakon tretmana s AgNP-CTAB. Od ukupno 30 detektiranih proteina, 28 je imalo smanjenu, a samo dva pojačanu ekspresiju u odnosu na kontrolu. U kombiniranom tretmanu CTAB s cisteinom, broj diferencijalno eksprimiranih proteina smanjio se na 20, od kojih je 10 imalo smanjenu ekspresiju, dok se broj proteina s povećanom ekspresijom povećao s dva na 10 (Slike 47.A,B,C). Nakon tretmana s AgNO₃, u korijenu je detektiran ukupno 21 protein čija se ekspresija razlikovala u odnosu na kontrolu, pri čemu je 19 proteina bilo smanjeno eksprimirano, a dva pojačano u odnosu na kontrolu. Dodatak cisteina u kombiniranom tretmanu doveo je do smanjenja ukupnog broja različito eksprimiranih proteina na 15, od kojih je 11 imalo smanjenu, a četiri povećanu ekspresiju u odnosu na kontrolu (Slike 48.A,B,C).



Slika 46. Ukupni topivi proteini **A)** kontrolnog korijena te korijena nakon tretmana sa **B)** 100 μ M AgNP-PVP ili **C)** 100 μ M AgNP-PVP s 500 μ M cisteinom, razdvojeni 2D elektroforezom. IEF 3-10–gradijent pH u kojem su proteini razdvojeni prema njihovoj izoelektričnoj točki u 1. dimenziji; SDS-PAGE – razdvajanje proteina 12% SDS-PAGE elektroforezom prema njihovoj molekularnoj masi u 2. dimenziji. Proteini čija se ekspresija razlikuje od kontrole za 1,5 \times označeni su brojevima 1-34. Proteini čija je ekspresija povećana u odnosu na kontrolu označeni su punim (○), a oni sa smanjenom ekspresijom isprekidanim kružnicama (⊙). M – biljezi molekularnih masa (kDa).



Slika 47. Ukupni topivi proteini **A)** kontrolnog korijena te korijena nakon tretmana sa **B)** 100 μ M AgNP-CTAB ili **C)** 100 μ M AgNP-CTAB s 500 μ M cisteinom, razdvojeni 2D elektroforezom. IEF 3-10 – gradijent pH u kojem su proteini razdvojeni prema njihovoj izoelektričnoj točki u 1. dimenziji; SDS-PAGE – razdvajanje proteina 12% SDS-PAGE elektroforezom prema njihovoj molekularnoj masi u 2. dimenziji. Proteini čija se ekspresija razlikuje od kontrole za 1,5 \times označeni su brojevima 1-34. Proteini čija je ekspresija povećana u odnosu na kontrolu označeni su punim (\odot), a oni sa smanjenom ekspresijom isprekidanim kružnicama (\circ). M – biljezi molekularnih masa (kDa).



Slika 48. Ukupni topivi proteini **A)** kontrolnog korijena te korijena nakon tretmana sa **B)** 100 μM AgNO_3 ili **C)** 100 μM AgNO_3 s 500 μM cisteinom, razdvojeni 2D elektroforezom. IEF 3-10 – gradijent pH u kojem su proteini razdvojeni prema njihovoj izoelektričnoj točki u 1. dimenziji; SDS-PAGE – razdvajanje proteina 12% SDS-PAGE elektroforezom prema njihovoj molekularnoj masi u 2. dimenziji. Proteini čija se ekspresija razlikuje od kontrole za 1,5 \times označeni su brojevima 1-34. Proteini čija je ekspresija povećana u odnosu na kontrolu označeni su punim (○), a oni sa smanjenom ekspresijom isprekidanim kružnicama (⊙). M – biljezi molekularnih masa (kDa).

4.7.2. Identifikacija i kategorizacija diferencijalno eksprimiranih proteina u korijenu

Od ukupno 34 diferencijalno eksprimirana proteina pronađena u korijenu, samo 13 ih je pokazalo isti odgovor kod sva tri tipa tretmana. Od ukupnog broja, 6 proteina pokazalo je različitu ekspresiju između tretmana s AgNP-PVP i AgNP-CTAB, dok je samo tri pokazalo različitu ekspresiju između tretmana s oba tipa AgNP i tretmana s AgNO₃. Dodatak cisteina izjednačio je razinu ekspresije s onom zabilježenu u kontroli za 7 proteina nakon kombiniranog tretmana AgNP-PVP s cisteinom, 15 proteina nakon kombiniranog tretmana AgNP-CTAB s cisteinom i 10 proteina nakon kombiniranog tretmana AgNO₃ s cisteinom. Zanimljivo je da su neki proteini nakon kombiniranih tretmana s cisteinom pokazali promjene u ekspresiji u odnosu na kontrolu, koje nisu zabilježene nakon odgovarajućih tretmana bez cisteina. Primjerice, jedan protein pokazao je smanjenu, a tri povećanu ekspresiju nakon kombiniranih tretmana AgNP-PVP te AgNO₃ s cisteinom, dok su tri proteina pokazala povećanu ekspresiju nakon kombiniranog tretmana AgNP-CTAB s cisteinom u odnosu na kontrolu i odgovarajuće tretmane bez cisteina (Tablica 8.).

Pretragom baze podataka *UniProt*, detektirane proteine sam kategorizirala s obzirom na biološke procese u kojima sudjeluju, te pronašla podatke o njihovoj izoelektričnoj točki, molekularnoj masi, lokalizaciji i molekularnoj funkciji, a rezultati su prikazani u Tablici 8.

Tablica 8. Lokalizacija, biološka i molekularna funkcija diferencijalno eksprimiranih proteina u korijenu nakon tretmana sa 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ i njihove kombinacije sa 500 μM cisteinom. Za sve tretmane bez (-cys) i s cisteinom (+cys) strelica prema gore (\uparrow) označava pojačanu, strelica prema dolje (\downarrow) smanjenu, a znak jednako (=) podjednaku ekspresiju u usporedbi s kontrolom. pI – izoelektrična točka, M – molekulska masa.

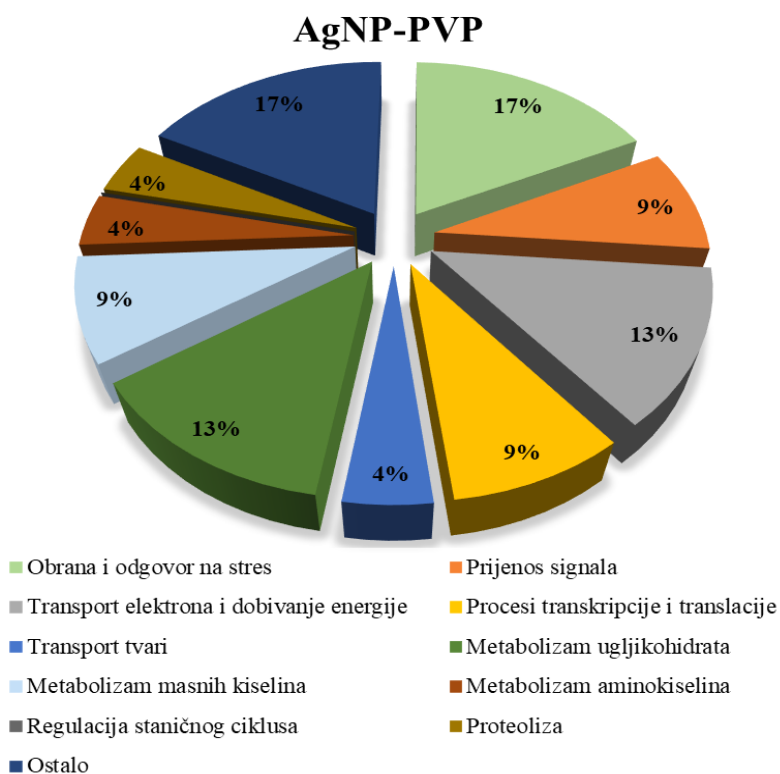
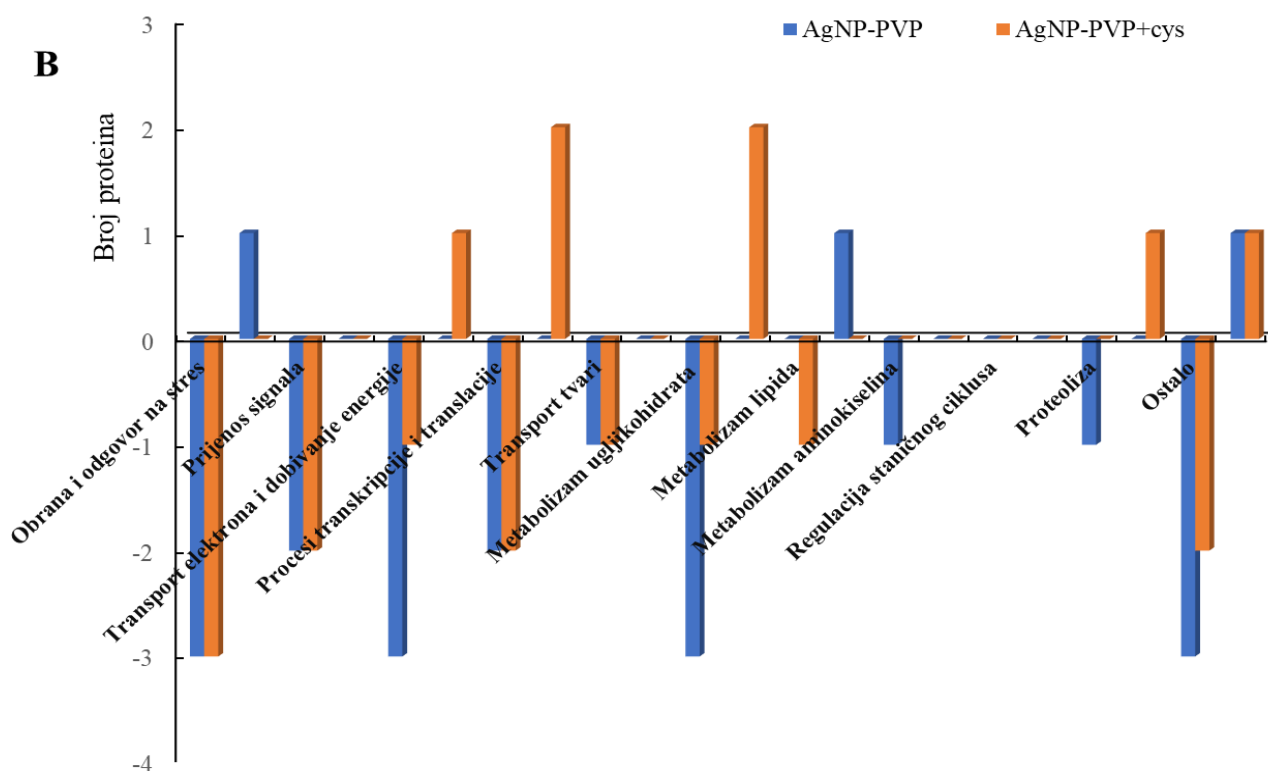
Oznaka proteinske mrlje	Ime proteina	pI	M (kDa)	Lokalizacija	Biološki proces	Molekularna funkcija	Diferencijalna ekspresija		
							AgNP-PVP	AgNP-CTAB (-cys / +cys)	AgNO ₃
<i>Obrana i odgovor na stres</i>									
26	Osmotin	8,13	26,7	Vakuola	Odgovor na stres	Protein koji sudjeluje u patogenezi	\downarrow / \downarrow	\uparrow / \downarrow	$= / =$
24, 25, 33	Protein sličan osmotinu	6,49	27,7	Nesvrstan	Obrana biljke	Protein koji sudjeluje u patogenezi	\downarrow / \downarrow	\downarrow / \downarrow	\downarrow / \downarrow
18	Glukan endo-1,3-beta-glukozidaza izoforma GLB	6,66	40,4	Vakuola	Obrana biljke	Protein koji sudjeluje u patogenezi; Glikozidaza/ hidrolaza	$\downarrow / =$	$\downarrow / =$	$= / \downarrow$
3	Etilen-osjetljivi transkripcijski faktor 3	7,70	24,7	Jezgra	Odgovor na stres	Transkripcijski faktor, vezanje na DNA	$= / =$	\downarrow / \uparrow	\downarrow / \downarrow
29	Glutation S-transferaza PARB	5,54	23,9	Citoplazma	Odgovor na stres, metabolički put glutaciona	Transferaza	\uparrow / \downarrow	$\uparrow / =$	$\uparrow / =$
<i>Prijenos signala</i>									
23	Mitogen-aktivirana protein kinaza homolog NTF4	5,58	45,1	Citoplazma, jezgra	Međustanični prijenos signala	Vezanje ATP-a, protein serin treonin kinazna aktivnost	\downarrow / \downarrow	\downarrow / \downarrow	$\downarrow / =$

9	<i>14-3-3-like protein A</i>	4,69	28,7	Citoplazma	Prijenos signala lokalizacija proteina	/	↓ / ↓	↓ / ↓	↓ / ↓
<i>Transport elektrona i dobivanje energije</i>									
10	Aktivaza ribuloza bisfosfat karboksilaze/oksidaze 2	8,14	48,3	Stroma kloroplasta	Aktivacija RuBisCo-a	Hidroliza ATP-a	↓ / ↓	↓ / ↓	↓ / ↓
4	Ubikinol oksidaza 2	6,67	33,8	Integralna komponenta unutarnje membrane mitohondrija	Stanično disanje, transport elektrona	Alternativna oksidaza, vezanje iona metala	↓ / ↑	↓ / =	↓ / ↓
14	NAD(P)H-kinon oksidoreduktaza podjedinica 1	5,39	40,6	Tilakoidna membrana kloroplasta	Fotosinteza	Translokaza	↓ / =	↓ / =	↓ / =
<i>Procesi transkripcije i translacije</i>									
21	Homeotski protein cvjetanja GLOBOSA	8,94	24,7	Jezgra	Regulacija transkripcije	Vežanje na DNA, transkripcijski faktor specifičan za RNA polimerazu II	↓ / ↑	↓ / ↓	= / =
6	Elongacijski faktor 1- alfa	9,20	49,3	Citoplazma	Translacija-elongacija	GTP-azna aktivnost	= / ↓	↓ / =	↓ / ↓
16	50S ribosomalni protein L27	10,35	19,7	Ribosom, kloroplast	Translacija	Strukturna komponenta ribosoma	↓ / ↑	↓ / =	↓ / =
7	Ribonukleozid-disfosfat reduktaza, mali lanac	4,91	37,61	Citoplazma	Replikacija DNA	Oksidoreduktazna aktivnost	= / ↓	↓ / =	↓ / ↑
27	DNA-usmjerena RNA polimeraza 3A	9,17	111,4	Kloroplast	Transkripcija	Transferaza	= / =	↓ / ↑	↓ / =

Transport tvari									
20	Protein TIC 214/ pretpostavljeni membranski protein Ycf1	9,74	226,1	Unutarnja membrana kloroplasta	Transport proteina	/	↓ / ↓	↓ / ↑	↓ / =
1	<i>Two pore calcium channel protein 1A</i>	5,15	84,9	Membrana	Transport iona, transport kalcija	Ionski kanali, vezanje iona Ca ²⁺	= / =	↓ / =	= / =
Metabolizam ugljikohidrata									
22	Glukan endo-1,3-beta -glukozidaza	5,80	39,3	Izvanstanični prostor	Metabolizam ugljikohidrata, odgovor na stres	Hidrolaza, glikozidaza	↓ / ↓	↓ / ↓	↓ / ↓
15	Izocitrat-dehidrogenaza (NADP)	6,06	46,7	Citoplazma	Krebsov ciklus	Oksidoreduktaza	↓ / ↑	↓ / =	↓ / =
8	Gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza	6,14	35,5	Citoplazma	Glikoliza	Oksidoreduktaza	↓ / =	↓ / =	= / =
31	2,3-bisfosfoglicerat- neovisna fosfoglicerat mutaza	5,98	61,1	Citoplazma	Glikoliza	Izomeraza	= / =	= / ↑	= / ↑
34	Heksokinaza-1	6,17	53,7	Mitochondrij, citosol, vanjska membrana kloroplasta	Glikoliza	Transferaza, kinaza	= / ↑	↓ / =	↓ / ↓
Metabolizam masnih kiselina									
17	Fosfolipaza D alfa 1	5,38	91,9	Stanična membrana	Katabolizam fosfolipida,	Hidrolaza, vezanje iona Ca ²⁺	↓ / ↓	↓ / =	= / =
32	Acetil-koenzim A karboksilaza karboksil transferaza	5,39	56,5	Stroma kloroplasta	Biosinteza masnih kiselina, biosinteza lipida	Transferaza	↑ / =	↑ / =	↑ / =

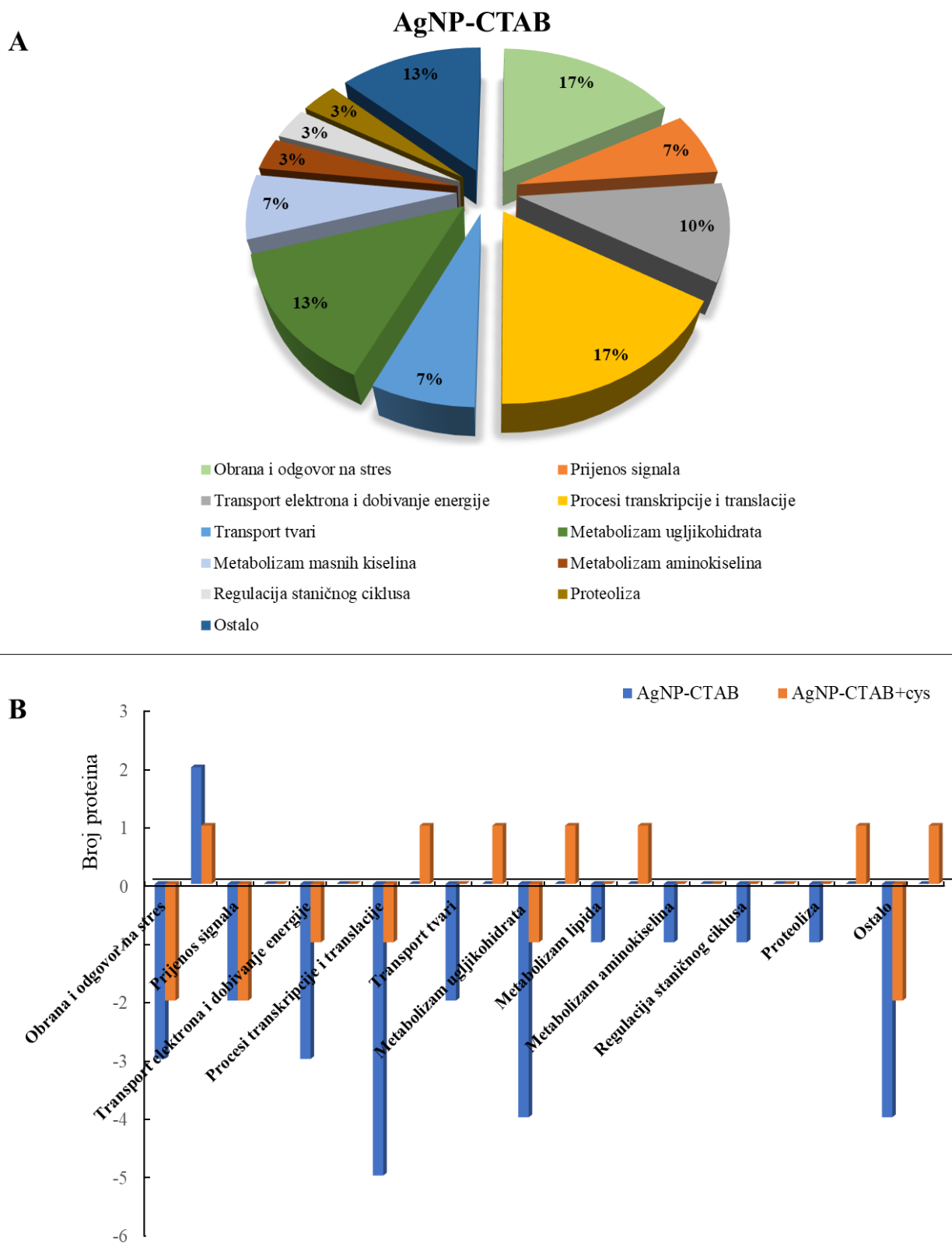
<i>Metabolizam aminokiselina</i>									
28	Fosfo-2-dehidro-3-deoksiheptonat aldolaza 1	8,70	59,9	Kloroplast	Biosinteza aminokiselina	Transferaza	↓ / =	↓ / =	↓ / ↓
<i>Regulacija staničnog ciklusa</i>									
5	ATP-ovisna cink metaloproteaza FTSH	5,76	77,1	Tilakoidna membrana kloroplasta	Stanični ciklus, dioba stanica, proteoliza	Hidrolaza, proteaza	= / =	↓ / =	↓ / ↓
<i>Proteoliza</i>									
13	26S proteasom ne-ATPazna regulatorna podjedinica 3	8,92	55,6	Jezgra	Ubikvitin-ovisna proteolitička razgradnja	Regulacija enzimske aktivnosti	↓ / =	↓ / =	= / =
11	Proteasom beta podjedinica tip-6	5,18	25,2	Citoplazma, jezgra	Proteinaza, proteasomalna razgradnja proteina	Endopeptidaza	= / ↑	= / ↑	= / =
<i>Ostalo</i>									
12	L-askorbat oksidaza homolog	8,99	62,0	Izvanstanični prostor	Isključivanje	Oksidoreduktaza/ vezanje iona Cu ⁺	↓ / =	↓ / =	↓ / =
2	Nitrat reduktaza (NADH) 1	6,48	101,9	Nesvrstan	Asimilacija nitrata	Oksidoreduktaza/ nitrat reduktaza	↓ / ↓	↓ / ↓	= / =
30	Kisik-ovisna koproporfirinogen-III oksidaza	7,64	44,9	Citoplazma, kloroplast	Biosinteza klorofila	Oksidoreduktaza	↑ / ↑	↓ / ↑	↓ / =
19	33 kDa protein stanične stijenke	1,2	4,37	Stanična stijenka	Strukturna	/	↓ / ↑	↓ / ↓	= / =

Nakon tretmana s AgNP-PVP, najviše diferencijalno eksprimiranih proteina (17%) bilo je iz skupine Ostalo te Obrana biljke i odgovor na stres, od kojih su tri proteina uključena u patogenezu pokazala smanjenu ekspresiju, dok je protein uključen u metabolički put GSH bio pojačano eksprimiran (Slika 49.B). Dodatkom cisteina, dva proteina uključena u patogenezu ostala su smanjeno eksprimirana, dok je protein uključen u metabolizam GSH pokazao pojačanu ekspresiju u odnosu na kontrolu (Slike 49.A,B). Po jedan protein uključen u isključavanje i asimilaciju nitrata, te strukturni protein stanične stijenke (skupina Ostalo), pokazao je smanjenu ekspresiju nakon tretmana s AgNP-PVP, a dodatak cisteina povećao je ekspresiju proteina uključenog u isključavanje na razinu sličnu kontroli, a proteina stanične stijenke na razine veće od kontrole. Protein uključen u biosintezu klorofila pokazao je pojačanu ekspresiju nakon tretmana s AgNP-PVP i njegove kombinacije s cisteinom (Slika 49.B). Sljedeći po zastupljenosti bili su proteini uključeni u Metabolizam ugljikohidrata i proteini uključeni u Transport elektrona i dobivanje energije (13%, Slika 49.A). Tri proteina uključena u procese glikolize i Krebsovog ciklusa imala su smanjenu ekspresiju nakon tretmana s AgNP-PVP, dok je nakon dodatka cisteina jedan protein ostao smanjeno eksprimiran, a dva su proteina pokazala povećanu ekspresiju (Slika 49.B). Četiri proteina uključena u Transport elektrona i dobivanje energije bila su smanjeno eksprimirana nakon tretmana s AgNP-PVP, dok je u tretmanu s cisteinom samo jedan pokazao smanjenu ekspresiju, a dva su bila jače eksprimirana u odnosu na kontrolu (Slika 49.B). Nakon tretmana s AgNP-PVP, podjednako zastupljeni (9%) bili su proteini iz skupina Prijenos signala, Procesi transkripcije i translacije te proteini uključeni u Metabolizam masnih kiselina (Slika 49.A). Dva proteina uključena u Prijenos signala imala su smanjenu ekspresiju nakon tretmana s AgNP-PVP i njegove kombinacije s cisteinom (Slika 49.B). Po jedan protein uključen u regulaciju transkripcije i proces translacije bili su smanjeno eksprimirani u tretmanu s AgNP-PVP, ali su oba bila pojačano eksprimirani nakon dodatka cisteina (Slika 49.B). Protein uključen u katabolizam lipida pokazao je smanjenu ekspresiju u tretmanu s AgNP-PVP i njegovoj kombinaciji s cisteinom, dok je protein uključen u biosintezu lipida bio pojačano eksprimiran u tretmanu, ali ne i u kombiniranom tretmanu s cisteinom (Slika 49.B). Najmanje zastupljeni (4%) bili su proteini iz kategorija Transport tvari, Metabolizam aminokiselina te Proteoliza (Slika 49.A). Protein uključen u Transport proteina pokazao je smanjenu ekspresiju nakon tretmana s AgNP-PVP i njegove kombinacije s cisteinom. Protein uključen u biosintezu aminokiselina bio je smanjeno ekprimiran u tretmanu s AgNP, što je poništeno dodatkom cisteina. Protein uključen u Proteolizu nije pokazao promjenu u ekspresiji u tretmanu s AgNP-PVP, ali je pokazao povećanu ekspresiju nakon kombiniranog tretmana AgNP-PVP s cisteinom (Slika 49.B).

A**B**

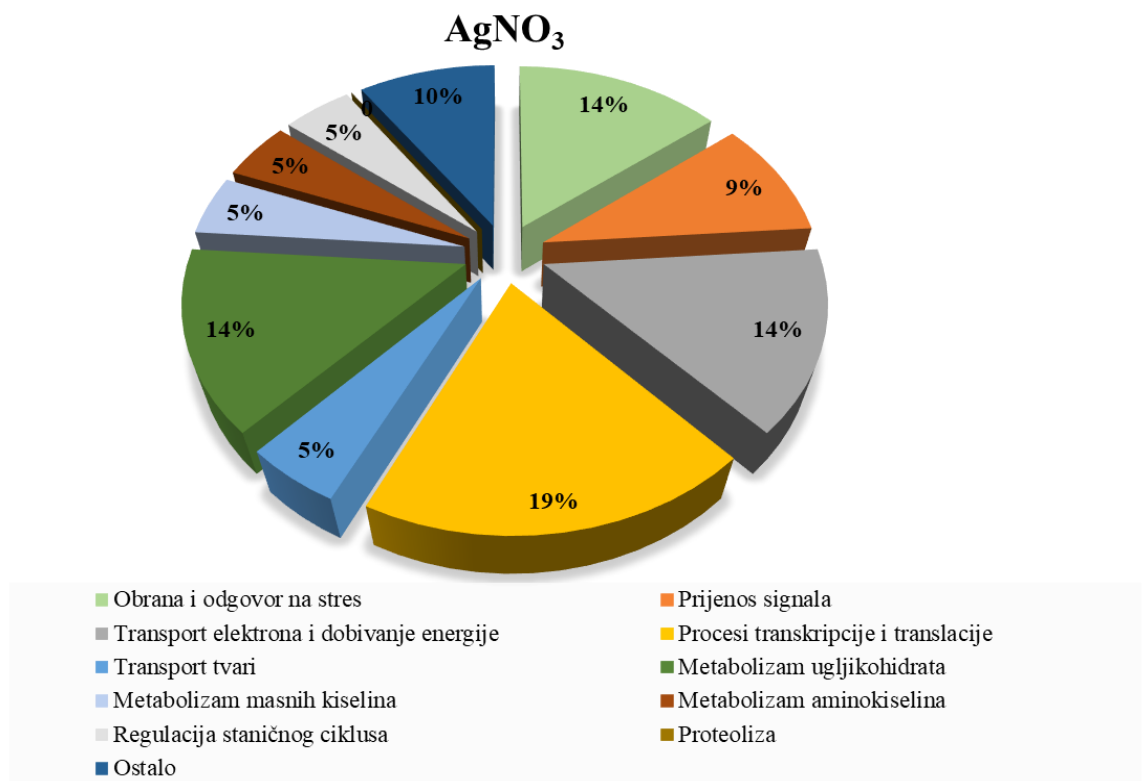
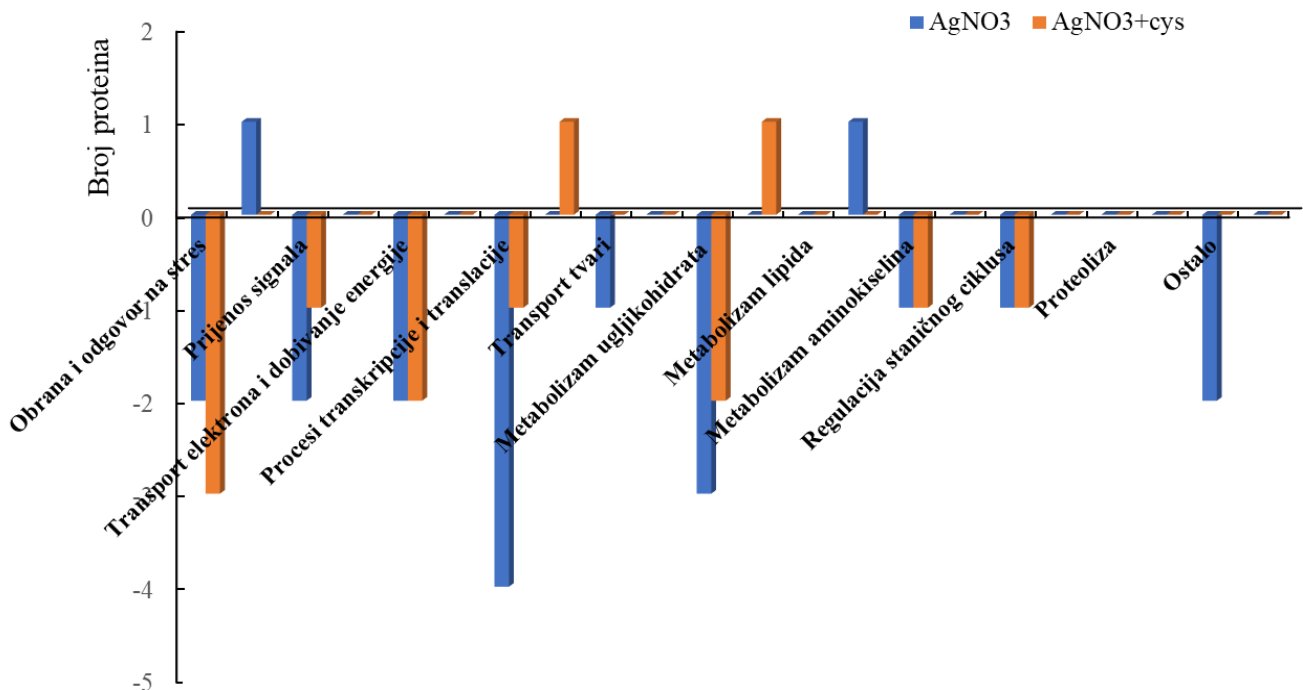
Slika 49. A) zastupljenost funkcionalnih skupina diferencijalno eksprimiranih proteina u korišćenu nakon tretmana sa 100 μM AgNP-PVP u odnosu na kontrolu. **B)** broj proteina iz pojedine funkcionalne skupine čija je ekspresija pojačana (pozitivna os ordinate) ili smanjena (negativna os ordinate) nakon tretmana sa 100 μM AgNP-PVP te njegovom kombinacijom sa 500 μM cisteinom (cys) u odnosu na kontrolu.

Nakon tretmana s AgNP-CTAB, najveći udio diferencijalno eksprimiranih proteina (17%) bio je iz kategorija Obrana i odgovor na stres i Procesi transkripcije i translacije (Slika 50.A). Tri proteina uključena u Obranu biljke i odgovor na stres pokazala su smanjenu, a dva pojačanu ekspresiju u tretmanu u odnosu na kontrolu (Slika 50.B). Dodatak cisteina uzrokovao je smanjenje ekspresije kod dva proteina, te pojačanje ekspresije dva proteina (Slika 50.B). Pet proteina uključenih u procese replikacije DNA, transkripcije i translacije bila su smanjeno eksprimirana nakon tretmana s AgNP-CTAB, dok je dodatak cisteina doveo do izjednačavanja razine ekspresije s kontrolom za tri proteina, ali smanjenja ekspresije jednog i povećanja ekspresije jednog proteina u odnosu na kontrolu (Slika 50.B). Sljedeći po zastupljenosti, sa udjelom od 13% bili su proteini iz kategorije Metabolizam ugljikohidrata, te proteini uključeni u Transport elektrona i dobivanje energije (10%) (Slika 50.A). Četiri proteina iz glikolize i Krebsovog ciklusa pokazala su smanjenu ekspresiju u tretmanu, a dodatak cisteina doveo je do izjednačavanja razine ekspresije s kontrolom za tri proteina, dok je jedan protein pokazao pojačanu ekspresiju u kombiniranom tretmanu AgNP-CTAB s cisteinom (Slika 50.B). Po jedan protein uključen u procese isključivanja, asimilaciju nitrata i biosintezu klorofila, te protein stanične stijenke (skupina Ostalo), pokazali su smanjenu ekspresiju u odnosu na kontrolu, što nije uočeno u kombiniranom tretmanu s cisteinom za jedan protein, dok je protein uključen u biosintezu klorofila pokazao čak povećanu ekspresiju (Slika 50.B). Tri proteina uključena u transport elektrona i dobivanje energije pokazala su smanjenu ekspresiju nakon tretmana s AgNP-CTAB, dok se dodatkom cisteina ekspresija dva proteina izjednačila s onom u kontroli (Slika 50.B). Proteini iz kategorija Prijenos signala, Transport tvari te Metabolizam masnih kiselina bili su podjednako zastupljeni, sa udjelom od 7% (Slika 50.A). Dva proteina uključena u prijenos signala pokazala su smanjenu ekspresiju nakon tretmana s AgNP-CTAB i njegove kombinacije s cisteinom. Dva proteina uključena u transport tvari bila su smanjeno eksprimirana u tretmanu, ali jedan od njih imao je pojačanu ekspresiju u kombiniranom tretmanu s cisteinom. Protein uključen u katabolizam lipida imao je smanjenu, a protein uključen u biosintezu povećanu ekspresiju u odnosu na kontrolu, što je nije uočeno nakon kombiniranog tretmana s cisteinom (Slika 50.B). Najmanje zastupljeni (3%) bili su proteini uključeni u skupine Regulacija staničnog ciklusa, Proteoliza i Metabolizam aminokiselina, koji su svi pokazali smanjenu ekspresiju u odnosu na kontrolu, a razina ekspresije sva tri proteina izjednačena je s kontrolom dodatkom cisteina (Slika 50.B).



Slika 50. A) zastupljenost funkcionalnih skupina diferencijalno eksprimiranih proteina u korijenu nakon tretmana sa 100 μ M AgNP-CTAB u odnosu na kontrolu. **B)** broj proteina iz pojedine funkcionalne skupine čija je ekspresija pojačana (pozitivna os ordinate) ili smanjena (negativna os ordinate) nakon tretmana sa 100 μ M AgNP-CTAB te njegovom kombinacijom sa 500 μ M cisteinom (cys) u odnosu na kontrolu.

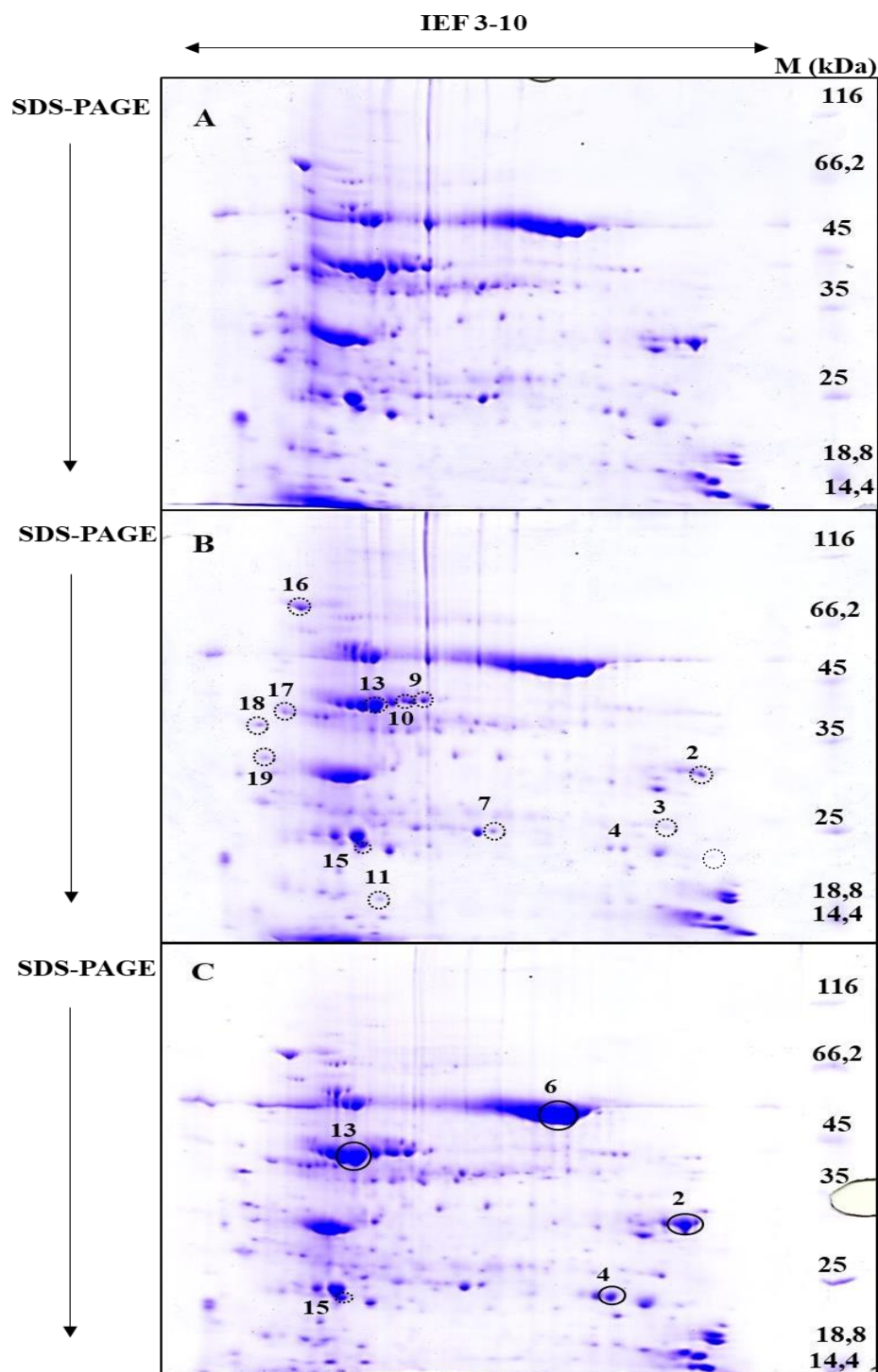
Najzastupljenija kategorija diferencijalno eksprimiranih proteina nakon tretmana s AgNO_3 bili su proteini uključeni u Procese transkripcije i translacije (19%) (Slika 51.A). Četiri proteina pokazala su smanjenu ekspresiju nakon tretmana s AgNO_3 u odnosu na kontrolu, dok je dodatak cisteina kod dva proteina doveo do izjednačavanja ekspresije na razine slične kontroli (Slika 51.B). Nakon tretmana s AgNO_3 , tri su kategorije proteina bile podjednako zastupljene, s udjelom od 14% nakon tretmana s AgNO_3 , a to su: Obrana i odgovor na stres, Transport elektrona i dobivanje energije te Metabolizam ugljikohidrata (Slika 51.A). Dva proteina uključena u odgovor na stres imala su smanjenu, a jedan pojačanu ekspresiju u odnosu na kontrolu, no zanimljivo je da se broj smanjeno eksprimiranih proteina povećao na tri u kombiniranom tretmanu AgNO_3 s cisteinom (Slika 51.B). Tri proteina iz kategorije Transport elektrona i dobivanje energija imala su smanjenu ekspresiju, koja se samo kod jednog izjednačila s kontrolom nakon dodatka cisteina (Slika 51.B). Nadalje, tri proteina uključena u Metabolizam ugljikohidrata pokazala su smanjenu ekspresiju nakon tretmana s AgNO_3 . Dodatak cisteina doveo je do izjednačavanja ekspresije s kontrolom kod jednog od navedenih proteina, dok je jedan protein kojem je ekspresija u tretmanu bila jednaka kontroli, u kombiniranom tretmanu s cisteinom pokazao povećanu ekspresiju (Slika 51.B). Dva proteina uključena u procese isključavanja i biosinteze klorofila (10%), te dva proteina uključena u prijenos signala pokazali su smanjenu ekspresiju nakon tretmana s AgNO_3 , što nije uočeno nakon kombiniranog tretmana s cisteinom (Slike 51.A,B). Najmanje zastupljeni (5%) bili su proteini iz kategorija Transport tvari, Metabolizam aminokiselina, Metabolizam masnih kiselina te Regulacija staničnog ciklusa (Slika 51.A). Protein uključen u transport tvari pokazao je smanjenu ekspresiju u tretmanu, a ekspresija mu je izjednačena s kontrolom nakon dodatka cisteina (Slika 51.B). Jedan protein uključen u biosintezu aminokiselina i jedan protein uključen u regulaciju diobe stanica imali su smanjenu ekspresiju u odnosu na kontrolu nakon tretmana s AgNO_3 i njegovom kombinacijom s cisteinom (Slika 51.B). Protein uključen u biosintezu lipida imao je povećanu ekspresiju nakon tretmana s AgNO_3 , ali je dodatkom cisteina ekspresija smanjena na razinu kontrole (Slika 51.B).

A**B**

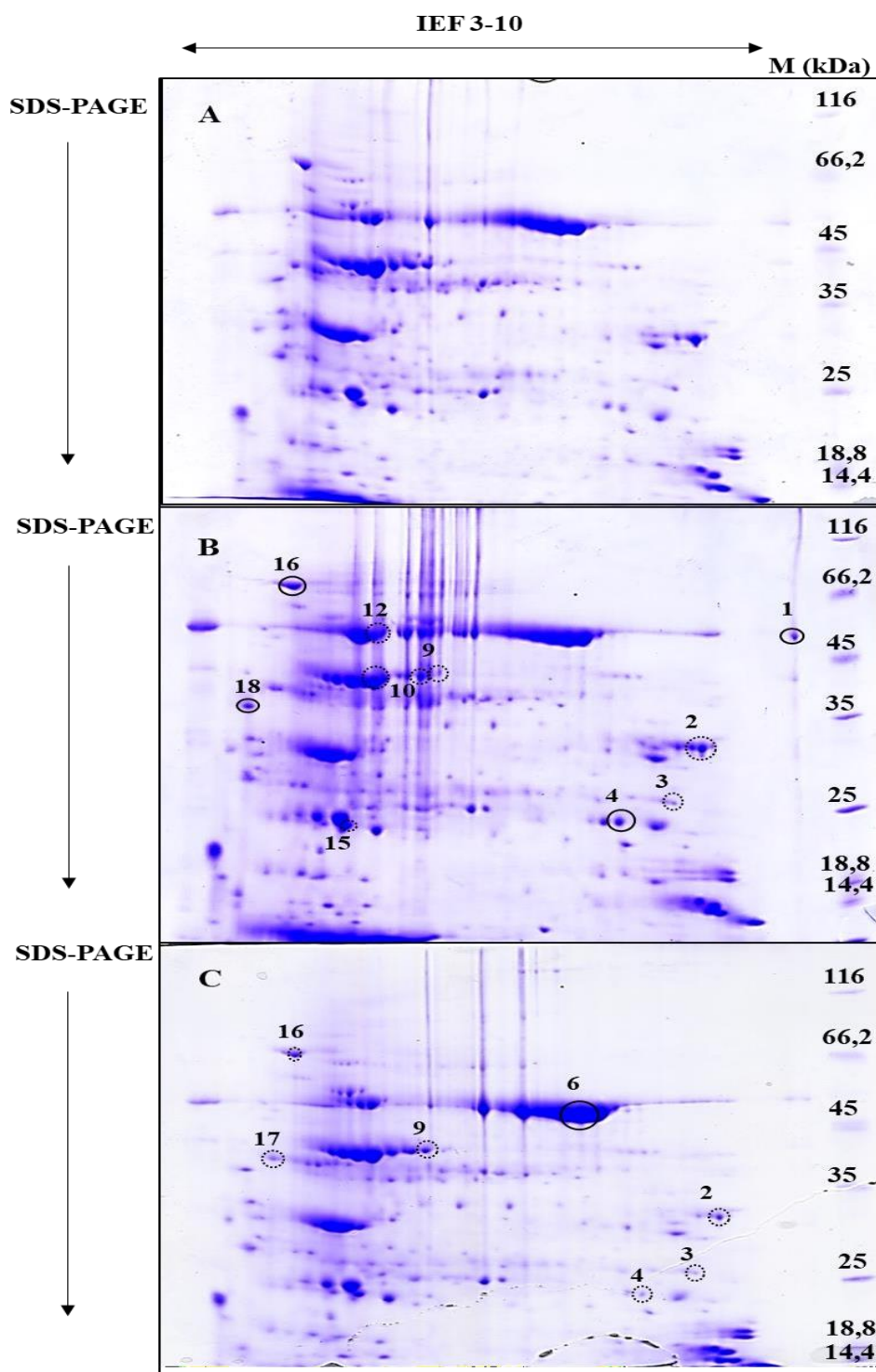
Slika 51. A) zastupljenost funkcionalnih skupina diferencijalno eksprimiranih proteina u korišćenu nakon tretmana sa 100 μM AgNO₃ u odnosu na kontrolu. **B)** broj proteina iz pojedine funkcionalne skupine čija je ekspresija pojačana (pozitivna os ordinate) ili smanjena (negativna os ordinate) nakon tretmana sa 100 μM AgNO₃ te njegovom kombinacijom sa 500 μM cisteinom (cys) u odnosu na kontrolu.

4.7.3. Promjene u proteomu lista

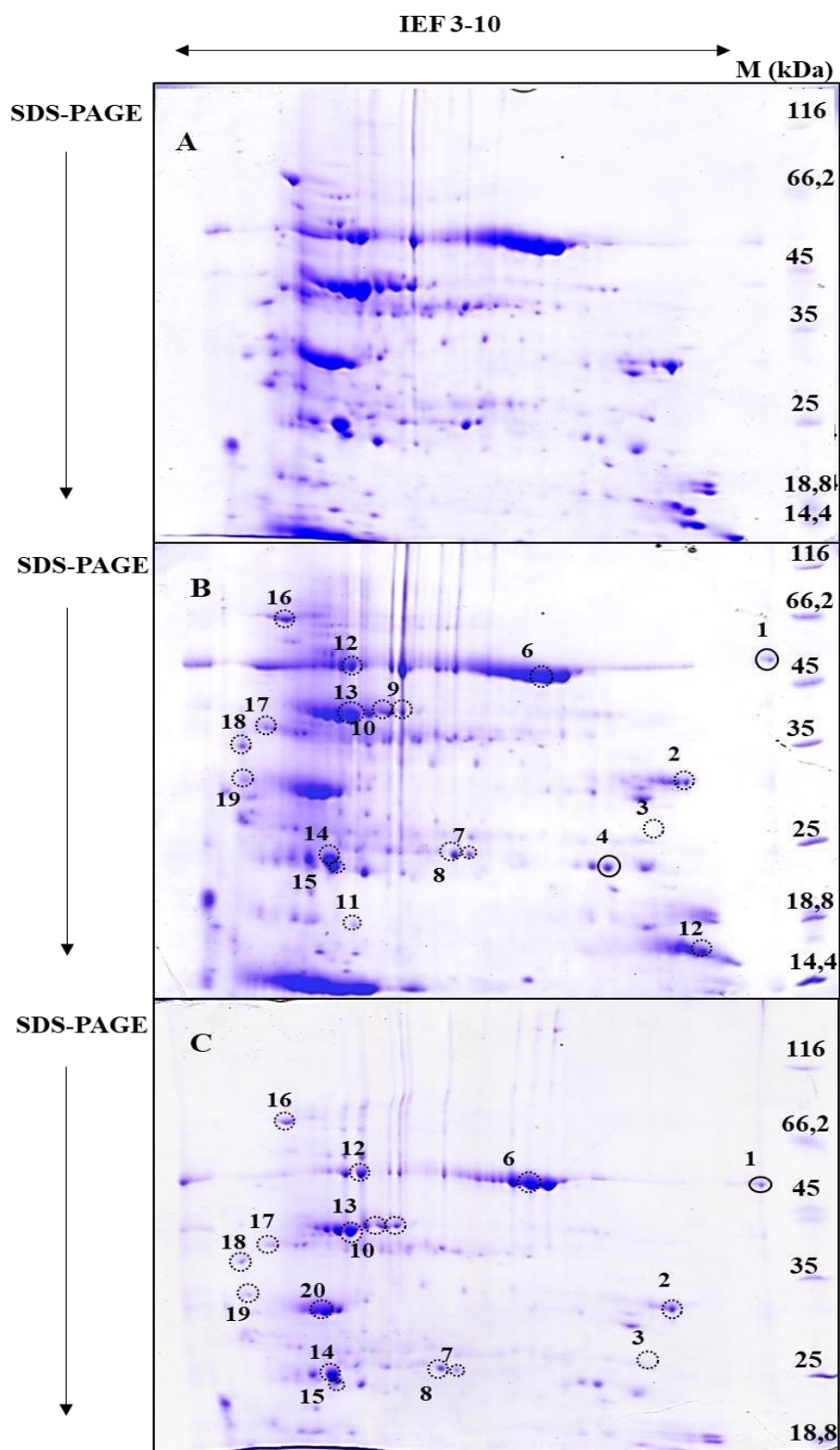
U listu duhana pronađeno je ukupno 48 proteinskih mrlja čija se ekspresija razlikovala između tretmana i kontrole, a nakon njihove analize spektrometrijom masa identificirano je ukupno 20 proteina, od kojih je većina pokazala smanjenu ekspresiju u tretmanima u odnosu na kontrolu. Nakon tretmana s AgNP-PVP, pronađeno je ukupno 13 diferencijalno eksprimiranih proteina koji su svi imali smanjenu ekspresiju u odnosu na kontrolu. Dodatkom cisteina tretmanu s AgNP-PVP, ukupan broj proteina s promijenjenom ekspresijom u odnosu na kontrolu smanjio se na pet, od kojih je samo jedan imao smanjenu ekspresiju, a četiri proteina imala su povećanu ekspresiju u odnosu na kontrolu (Slike 52.A,B,C). Tretman s AgNP-CTAB uzrokovao je promjenu ekspresije ukupno 11 proteina u odnosu na kontrolu, od kojih je 7 imalo smanjenu, a četiri pojačanu ekspresiju. Nakon kombiniranog tretmana AgNP-CTAB s cisteinom, broj diferencijalno eksprimiranih proteina smanjio se na 7, od kojih je 6 imalo smanjenu ekspresiju, dok se broj proteina s povećanom ekspresijom smanjio na jedan (Slike 53.A,B,C). Najveći broj proteina s promijenjenom ekspresijom u odnosu na kontrolu zabilježen je nakon tretmana s AgNO₃, njih ukupno 19, pri čemu je 17 pokazalo smanjenu, a samo dva pojačanu ekspresiju. Dodatak cisteina u kombiniranom tretmanu s AgNO₃, doveo je do smanjenja ukupnog broja diferencijalno eksprimiranih proteina na 17, od kojih je 16 imalo smanjenu, a samo jedan povećanu ekspresiju u odnosu na kontrolu (Slike 54.A,B,C).



Slika 52. Ukupni topivi proteini **A)** kontrolnog lista te lista nakon tretmana s **B)** 100 μM AgNP-PVP ili 100 μM AgNP-PVP s 500 μM cisteinom, razdvojeni 2D elektroforezom. IEF 3-10 – gradijent pH u kojem su proteini razdvojeni prema njihovoj izoelektričnoj točki u 1. dimenziji; SDS-PAGE – razdvajanje proteina SDS-PAGE elektroforezom prema njihovoj molekularnoj masi u 2. dimenziji. Proteini čija se ekspresija razlikuje od kontrole za 1,5 \times označeni su brojevima 1-20. Proteini čija je ekspresija povećana u odnosu na kontrolu označeni su punim (\odot), a oni sa smanjenom ekspresijom isprekidanim kružnicama (\ominus). M – biljezi molekularnih masa (kDa).



Slika 53. Ukupni topivi proteini A) kontrolnog lista te lista nakon tretmana s B) 100 μ M AgNP-CTAB ili C) 100 μ M AgNP-CTAB s 500 μ M cisteinom, razdvojeni 2D elektroforezom. IEF 3-10 – gradijent pH u kojem su proteini razdvojeni prema njihovoj izoelektričnoj točki u 1. dimenziji; SDS-PAGE – razdvajanje proteina SDS-PAGE elektroforezom prema njihovoj molekularnoj masi u 2. dimenziji. Proteini čija se ekspresija razlikuje od kontrole za 1,5 \times označeni su brojevima 1-20. Proteini čija je ekspresija povećana u odnosu na kontrolu označeni su punim (\odot), a oni sa smanjenom ekspresijom isprekidanim kružnicama (\ominus). M – biljezi molekularnih masa (kDa).



Slika 54. Ukupni topivi proteini **A)** kontrolnog lista te lista nakon tretmana s **B)** 100 μM AgNO_3 ili **C)** 100 μM AgNO_3 s 500 μM cisteinom, razdvojeni 2D elektroforezom. IEF 3-10 – gradijent pH u kojem su proteini razdvojeni prema njihovoj izoelektričnoj točki u 1. dimenziji; SDS-PAGE – razdvajanje proteina SDS-PAGE elektroforezom prema njihovoj molekularnoj masi u 2. dimenziji. Proteini čija se ekspresija razlikuje od kontrole za 1,5 \times označeni su brojevima 1-20. Proteini čija je ekspresija povećana u odnosu na kontrolu označeni su punim (\circ), a oni sa smanjenom ekspresijom isprekidanim kružnicama (\odot). M – biljezi molekularskih masa (kDa).

4.7.4. Identifikacija i kategorizacija diferencijalno eksprimiranih proteina u listu

Od ukupno 20 diferencijalno eksprimiranih proteina u listu, samo pet ih je pokazalo isti odgovor nakon sva tri tipa tretmana. Od ukupnog broja, čak 12 proteina pokazalo je različitu ekspresiju između tretmana AgNP-PVP i AgNP-CTAB, dok su samo dva proteina imala različitu ekspresiju između tretmana s oba tipa AgNP i tretmana s AgNO₃. Dodatak cisteina izjednačio je razinu ekspresije s onom zabilježenom u kontroli za 11 proteina nakon kombiniranog tretmana AgNP-PVP i cisteina, 8 proteina nakon kombiniranog tretmana AgNP-CTAB i cisteina, te samo jednog proteina nakon kombiniranog tretmana AgNO₃ i cisteina. Po jedan protein pokazao je smanjenu ekspresiju nakon kombiniranih tretmana AgNP-PVP i AgNP-CTAB s cisteinom u odnosu na kontrolu i odgovarajuće tretmane bez cisteina (Tablica 9.).

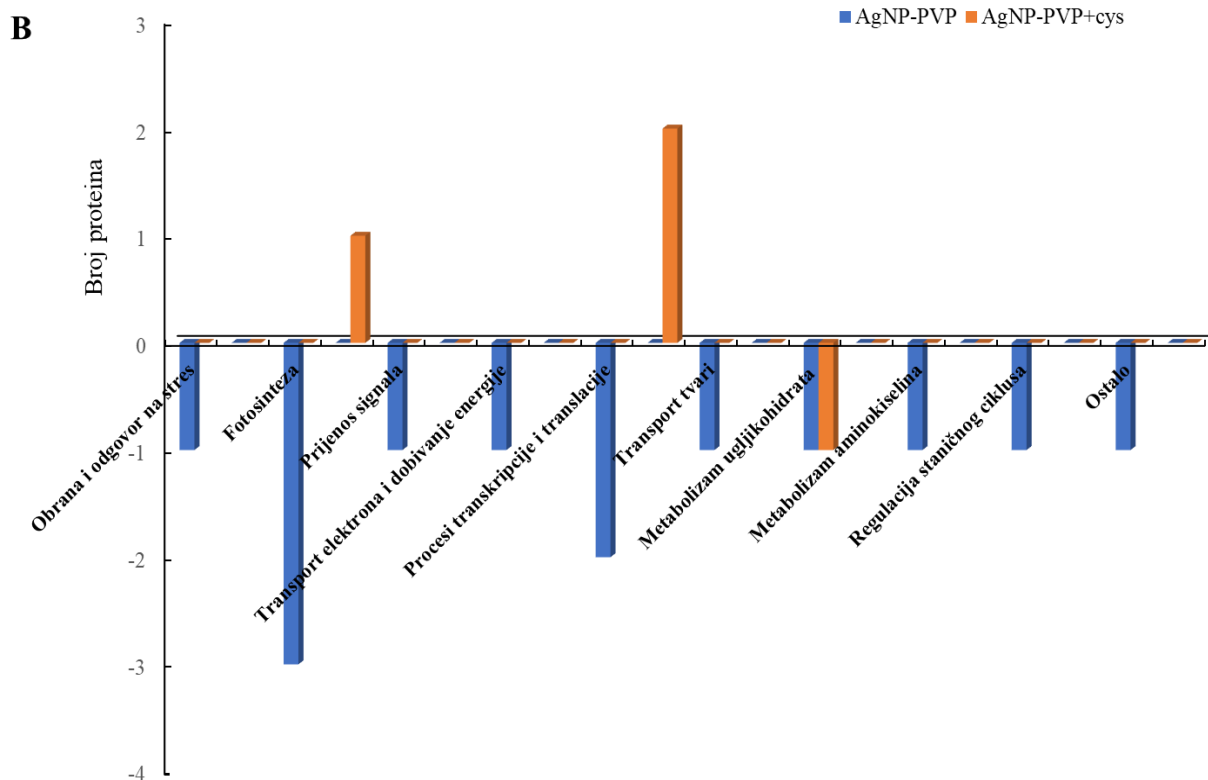
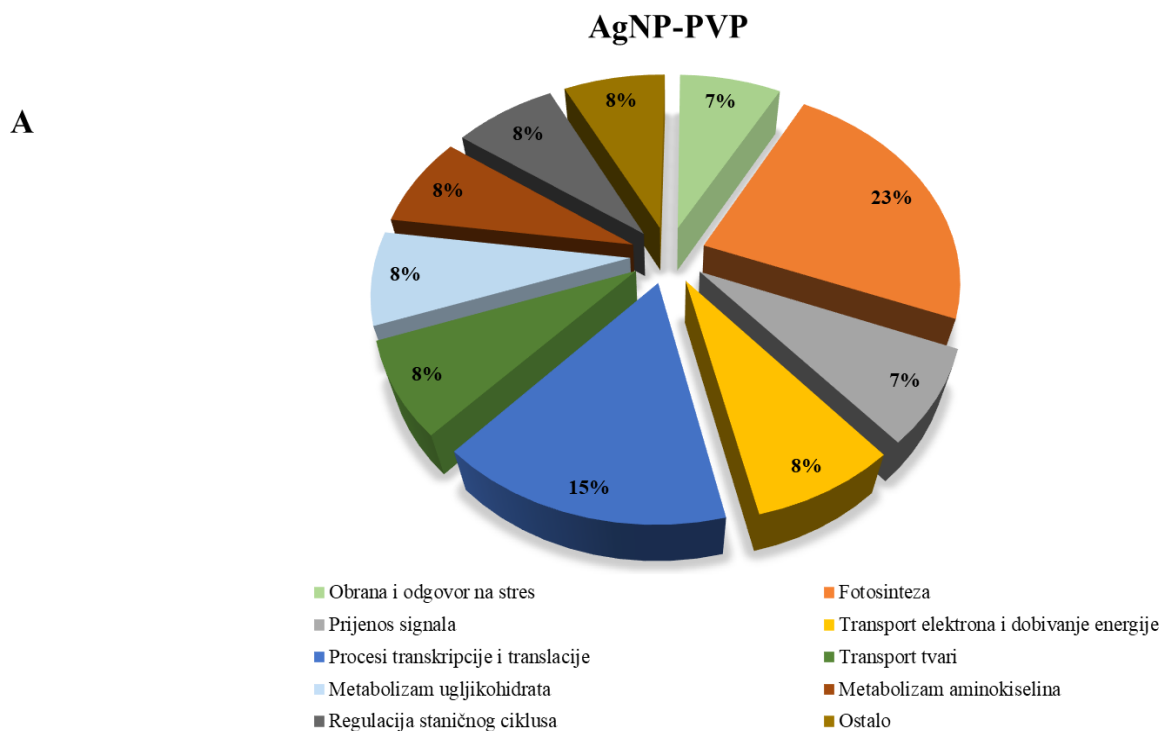
Nakon tretmana s AgNP-PVP, proteini čija je ekspresija bila promijenjena u odnosu na kontrolu u najvećem su udjelu bili proteini uključeni u Proces fotosinteze (23%) (Slika 55.A). Po jedan protein uključen u PSI, aktivaciju enzima ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza/oksigenaza (eng. *Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase*, RuBisCo) te biosintezu klorofila pokazali su smanjenu ekspresiju u tretmanu u odnosu na kontrolu. Ekspresija tri navedena proteina bila je izjednačena s kontrolom nakon dodatka cisteina, dok je aktivator proteina RuBisCo čak pokazao pojačanu ekspresiju u kombiniranom tretmanu AgNP-PVP s cisteinom u odnosu na kontrolu (Slika 55.B). Sljedeći su po zastupljenosti (15%) bili proteini uključeni u Procese transkripcije i translacije (Slika 55.A). Dva su proteina uključena u proces translacije imala smanjenu ekspresiju nakon tretmana s AgNP-PVP u odnosu na kontrolu, dok je dodatak cisteina kod jednog od navedenih proteina uzrokovao povećanje ekspresije na razine jednake kontroli, a kod drugog je uzrokovao povećanje ekspresije na razine veće od kontrole (Slika 55.B). Preostalih 8 funkcionalnih kategorija diferencijalno eksprimiranih proteina imale su jednaku zastupljenost (8%) nakon tretmana s AgNP-PVP. Smanjena ekspresija u odnosu na kontrolu zabilježena je za po jedan protein uključen u procese: Obrane i odgovora na stres, Prijenos signala, Transport elektrona i dobivanje energije, Transport tvari, Metabolizma aminokiselina, Regulacije staničnog ciklusa te biosintezu stanične stijenke (kategorija Ostalo), dok je u kombiniranom tretmanu AgNP-PVP s cisteinom razina ekspresije navedenih proteina bila slična kontroli (Slika 55.B). Protein uključen u metabolizam ugljikohidrata pokazao je smanjenu ekspresiju nakon tretmana s AgNP-PVP i njegovom kombinacijom s cisteinom (Slika 55.B).

Tablica 9. Lokalizacija, biološka i molekularna funkcija diferencijalno eksprimiranih proteina u listu nakon tretmana sa 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ te njihove kombinacije sa 500 μM cisteinom. Za sve tretmane bez (-cys) i s cisteinom (+cys) strelica prema gore (\uparrow) označava pojačanu, strelica prema dolje (\downarrow) smanjenu, a znak jednako (=) podjednaku ekspresiju u odnosu na kontrolu. pI – izoelektrična točka, M – molekulska masa.

Oznaka proteinske mrlje	Ime proteina	pI	M (kDa)	Lokalizacija	Biološki proces	Molekularna funkcija	Diferencijalna ekspresija		
							AgNP-PVP	AgNP-CTAB (-cys / +cys)	AgNO ₃
<i>Obrana i odgovor na stres</i>									
11	Peroksidaza N1	7,59	35,7	Izvanstanični prostor, stanična stijenka	Odgovor na oksidacijski stres	Peroksidaza, oksidoreduktaza	\downarrow / \downarrow	= / =	$\downarrow / =$
14	Katalaza izoenzim 1	6,6	56,8	Citoplazma, peroksisom, glioksisom, stanična membrana	Odgovor na oksidacijski stres, cijepanje H ₂ O ₂	Peroksidaza, oksidoreduktaza	= / =	= / =	\downarrow / \downarrow
<i>Fotosinteza</i>									
20	<i>Oxygen-evolving enhancer protein 1</i>	5,87	35,3	Tilakoidna membrana kloroplasta	Fotosinteza, fotosustav II	Dobivanje kisika	= / =	= / =	\downarrow / \downarrow
13	Aktivaza ribuloza bisfosfat karboksilaze/ oksigenaze	8,43	48,8	Stroma kloroplasta	Fotosinteza	Hidroliza ATP-a	\downarrow / \uparrow	$\downarrow / =$	\downarrow / \downarrow
16	Protein Ycf3 fotosistema I	5,39	19,6	Tilakoidna membrana kloroplasta	Fotosinteza	Esencijalan za sastavljanje kompleksa fotosistema I	$\downarrow / =$	\uparrow / \downarrow	\downarrow / \downarrow

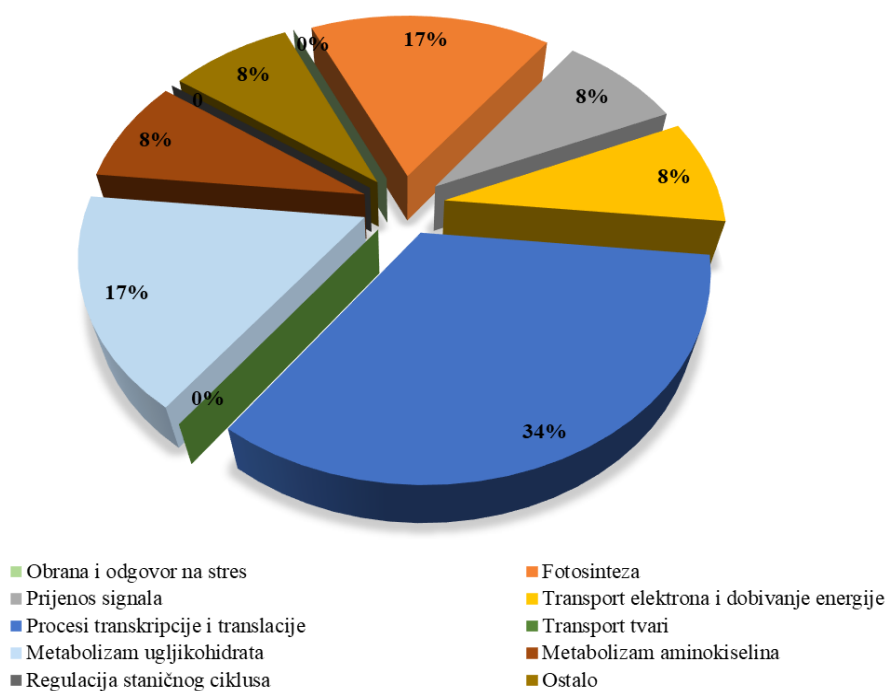
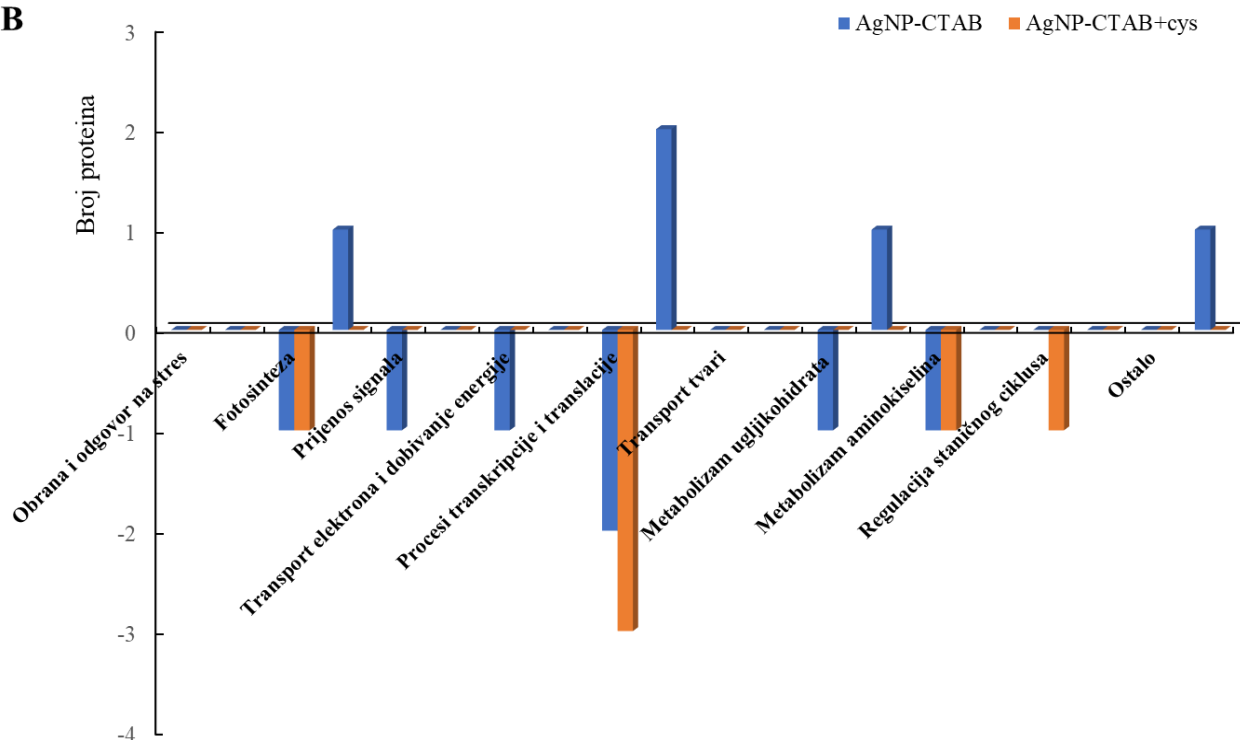
19	Magnezij-kelataza podjedinica ChlD	5,80	83,0	Kloroplast	Biosinteza klorofila	Vežanje ATP-a, aktivnost magnezij-kelataze	↓ / =	= / =	↓ / ↓
<i>Prijenos signala</i>									
10	14-3-3-like protein C	4,78	29,4	Citoplazma	Prijenos signala	/	↓ / =	↓ / =	↓ / ↓
<i>Transport elektrona i dobivanje energije</i>									
7	ATP sintaza epsilon lanac	5,18	14,6	Tilakoidna membrana kloroplasta	Sinteza ATP-a, transport iona	Vežanje ATP-a	↓ / =	= / =	↓ / ↓
12	ATP sintaza beta podjedinica	5,01	53,6	Tilakoidna membrana kloroplasta	Sinteza ATP-a, transport iona	Translokaza	= / =	↓ / =	↓ / ↓
<i>Procesi transkripcije i translacije</i>									
6	Elongacijski faktor Tu	6,34	51,9	Mitohondrij, kloroplast	Translacija, sinteza proteina	Vežanje GTP-a, GTP-aza	= / =	↑ / =	↑ / ↑
2	Protein bL36c velike podjedinice ribosoma	11,91	4,5	Ribosom, kloroplast	Translacija	Strukturna komponenta ribosoma	↓ / ↑	↓ / ↓	↓ / ↓
4	Histon H2B	10,13	15,9	Jezgra	Strukturna komponenta nukleosoma, regulacija replikacije, transkripcije i popravka DNA	Vežanje DNA	= / ↑	↑ / ↓	↑ / =

8	Histon-lizin N-metiltransferaza, H3	8,46	77,4	Jezgra	Regulacija kromatina, metilacija histona	Metil transferaza	= / =	= / =	↓ / ↓
9	Protein Es1 male podjedinice ribosoma	9,73	29,7	Citoplazma	Translacija	Strukturna komponenta ribosoma	↓ / =	↓ / ↓	↓ / ↓
Transport tvari									
5	<i>Pleiotropic drug resistance protein 3</i>	8,40	163,3	Membrana	Transport, potencijalno obrana biljke	ABC tip transportera	↓ / =	= / =	↓ / ↓
Metabolizam ugljikohidrata									
1	Gliceraldehid-3 fosfat dehidrogenaza	6,14	35,5	Citoplazma	Glikoliza	Oksidoreduktaza	= / =	↑ / =	↑ / ↑
15	Piruvat dekarboksilaza 1	6,63	45,01	Citosol	Alkoholno vrenje	Dekarboksilaza, liaza	↓ / ↓	↓ / =	↓ / ↓
Metabolizam aminokiselina									
3	Histidinol-fosfat aminotransferaza	6,07	46,3	Kloroplast	Biosinteza aminokiselina	Aminotransferaza	↓ / =	↓ / ↓	↓ / ↓
Regulacija staničnog ciklusa									
17	Protein sličan kinezinu KIN-5C	5,57	113,7	Citoplazma, diobeno vreteno, mikrotubuli	Stvaranje diobenog vretena, kretanje mikrotubula	Motor protein, vezanje ATP-a, vezanje mikrotubula	↓ / =	= / ↓	↓ / ↓
Ostalo									
18	Poligalakturonaza	7,01	42,7	Izvanstanični prostor	Biogeneza i razgradnja stanične stijenke	Glikozidaza/hidrolaza	↓ / =	↑ / =	↓ / ↓



Slika 55. A) zastupljenost funkcionalnih skupina diferencijalno eksprimiranih proteina u listu nakon tretmana sa 100 µM AgNP-PVP u odnosu na kontrolu. **B)** broj proteina iz pojedine funkcionalne skupine čija je ekspresija pojačana (pozitivna os ordinate) ili smanjena (negativna os ordinate) nakon tretmana sa 100 µM AgNP-PVP te njegovom kombinacijom sa 500 µM cisteinom (cys) u odnosu na kontrolu.

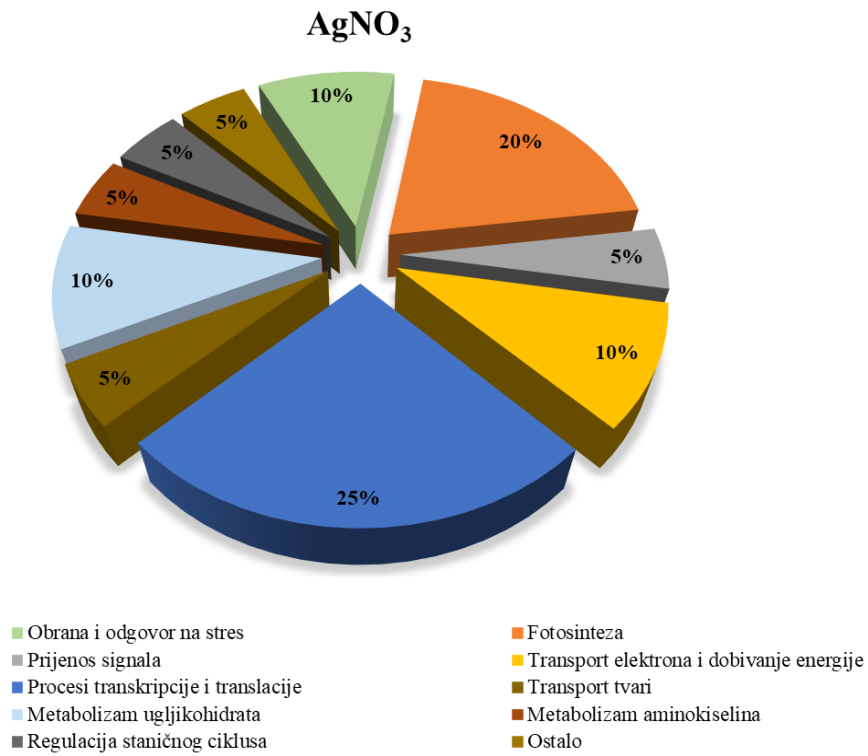
Najveću skupinu proteina (34%) s promijenjenom ekspresijom nakon tretmana s AgNP-CTAB činili su proteini uključeni u Procese transkripcije i translacije, s udjelom od 34% (Slika 56.A). Dva proteina uključena u Proces translacije pokazala su smanjenu ekspresiju, dok su dva proteina, od kojih jedan uključen u proces translacije, a drugi u regulaciju transkripcije, bila pojačano eksprimirana u odnosu na kontrolu. Ekspresija samo jednog od navedenih proteina bila je izjednačena s kontrolom nakon dodatka cisteina, dok su tri preostala proteina u kombiniranom tretmanu AgNP-CTAB s cisteinom pokazala smanjenu ekspresiju u odnosu na kontrolu (Slika 56.B). S udjelom od 17%, podjednako zastupljene bile su kategorije proteina uključenih u Fotosintezu i Metabolizam ugljikohidrata (Slika 56.A). Pritom je ekspresija proteina uključenog u aktivaciju proteina RuBisCo bila smanjena nakon tretmana s AgNP-CTAB, ali izjednačena s kontrolom nakon dodatka cisteina, dok je ekspresija proteina iz PSI bila pojačana u tretmanu, ali smanjena u kombiniranom tretmanu s cisteinom u odnosu na kontrolu (Slika 56.A). Protein uključen u glikolizu imao je pojačanu ekspresiju, dok je protein uključen u proces alkoholnog vrenja pokazao smanjenu ekspresiju u tretmanu s AgNP-CTAB u odnosu na kontrolu. U oba navedena slučaja, dodatak cisteina tretmanu s AgNP-CTAB doveo je do izjednačavanja razine ekspresije na razine slične kontroli (Slika 56.B). Jednako zastupljene bile su kategorije Prijenos signala, Transport elektrona i dobivanje energije, Metabolizam aminokiselina te skupina Ostalo, s udjelom od po 8%. Po jedan protein uključen u prijenos signala, te transport elektrona i dobivanje energije pokazali su smanjenu ekspresiju nakon tretmana s AgNP-CTAB, dok je dodatkom cisteina ekspresija bila izjednačena s kontrolom. Za protein uključen u biosintezu aminokiselina zabilježena je smanjena ekspresija nakon tretmana s AgNP-CTAB i njegovom kombinacijom s cisteinom, dok je protein uključen u biogenezu i razgradnju stanične stijenke (svrstan u skupinu ostalo) bio pojačano eksprimiran u tretmanu, ali dodatkom cisteina ekspresija mu se izjednačila s kontrolom (Slika 56.B).

A**AgNP-CTAB****B**

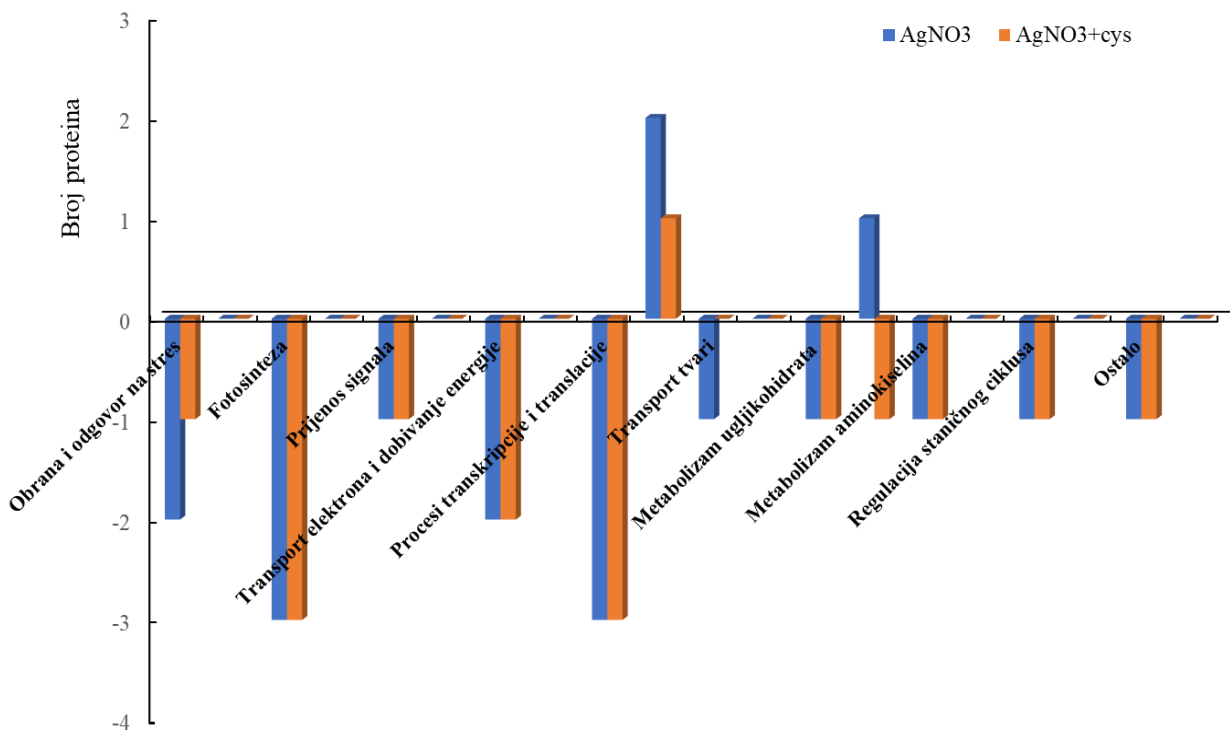
Slika 56. A) zastupljenost funkcionalnih skupina diferencijalno eksprimiranih proteina u listu nakon tretmana sa 100 μM AgNP-CTAB u odnosu na kontrolu. **B)** broj proteina iz pojedine funkcionalne skupine čija je ekspresija pojačana (pozitivna os ordinate) ili smanjena (negativna os ordinate) nakon tretmana sa 100 μM AgNP-CTAB te njegovom kombinacijom sa 500 μM cisteinom (cys) u odnosu na kontrolu.

Nakon tretmana s AgNO_3 , najveći broj diferencijalno eksprimiranih proteina u listu bili su proteini uključeni u Procese transkripcije i translacije (25%) (Slika 57.A). Dva proteina uključena u proces translacije, te jedan protein uključen u regulaciju kromatina pokazali su smanjenu ekspresiju, dok je jedan protein uključen u proces translacije pokazao pojačanu ekspresiju nakon tretmana s AgNO_3 i njegovom kombinacijom s cisteinom (Slika 57.B). Protein uključen u regulaciju transkripcije pokazao je pojačanu ekspresiju nakon tretmana s AgNO_3 , koja je smanjena na razine slične kontroli dodatkom cisteina (Slika 57.B). Sljedeći po zastupljenosti bili su proteini uključeni u proces Fotosinteze, s udjelom od 20%. Za četiri proteina uključena u proces fotosinteze zabilježena je smanjena ekspresija nakon tretmana s AgNO_3 i njegovom kombinacijom s cisteinom (Slika 57.B). Sa udjelom od po 10%, podjednako zastupljeni bili su proteini iz kategorija Obrana i odgovor na stres, Transport elektrona i dobivanje energije te Metabolizam ugljikohidrata (Slika 57.A). Dva proteina uključena u odgovor na oksidacijski stres te dva proteina uključena u transport elektrona i dobivanje energije pokazali su smanjenu ekspresiju nakon tretmana s AgNO_3 i njegovom kombinacijom s cisteinom (Slika 57.B). Nadalje, protein uključen u proces alkoholnog vrenja pokazao je smanjenu, a protein uključen u glikolizu pojačanu ekspresiju u tretmanu s AgNO_3 u odnosu na kontrolu i kombinirani tretman s cisteinom, kod kojeg je ekspresija oba navedena proteina bila slična kontroli (Slika 57.B). Nakon tretmana s AgNO_3 , najmanje zastupljeni (5%) bili su proteini iz kategorija Prijenos signala, Transport tvari, Metabolizam aminokiselina, Regulacija staničnog ciklusa te Ostalo (Slika 57.A). Za po jedan protein iz svake od navedenih skupina, zabilježena je smanjena ekspresija nakon tretmana s AgNO_3 i njegovom kombinacijom s cisteinom u odnosu na kontrolu (Slika 57.B).

A



B



Slika 57. A) zastupljenost funkcionalnih skupina diferencijalno eksprimiranih proteina u listu nakon tretmana sa 100 µM AgNO₃ u odnosu na kontrolu. **B)** broj proteina iz pojedine funkcionalne skupine čija je ekspresija pojačana (pozitivna os ordinate) ili smanjena (negativna os ordinate) nakon tretmana sa 100 µM AgNO₃ te njegovom kombinacijom sa 500 µM cisteinom (cys) u odnosu na kontrolu.

RASPRAVA

5. RASPRAVA

Mehanizmi fitotoksičnosti AgNP još uvijek su nedovoljno razjašnjeni **zbog** kompleksne mreže različitih čimbenika koje treba uzeti u obzir prilikom interpretacije rezultata. Iz dosadašnjih istraživanja poznato je da biljne vrste pokazuju različite odgovore na izloženost AgNP, što uvelike ovisi o starosti biljke i tipu biljnog organa/tkiva koje se istražuje, ali i o eksperimentalnim uvjetima (koncentraciji AgNP, duljini tretmana), te fizikalno-kemijskim svojstvima AgNP (veličina, oblik i naboj) (Tkalec i sur. 2019). AgNP su u interakcijama s medijima visoke ionske jakosti podložne transformacijama poput agregacije ili disocijacije iona Ag^+ , zbog čega im se prilikom sinteze dodaju različiti omotači koji neposredno utječu na njihovu stabilnost u podlozi te posljedično na biodostupnost i toksičnost (Biba i sur. 2022a; Pem i sur. 2021). Zbog toga je prije ispitivanja toksičnih učinaka na biljke, važno detaljno okarakterizirati AgNP u matičnim suspenzijama te ispitati potencijalni utjecaj sastojaka podloge za tretman biljaka na stabilnost AgNP.

5.1. Utjecaj fizikalno-kemijskih svojstava na stabilnost i biodostupnost AgNP

U ovom istraživanju, redukcijom AgNO_3 uz dodatak odgovarajućeg omotača (PVP ili CTAB) uspješno su sintetizirane suspenzije AgNP-PVP i AgNP-CTAB karakteristične žuto-narančaste boje, s česticama pretežito sferičnog oblika i srednje veličine oko 50 nm. Mala odstupanja u izmjerenoj veličini AgNP između različitih metoda mjerenja posljedica su ograničenja svake od metoda, pri čemu položaj apsorpcijskog maksimuma daje predikciju veličine na temelju utvrđenih ekstincijskih koeficijenata (Paramelle i sur. 2014). Mikrografije dobivene TEM-om daju uvid u veličinu jezgre AgNP (eng. *core particle size*), dok mjerenje vrijednosti d_H metodom DLS uračunava i gustoću omotača (Li i sur. 2013). U ovom istraživanju, sterički stabilizirane AgNP-PVP imale su blago negativan, blizu neutralan površinski naboj (izmjeren metodom ELS), dok su elektrostatički stabilizirane AgNP-CTAB nosile pozitivan efektivni naboj. Suspenzije oba tipa AgNP poslužile su kao matične suspenzije za pripremu tretmana željenih koncentracija AgNP u tekućoj hranjivoj podlozi $\frac{1}{2}$ MS.

Gotovo neposredno nakon dodatka AgNP-PVP i AgNP-CTAB u svim ispitivanim koncentracijama u podlogu $\frac{1}{2}$ MS, zabilježena je aglomeracija čestica koja je bila izraženija za AgNP-CTAB. Osim toga, došlo je do promjena u efektivnom naboju, pri čemu su inicijalno blago negativno nabijene AgNP-PVP dobile jači negativni naboj, a vrijednost ζ -potencijala AgNP-CTAB značajno se smanjio u odnosu na onaj izmjeren u matičnoj suspenziji. Od ranije je poznato da povećanje ionske jakosti podloge dovodi do smanjenja apsolutnih vrijednosti ζ -potencijala, što je posljedica promjena u električnom dvosloju, a navedeno dovodi do smanjenja

koloidne stabilnosti i povećane agregacije čestica (Biba i sur. 2020; Wang i sur. 2017). Mjerenje stabilnosti AgNP u podlozi $\frac{1}{2}$ MS kroz period od 7 dana pokazalo je da je u prvoj fazi (prvih nekoliko sati mjerenja), učinak aglomeracije bio puno jače izražen u odnosu na disocijaciju iona Ag^+ , što se očitovalo povećanjem vrijednosti d_H . Pritom su AgNP-PVP značajno sporije aglomerirale i dosegnule maksimalnu vrijednost d_H tek nakon prvog dana, za razliku od AgNP-CTAB koje su maksimalni d_H dosegnule već nakon prvog sata mjerenja. Poznato je da su sterički stabilizirane AgNP manje podložne aglomeraciji i dulje vrijeme mogu opstati kao individualne čestice nego elektrostatički stabilizirane AgNP, što ukazuje na zaštitnu ulogu polimernih omotača od fotokorozije i aglomeracije (Li i sur. 2013), a podržava rezultate dobivene u ovom istraživanju. U drugoj fazi (period između 1. i 7. dana mjerenja) nije zabilježena daljnja aglomeracija AgNP, a ravnoteža se pomakla više u smjeru disocijacije iona Ag^+ . Osim toga, nakon 48 sati zabilježene su promjene u vrijednostima d_H za AgNP-CTAB, najvjerojatnije zbog raspadanja velikih aglomerata i re-stabilizacije manjih aglomerata (veličine oko 100 nm).

Do sada se pokazalo da su AgNP najstabilnije u ultra-čistoj vodi te podlogama manjih ionskih jakosti (De Leersnyder i sur. 2019; Fernando i Zhou 2019) i pretežito lužnatih vrijednosti pH. Na brzinu disocijacije AgNP posebice utječe pH vrijednost podloge, pri čemu se pokazalo da smanjenje vrijednosti pH uzrokuje povećanje brzine otpuštanja iona Ag^+ (Behra i sur. 2013), što djelomično može objasniti disocijaciju AgNP-PVP i AgNP-CTAB u podlozi $\frac{1}{2}$ MS čiji je pH 5,6. Osim toga, brzina otpuštanja iona Ag^+ ovisi o različitim čimbenicima kao što su veličina čestica, oblik, koncentracija i tip omotača te sastav podloge (Ferdous i Nemmar 2020). Pritom se pokazalo da veličina čestica ima značajno veći učinak na brzinu otpuštanja iona Ag^+ u odnosu na tip omotača te da manje čestice brže disociraju zbog većeg omjera površine i volumena (Zhao i Wang 2012). Dosadašnja istraživanja zabilježila su da su AgNP-PVP i AgNP-CTAB podjednako stabilne u ultra-čistoj vodi (Cvjetko i sur. 2017), ali pokazuju različite stabilnosti u podlogama različitih ionskih jakosti. Pokazalo se da su AgNP relativno stabilne u Hutnerovoj tekućoj podlozi s polovičnom koncentracijom makroelemenata (Stegemeier i sur. 2017) i Hoaglandovoj tekućoj podlozi s 10% koncentracije makroelemenata (Jiang i sur. 2014). Nešto slabiju stabilnost pokazale su u podlozi $\frac{1}{2}$ MS, gdje su aglomerirale unutar prva 24 sata (Biba i sur. 2022b), što je u skladu s rezultatima mog istraživanja. S druge strane, manja stabilnost AgNP-CTAB u odnosu na AgNP-PVP u ovom istraživanju u skladu je s prijašnjim istraživanjem, gdje je brza aglomeracija AgNP-CTAB dovela do taloženja čestica, gubitka

omotača i promjene ζ -potencijala od pozitivnih prema negativnim vrijednostima (Biba i sur. 2022a).

Zanimljiva zapažanja zabilježena su nakon dodatka AgNO_3 u podlogu $\frac{1}{2}$ MS. Naime, već nakon jednog sata izmjeren je apsorpcijski maksimum pri valnoj duljini koja je karakteristična za AgNP, što ukazuje na nastanak AgNP vjerojatno kemijskom redukcijom ili fotoredukcijom disociranih iona Ag^+ . Pritom je kao reducens najvjerojatnije djelovala glukoza (Eka Putri i sur. 2019), nastala cijepanjem molekula saharoze iz podloge $\frac{1}{2}$ MS. Nastale AgNP bile su stabilne do 2. dana mjerenja, nakon čega je najvjerojatnije ponovno došlo do disocijacije i potpunog raspadanja AgNP, vidljivog iz izostanka karakterističnog apsorpcijskog maksimuma.

Dodatak cisteina u kombiniranim tretmanima izazvao je brzu destabilizaciju oba tipa AgNP. Naime, kod AgNP-CTAB već se u prvim minutama dogodila potpuna disocijacija čestica koja se očitovala izostankom karakterističnog apsorpcijskog maksimuma, dok je za AgNP-PVP isti učinak zabilježen 30 minuta nakon dodatka u podlogu. Interakcije AgNP s cistenom u skladu su s rezultatima prethodnih istraživanja, koja pokazuju da cistein pospješuje destabilizaciju AgNP u podlogama relativno visoke ionske jakosti i propagira otpuštanje iona Ag^+ (Biba i sur. 2020; Gondikas i sur. 2012; Navarro i sur. 2008b; Sigg i Lindauer 2015), a učinak je bio značajno brži kod nenabijenih čestica, kao što su AgNP-PVP, u odnosu na negativno nabijene čestice, poput AgNP-citrat (Gondikas i sur. 2012). S druge strane, dodatak cisteina u otopinu AgNO_3 izazvao je pojavu apsorpcijskog maksimuma na valnim duljinama 320 – 360 nm, što može odgovarati nastanku ili vrlo malih AgNP ili kompleksa Ag-cistein, s obzirom da rezonancija površinskih plazmona AgNP rezultira apsorpcijskim maksimumom pri valnim duljinama između 380 – 420 nm, dok je s druge strane ioni Ag^+ pokazuju karakterističan maksimum pri valnim duljinama od 200-300 nm (<https://www.phornano.com/4nsilver>, pristupljeno 17.05.2023.).

5.2. Utjecaj stabilnosti AgNP u podlozi na unos i akumulaciju srebra u biljke

U ovom istraživanju zabilježena je značajna akumulacija srebra u korijenu biljaka tretiranih s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO_3 u odnosu na kontrolne biljke, a izmjereni sadržaj srebra očekivano je rastao s porastom koncentracije srebra u primijenjenim tretmanima. Analizom TEM/EDX, u korijenu duhana detektirane su AgNP, što potvrđuje njihov direktan unos u korijen unatoč činjenici da veličinom značajno nadilaze veličinu pora u staničnoj stijenci (5-20 nm). Jedno od mogućih objašnjenja je da AgNP mogu inducirati stvaranje novih, većih pora koje im omogućavaju prolaz kroz staničnu stijenk i membranu, nakon čega putuju do

udaljenih organa putem vaskularnog tkiva i plazmodezmija (Navarro i sur. 2008a; Pal i sur. 2007). Drugo potencijalno objašnjenje je disocijacija AgNP na ione Ag^+ u interakciji sa sastojcima podloge $\frac{1}{2}$ MS ili s eksudatima u području rizosfere (Biba i sur. 2021b; Lv i sur. 2019), njihov unos kroz korijen i stvaranje sekundarnih AgNP unutar same biljke (Dobrucka i sur. 2019; Siddiqi i sur. 2018; Wang i sur. 2017). Dosadašnja istraživanja pokazala su da se male organske molekule, kao što su ugljikohidrati, aminokiseline ili fenoli koje izlučuje korijen, mogu adsorbirati na površinu AgNP te im tako promijeniti površinski naboj i posljedično utjecati na njihovu koloidnu stabilnost (Guo i sur. 2019; Stegemeier i sur. 2015). Nadalje, zabilježeno je da biljke biosintetiziraju AgNP iz otopina srebrovih soli (Shaikh i sur. 2021), pri čemu kao potencijalni reducenti mogu djelovati razni primarni i sekundarni metaboliti (Siddiqi i sur. 2018). Iz UV/Vis apsorpcijskih spektara mog istraživanja vidljivo je da su AgNP sklone brzom aglomeraciji u prvih nekoliko sati nakon dodatka u podlogu $\frac{1}{2}$ MS, što dodatno otežava njihov unos u korijen. Međutim, nakon 2. dana najvjerojatnije dolazi do njihove potpune disocijacije i tada su za unos dostupni uglavnom ioni Ag^+ . S druge strane, iz apsorpcijskog maksimuma vidljivo je da u hranjivoj podlozi iz AgNO_3 nastaju AgNP manjih veličina od AgNP-PVP i AgNP-CTAB, koje su relativno stabilne unutar prva dva dana, nakon čega ponovno disociraju u ione Ag^+ . Stoga je, zbog mogućih interkonverzija oblika srebra u interakciji sa sastojcima podloge, teško donijeti jednoznačne zaključke o biodostupnosti i mehanizmu unosa AgNP u biljku. Smanjeni sadržaj srebra u korijenu nakon tretmana s AgNO_3 u odnosu na odgovarajuće koncentracije tretmana s oba tipa AgNP može se pripisati smanjenoj biodostupnosti iona Ag^+ zbog njihove kompleksacije s ionima iz hranjive podloge i stvaranja teško topivih srebrovih soli. Sukladno rezultatima mog istraživanja, Geisler-Lee i sur. (2013) zabilježili su veću akumulaciju srebra u korijenu biljke *A. thaliana* nakon tretmana česticama AgNP-citrat u odnosu na AgNO_3 , osim pri najvišim ispitanim koncentracijama kod kojih je sadržaj srebra bio sličan nakon oba tipa tretmana. Nadalje, veći sadržaj srebra izmjeren je i u klijancima vrste *A. thaliana* tretiranim AgNP bez omotača u tekućoj hranjivoj podlozi u odnosu na odgovarajuće koncentracije AgNO_3 , što može biti rezultat ili direktnog unosa AgNP kroz korijen ili oksidacije AgNP i otpuštanja iona Ag^+ direktno na površini korijena te unosa disociranih iona Ag^+ (Nair i Chung 2014b). Suprotno rezultatima mog istraživanja, Cvjetko i sur. (2017) zabilježili su veću akumulaciju srebra u korijenu luka nakon tretmana s AgNO_3 u odnosu na iste koncentracije AgNP, što se može pripisati izostanku iona u ultra-čistoj vodi, koja je korištena kao medij za izlaganje, a s kojima bi ioni Ag^+ mogli kompleksirati, te se stoga povećala njihova biodostupnost.

U listu duhana zabilježena je značajna akumulacija srebra nakon sva tri tipa tretmana, iako je akumulacija, kao i u korijenu, bila veća nakon tretmana s oba tipa AgNP u odnosu na AgNO₃. Qian i sur. (2013) također su izmjerili značajno veći sadržaj srebra u listu biljke *A. thaliana* nakon tretmana česticama AgNP-citrat u odnosu na vrijednosti izmjerene nakon izlaganja istim koncentracijama AgNO₃ u hranjivoj podlozi MS. Očekivano, u mom radu sadržaj srebra bio je značajno niži u listu u odnosu na vrijednosti izmjerene u korijenu. Rezultate slične mojim dobili su i Yang i sur. (2020.), koji su zabilježili značajno veću akumulaciju srebra u korijenu u odnosu na izdanke vrste *O. sativa* nakon tretmana s AgNP-PVP u odnosu na AgNO₃ pri istim koncentracijama. Primjenom dva stabilna izotopa (¹⁰⁷AgNO₃ i ¹⁰⁹AgNP) otkrili su da se AgNP učinkovitije translociraju od iona Ag⁺, što se može objasniti kompleksacijom iona Ag⁺ s funkcionalnim skupinama stanične stijenke, kao što su karboksilne, amino i tiolne skupine. Nadalje, analizom strukture apsorpcije rendgenskih zraka blizu ruba (eng. *X-ray absorption near-edge structure*, XANES), u istom istraživanju otkrili su da ioni Ag⁺ reagiraju s ionima klora (Cl⁻) iz hranjive podloge pri čemu nastaje AgCl, čime se smanjuje biodostupnost iona Ag⁺ i mogućnost njihove translokacije (Yang i sur. 2020), što je u skladu s mojim ranijim pretpostavkama. U vrsti *Lactuca sativa* također je zabilježena učinkovitija translokacija neutralnih AgNP-PEG u odnosu na negativno nabijene AgNP-citrat od korijena prema izdancima, što se može pripisati ionskim interakcijama između nabijenih AgNP i komponenti stanične stijenke (Torrent i sur. 2020). Suprotno tome, u listovima vodene leće *Wolffia globosa*, akumulacija srebra bila je veća nakon tretmana s AgNO₃ u odnosu na tretmane s AgNP stabilizirane adenzin trifosfatom (eng. *adenosine triphosphate*, ATP) i citratom u ultra-čistoj vodi i Hoaglandovoj tekućoj podlozi s 10% koncentracije makroelemenata (Zou i sur. 2017), što se ponovno može pripisati većoj biodostupnosti iona Ag⁺ u podlogama manje ionske jakosti u odnosu na podlogu ½ MS korištenu u mom istraživanju. Što se tiče lokalizacije čestica AgNP u listu, iako ih nisam uspjela detektirati, ne može se isključiti njihova translokacija od korijena do listova. Primjerice, Wang i sur. (2017) detektirali su nepromijenjene AgNP veličine 30-120 nm u listovima vrsta *Cucumis sativus* i *T. aestivum* nakon tretmana nanočesticama srebrovog sulfida (Ag₂S-NP) apliciranih putem korijena, čime su ne samo potvrdili direktan unos AgNP nego i njihovu translokaciju do listova.

Dodatak cisteina kod sva tri tipa kombiniranih tretmana smanjio je unos srebra, odnosno njegovu akumulaciju u korijenu i listu, u odnosu na odgovarajuće tretmane bez cisteina. Pretpostavka je da je cistein u podlozi ½ MS kompleksirao s otpuštenim ionima Ag⁺ te im time umanjio biodostupnost. Pritom je učinak bio izraženiji u kombiniranim tretmanima AgNO₃ s

cisteinom u odnosu na kombinirane tretmane AgNP s cisteinom, što je očekivano budući da AgNO₃ u vodenoj otopini prevladava u disociranom obliku.

5.3. Utjecaj AgNP na pojavu oksidacijskog stresa

Rezultati dosadašnjih istraživanja pokazali su da je jedan od mehanizama fitotoksičnosti AgNP prekomjerno stvaranje ROS koji uzrokuju pojavu oksidacijskog stresa u stanicama (Yan i Chen 2019, Tkalec i sur. 2019, Biba i sur. 2022b). Disbalans u proizvodnji i neutralizaciji ROS može dovesti do oštećenja biomolekula, te uzrokovati ozbiljne poremećaje na staničnoj razini (Parvaiz i sur. 2010.)

U ovom radu ispitan je utjecaj tretmana s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ na pojavu oksidacijskog stresa u stanicama korijena i lista odraslih biljaka duhana. Jedan od prvih pokazatelja oksidacijskog stresa je povećanje sadržaja ROS. Mjerenje sadržaja H₂O₂ u ovom istraživanju dalo je nejasne rezultate, s velikim odstupanjima između bioloških replika, zbog čega ih je bilo nemoguće pouzdano interpretirati. Za uspješno mjerenje sadržaja H₂O₂ ekstrakciju je potrebno provesti iz svježeg tkiva, te mjerenje provesti unutar nekoliko sati zbog osjetljivosti H₂O₂ na svjetlost i toplinu (Alexieva i sur. 2001; Hunt i Taube 1952). Međutim, kako bih osigurala što sličnije eksperimentalne uvjete, biljke sam postavila na sve tipove tretmana istovremeno. Zbog velikog broja uzoraka (uzimajući u obzir i da su analizirani zasebno korijen i list), mjerenje razine H₂O₂ provedeno je na uzorcima smrznutog tkiva, što je jedno od mogućih objašnjenja za velika odstupanja između bioloških replika. Još jedno moguće objašnjenje je djelovanje srebra kao vrlo potentnog katalizatora raspadanja H₂O₂ (Pędziwiatr i sur. 2018).

Metoda kojom sam mjerila sadržaj O₂^{•-} primarno se temelji na oksidaciji fluorescentne probe DHE u reakciji sa O₂^{•-}, međutim i drugi slobodni radikali mogu sudjelovati u reakciji, iako u puno manjoj mjeri (Nazarewicz i sur. 2013). U korijenu, najniže koncentracije AgNP-PVP i AgNO₃ značajno su pojačale stvaranje O₂^{•-} u odnosu na kontrolu, dok su 50 i 100 μM AgNP-PVP i 25 μM AgNP-CTAB rezultirali povećanim vrijednostima, ali ne statistički značajno. U prethodnom istraživanju, AgNO₃ je izazvao povećanje sadržaja ROS u korijenu biljke duhana, dok tretman česticama AgNP-citrat nije pokazao promjene u odnosu na kontrolu (Cvjetko i sur. 2018), što ukazuje na ulogu omotača u indukciji stvaranja ROS. Sličan rezultat dobiven je u istraživanju na korijenu luka, gdje je zabilježen značajno jači učinak AgNO₃ na stvaranje ROS u odnosu na iste koncentracije tretmana s AgNP stabiliziranih s tri različita omotača (citrat, PVP i CTAB) (Cvjetko i sur. 2017). Nadalje, u mom istraživanju ni jedna ispitana koncentracija

AgNP-PVP i AgNP-CTAB nije povećala sadržaj MDA i proteinskih karbonila u korijenu, što je u skladu s rezultatima istraživanja na duhanu tretiranom česticama AgNP-citrat (Cvjetko i sur. 2018). S druge strane, u korijenu vrste *T. aestivum* zabilježeno je smanjenje sadržaja MDA nakon tretmana s AgNP bez omotača, dok su povišene vrijednosti zabilježene nakon tretmana s AgNO₃ u odnosu na kontrolu (Pradas del Real i sur. 2017). U istraživanjima na različitim kultivarima pšenice (Barbasz i sur. 2016), klijancima riže (Nair i Chung 2014a) i vrsti *A. thaliana* (Nair i Chung, 2014b), tretman česticama AgNP-citrat doveo je do povećane lipidne peroksidacije i oksidacije proteina u usporedbi s kontrolom. Povećan sadržaj MDA i proteinskih karbonila, u korelaciji s povećanom razinom ROS, zabilježen je i u korijenu luka nakon tretmana s 50, 75 i 100 μM koncentracijama AgNP-PVP i AgNP-CTAB (Cvjetko i sur. 2017). Ovi rezultati pokazuju da nastanak oksidacijskog stresa kao posljedica izloženosti AgNP ovisi o biljnoj vrsti i njenom razvojnom stadiju, pri čemu je važno uzeti u obzir i duljinu tretmana. Što se tiče učinka na genetički materijal, komet test je pokazao da niti jedan tip tretmana iz mog istraživanja nije izazvao značajno oštećenje molekule DNA u korijenu, iako su najveće koncentracije AgNP-PVP i AgNO₃ izazvale blago povećanje % DNA u repu. U ranijem istraživanju, čestice AgNP-citrat pokazale su negativan utjecaj na integritet molekule DNA u korijenu duhana (Cvjetko i sur. 2018). Nadalje, Ghosh i sur. (2012) su nakon izlaganja luka i duhana česticama AgNP-PVP u koncentracijama od 25-75 g L⁻¹ zabilježili povećanje oštećenja molekule DNA već nakon 24 sata, što se može pripisati vrlo visokim koncentracijama AgNP, koje su bile barem 10× veće od onih korištenih u mom istraživanju. U istraživanju Cvjetko i sur. (2017), AgNP-citrat nije pokazao učinak na molekulu DNA u korijenu luka, dok su tretmani s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ pri koncentracijama većim od 50 μM izazvali značajno oštećenje DNA, pri čemu je značajno jači učinak AgNP-CTAB u odnosu na AgNP-PVP pripisan većoj akumulaciji srebra nakon tretmana s AgNP-CTAB u odnosu na AgNP-PVP. Ovi rezultati nisu u skladu s rezultatima mog istraživanja, jer unatoč tome što je akumulacija srebra bila najveća nakon tretmana s AgNP-CTAB, isti nije pokazao utjecaj na integritet molekule DNA, što bi moglo biti posljedica razlika u veličini korištenih AgNP. Naime, promjer AgNP iz rada Cvjetko i sur. (2017) iznosio je 5-10 nm, što je otprilike 5× puta manje od promjera čestica iz mog istraživanja, a kao što je ranije navedeno, manje čestice mogu lakše ući u stanice, te tako izazvati jači negativni učinak. Nadalje, u mom istraživanju biljke duhana izlagane su česticama AgNP u hranjivoj podlozi ½ MS, dok su Cvjetko i sur. (2017) za izlaganje biljaka koristili ultra-čistu vodu, za koju je iz literature poznato da je medij u kojem su AgNP najstabilnije (Cañamares i sur. 2008; Capjak i sur. 2018), te stoga biljkama najdostupnije u nanočestičnom obliku zbog čega mogu izazvati i jači toksični učinak. Važno je istaknuti i da je

modelna biljka u mom istraživanju bio duhan, dok su Cvjetko i sur. (2017) koristili luk, što također može biti jedan od razloga zbog kojih su dobiveni različiti rezultati. Sve navedeno potvrđuje da se razlike u utjecaju AgNP na integritet biomolekula u biljnim stanicama mogu pripisati različitim omotačima za stabilizaciju, koncentracijama i velični AgNP, duljini tretmana kao i razlikama između biljnih vrsta (Biba i sur. 2021a).

Kako bi održale redoks homeostazu u stanicama i sačuvale integritet biomolekula, biljke aktiviraju sustav enzimskih i neenzimskih antioksidansa kao obranu od prekomjernog sadržaja ROS (Yan i Chen 2019). Jedan od najučinkovitijih antioksidansa, ujedno i prva linija obrane protiv ROS, je enzim SOD koji katalizira pretvorbu $O_2^{\cdot-}$ u H_2O_2 . Nastali H_2O_2 zatim razgrađuju enzimi CAT i POX, ali i neenzimski antioksidansi (Waskiewicz i sur. 2014). U ovom istraživanju, povećana aktivnost SOD u odnosu na kontrolu zabilježena je u korijenu nakon oba tipa tretmana s AgNP, pri čemu je jači učinak AgNP-PVP bio u skladu s većim sadržajem $O_2^{\cdot-}$. Jači učinak tretmana s AgNP-PVP na aktivnost ovog enzima dodatno je potvrđen analizom izoformi u gelu jer su samo tretmani s AgNP-PVP inducirali aktivnost izoformi SOD1 i SOD2. Zanimljivo je, međutim, da analiza ekspresije izoforme Cu/Zn-SOD imunodetekcijom nije pokazala promjene nakon tretmana s AgNP i $AgNO_3$, što sugerira da tretmani sa srebrom u korijenu duhana možda pojačavaju aktivnost druge dvije izoforme ovog enzima, Mn-SOD i Fe-SOD. Primjerice, izlaganje vrste *P. sativum* solnom stresu dovelo je do povećanja ekspresije izoforme Mn-SOD (Camejo i sur. 2013), dok su Sandalio i sur. (2001) pokazali da je izoforma Cu/Zn-SOD bila najosjetljivija na tretman s Cd i pokazala najveće smanjenje aktivnosti u odnosu na druge dvije izoforme. Također je zanimljivo da je u korijenu duhana nakon tretmana česticama AgNP-citrat zabilježena pojačana ekspresija izoformi SOD primjenom istog antitijela kao u mom istraživanju (Zovko, 2018), što ukazuje i na mogući utjecaj omotača za stabilizaciju AgNP na ekspresiju ovog enzima. Aktivnost enzima CAT i PPX povećala se nakon tretmana s oba tipa AgNP. Sva tri tipa tretmana izazvala su i pojačanu ekspresiju izoforme CAT detektiranu imunodetekcijom, dok su tretmani s AgNP-CTAB rezultirali i povećanjem aktivnosti enzima CAT u gelu, što je u skladu i s rezultatima dobivenim u korijenu duhana tretiranim s AgNP-citrat (Zovko, 2018). S druge strane, izoforme CAT nisu detektirane u gelu nakon tretmana s AgNP-PVP, što ponovno ukazuje na različit učinak elektrostatički stabiliziranih čestica u odnosu na sterički stabilizirane AgNP. Zanimljivo je da su i sva tri tipa kombiniranih tretmana s cisteinom izazvala povećanje ekspresije CAT u odnosu na kontrolu, iako to nije zabilježeno nakon spektrofotometrijske analize. Povećanje relativne količine enzima, koje bilježi metoda imunodetekcije, ne mora nužno biti u skladu s povećanom

aktivnosti istog enzima, a razlog tome može biti inhibicija aktivnosti enzima ili gubitak njegove native konformacije (Omar i sur. 1999). Povećana aktivnost enzima PPX, zabilježena nakon tretmana s oba tipa AgNP, u skladu je s povećanjem ekspresije izoforme HRP2, dok je ekspresija ove izoforme bila smanjena nakon izlaganja AgNO₃, što sugerira da oblik srebra može utjecati na ekspresiju određenih izoformi antioksidacijskih enzima. Analiza elektroforezom u nativnim uvjetima pokazala je da su svi tretmani s AgNP-PVP inducirali aktivnost izoformi PPX5-7, dok su tretmani s AgNP-CTAB rezultirali njihovom potpunom inhibicijom, što ponovo ukazuje na razlike u učincima sterički stabiliziranih AgNP u odnosu na elektrostatički stabilizirane čestice. Za razliku od enzima SOD, CAT i PPX, enzim APX nije pokazao promjenu u aktivnosti i ekspresiji nakon ispitanih tretmana, što je u skladu s rezultatima zabilježenim u korijenu duhana nakon tretmana s AgNP-citrat (Zovko, 2018). U istraživanjima drugih autora, tretmani česticama AgNP-citrat u ultra-čistoj vodi nisu izazvali promjene u aktivnosti SOD i PPX u korijenu luka (Cvjetko i sur. 2017) i duhana (Cvjetko i sur. 2018), dok je u korijenu luka zabilježeno povećanje aktivnosti PPX nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNP-CTAB (Cvjetko i sur. 2017). Nadalje, u istraživanju Cvjetko i sur. (2018) niže koncentracije AgNP (25 – 100 μM) povećale su aktivnosti CAT, dok su više koncentracije (100 – 500 μM) smanjile aktivnosti APX, što navodi na zaključak da tip omotača korišten za stabilizaciju AgNP, medij za izlaganje i/ili biljna vrsta uvjetuju aktivaciju specifičnih komponenti antioksidacijskog sustava. Tretmani s AgNO₃ pokazali su najslabiji učinak na aktivnost antioksidacijskih enzima budući da se samo aktivnost CAT povećala nakon tretmana s AgNO₃ u odnosu na kontrolu, iako ne statistički značajno, što je u skladu s manjom akumulacijom srebra i sadržaja O₂^{•-} i MDA u tretmanima s AgNO₃ u odnosu na odgovarajuće koncentracije tretmana s oba tipa AgNP. Ovaj rezultat nije u skladu s rezultatom prethodnog istraživanja, gdje je AgNO₃ izazvao puno jače učinke na aktivnost antioksidacijskih enzima u korijenu duhana u usporedbi s česticama AgNP-citrat (Cvjetko i sur. 2018). Ovo odstupanje može biti posljedica različitog ponašanja AgNO₃ u ultra-čistoj vodi korištenoj u spomenutom istraživanju (Cvjetko i sur. 2018) u odnosu na podlogu ½ MS iz mog istraživanja. Naime, ioni Ag⁺ nastali disocijacijom AgNO₃ mogu kompleksirati s komponentama podloge što im smanjuje biodostupnost, a osim toga moguća je i sinteza novih AgNP redukcijom iona Ag⁺. Stoga su u ultra-čistoj vodi ioni Ag⁺ dostupni za unos u biljku u većoj koncentraciji nego u podlozi ½ MS. Dobiveni rezultati ukazuju na aktivaciju antioksidacijskog enzimskog sustava u korijenu duhana nakon tretmana s oba tipa AgNP, što objašnjava relativno mali utjecaj AgNP na integritet biomolekula, vidljivo iz sadržaja MDA, proteinskih karbonila i komet testa.

Osim sustava antioksidacijskih enzima, biljke u borbi protiv oksidacijskog stresa povećavaju sadržaj niskomolekulskih, neenzimskih antioksidansa kao što su prolin i GSH (Biba i sur. 2022b; Jiang i sur. 2014; Hayat i sur. 2012). U ovom istraživanju, sadržaj prolina u korijenu nije se značajno promijenio nakon tretmana s AgNP, a jedino smanjenje zabilježeno je nakon tretmana s 50 μM AgNO₃. U istraživanju na korijenu vrste *M. sativa* tretiranom s AgNP, samo je najveća koncentracija tretmana, koja je bila 18 \times veća od najveće koncentracije korištene u ovom istraživanju, izazvala značajno smanjenje sadržaja prolina (Song i sur. 2022). Jedno od mogućih objašnjenja za smanjenje sadržaja prolina je aktivacija metaboličkog puta njegove razgradnje, pri kojem se oksidacijom jedne molekule L-prolina oslobađa značajna količina energije koja je potrebna stanicama u borbi protiv stresnih uvjeta (Liang i sur. 2013). Druga mogućnost je kompleksacija prolina s ionima Ag⁺ i stvaranje zwitterionskog kompleksa prolin-Ag (Shoeib i sur. 2002), koji bi mogao sterički ometati reakciju imino grupe prolina s ninhidrinom, reagensom korištenim za određivanje sadržaja prolina (Bates i sur. 1973). Nadalje, sadržaj reduciranog GSH ovisio je o koncentraciji i tipu tretmana. Naime, tretman s AgNP-PVP nije pokazao značajan utjecaj, dok su dvije veće koncentracije AgNO₃ i najveća koncentracija AgNP-CTAB značajno smanjile vrijednosti u odnosu na kontrolu. Sličan obrazac zabilježen je i u korijenu vrste *Camelina sativa* tretiranom s AgNP, gdje je pri nižim koncentracijama došlo do povećanja sadržaja GSH, dok se pri većim koncentracijama sadržaj GSH značajno smanjio (Mirmoeini i sur. 2021). Jedno od mogućih objašnjenja smanjenja GSH je inhibitorno djelovanje srebra na aktivnost enzima GR, koji je odgovoran za održavanje zaliha reduciranog GSH. Osim toga, GR ima i stimulativno djelovanje na enzim GST, koji katalizira konjugaciju tiolne skupine GSH s elektrofilnim spojevima (Couto i sur. 2016), zbog čega ista postaje nedostupna za vezanje Ellmanovog reagensa, korištenog za mjerenje sadržaja GSH (Ellman, 1959). Nakon tretmana s AgNP, smanjenje aktivnosti GR te povećanje aktivnosti GST zabilježeno je u korijenu vrste *H. vulgare* (Khromykh i sur. 2015), dok je smanjenje aktivnosti GR, praćeno smanjenjem sadržaja GSH, zabilježeno u korijenu vrste *S. tuberosum* (Bagherzadeh Homaei i sur. 2016). Smanjeni sadržaj GSH može biti i posljedica vezanja srebra s tiolnim skupinama GSH (Gondikas i sur. 2012; Mirmoeini i sur. 2021).

U listu duhana, niti jedna ispitana koncentracija AgNP nije izazvala povećanje sadržaja O₂⁻ niti oštećenje molekule DNA, što je u skladu s rezultatima zabilježenim u listu biljke duhana tretirane s AgNP-citrat (Cvjetko i sur. 2018). Suprotno tome, u listovima vodene biljke *S. polyrhiza*, tretirane česticama AgNP-GA i AgNP-PVP te *L. gibba*, tretirane s AgNP bez omotača, zabilježen je porast razine ROS u odnosu na kontrolu (Oukarroum i sur. 2013; Jiang

i sur. 2014), što je vjerojatno posljedica direktnog kontakta listova s medijem za izlaganje koji sadrži AgNP. Nadalje, suprotno rezultatima mog istraživanja, značajno oštećenje molekule DNA zabilježeno je u listu duhana nakon tretmana česticama AgNP-PVP (Ghosh i sur. 2012) i AgNP-citrat (Lovecká i sur. 2021). Ove razlike vjerojatno su posljedica razlika u ispitanim koncentracijama AgNP, koje su u oba istraživanja bile 2 – 7× veće u odnosu na najveću koncentraciju iz mog istraživanja. Vezano uz parametare oksidacijskog stresa, u mom istraživanju su samo tretmani s AgNP-CTAB izazvali povećanje sadržaja MDA i proteinskih karbonila. Budući da povećanje navedenih parametara nije zabilježeno nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO₃ niti u listu duhana tretiranom s AgNP-citrat (Cvjetko i sur. 2018), on se vjerojatno može pripisati utjecaju omotača CTAB. U prilog ovom zaključku govore i rezultati Jiang i sur. (2014) koji su pokazali da tretman s AgNP-PVP nije izazvao povećanje sadržaja MDA u listu vrste *S. polyrhiza*, dok je tretman s AgNP-GA rezultirao značajnim oštećenjem membranskih lipida, što ukazuje na utjecaj omotača u moduliranju toksičnih učinaka AgNP. Dosadašnja istraživanja na biljkama pokazala su da su AgNP stabilizirane kationskim omotačima, kao što je CTAB, imale jači inhibitorni učinak na rast (Biba i sur. 2020) i stimulatorni učinak na pojavu oksidacijskog stresa (Barbasz i sur. 2016; Biba i sur. 2022) u odnosu na negativno nabijene čestice AgNP-citrat ili nenabijene AgNP-PVP. Razlog tome vjerojatno leži u mogućnosti stvaranja elektrostatskih interakcija između pozitivno nabijenih AgNP-CTAB i negativno nabijene stanične stijenke i membrane biljnih stanica (Barbasz i sur. 2016; Biba i sur. 2020) Jači učinak pozitivno nabijenih AgNP-cistamin na pojavu oksidacijskog stresa u odnosu na AgNP-citrat također je zabilježen u dva varijeteta pšenice (Barbasz i sur. 2018). Tretman s AgNO₃ imao je najslabiji učinak na parametre koji ukazuju na oštećenja biomolekula, što je u skladu s rezultatima prethodno dobivenim na klijancima duhana (Biba i sur. 2022).

Tretmani sa 100 μM koncentracijom oba tipa AgNP povećali su aktivnost enzima SOD i izoformi SOD2 i SOD3 u listu, a povećana aktivnost zabilježena je i za enzim PPX i izoforme PPX3-7. Povećanu aktivnost enzima SOD i PPX zabilježili su i Yasur i sur. (2013) u klijancima vrste *R. communis* nakon tretmana s AgNP-PVP, te Jiang i sur. (2014) u listu vodene leće *S. polyrhiza* nakon tretmana s AgNP-GA i AgNP-PVP. S druge strane, u istraživanju Cvjetko i sur. (2018), tretmani s AgNP-citrat nisu utjecali na aktivnost SOD i PPX u listu duhana. Ove nepodudarnosti rezultata mogu se pripisati razlikama u mediju za izlaganje i omotaču za stabilizaciju AgNP. Zanimljivo je da su tretmani s 25 i 50 μM AgNP-CTAB doveli do smanjenja aktivnosti SOD, što je moguća posljedica smanjenja ekspresije ovog enzima, koju sam zabilježila imunodetekcijom primjenom specifičnog antitijela. Smanjena ekspresija ovog

enzima zabilježena je i nakon analize proteoma lista biljke duhana nakon tretmana s AgNP-citrat (Peharec Štefanić i sur. 2019). Na povećanje aktivnosti i ekspresiju enzima CAT najjači učinak imali su tretmani s AgNP-CTAB, za razliku od AgNP-PVP koje nisu pokazale značajan utjecaj na aktivnost enzima mjerenu spektrofotometrijski i u gelu. S druge strane, tretman duhana istom koncentracijom čestica AgNP-citrat rezultirao je smanjenjem aktivnosti CAT u listovima duhana (Cvjetko i sur. 2018), ponovno ukazujući na razlike u primijenjenim omotačima. Najslabiji učinak zabilježen je na aktivnost enzima APX, koji je samo pokazao pojačanu ekspresiju izoformi APX2 i APX4 nakon tretmana s AgNP-CTAB. Ovaj podatak podudara se s rezultatima u korijenu, a u skladu je i s rezultatima dobivenim u listu nakon izlaganja duhana česticama AgNP-citrat (Cvjetko i sur. 2018). Tretmani s AgNO₃ ponovo su pokazali slabiji učinak na aktivaciju antioksidacijskih enzima u odnosu na tretmane s AgNP. Pritom, 25 i 50 μM AgNO₃ uopće nisu imali utjecaj na aktivnost antioksidacijskih enzima, što je u skladu s rezultatima Cvjetko i sur. (2018), dok je 100 μM koncentracija značajno povećala aktivnost enzima CAT.

Osim aktivacije enzimskih antioksidansa, tretmani s AgNP uzrokovali su promjene u sadržaju neenzimskih antioksidansa prolina i GSH. Naime, svi tretmani s AgNP-PVP izazvali su povećanje sadržaja prolina u listu, dok su samo najveće koncentracije AgNP-CTAB i AgNO₃ pokazale isti učinak. Značajno povećanje sadržaja prolina zabilježeno je u klijancima pšenice (Karimi i Mohsenzadeh 2017) i riže (Nair i Chung 2014a) nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNP-citrat te u klijancima duhana tretiranih sa AgNP-PVP i AgNP-CTAB (Biba i sur. 2022). Povećana sinteza prolina smatra se sistemskim odgovorom biljaka na izloženost metalnom stresu, budući da prolin ne samo da je važan osmolit u stanicama, nego može djelovati i kao kelator metala, čime posredno može umanjiti učinke tretmana sa srebrom (Szabados i sur. 2010; Biba i sur. 2022b). Nadalje, sadržaj reduciranog GSH bio je značajno povećan u odnosu na kontrolu nakon svih ispitanih tretmana, iako je tretman s AgNP-CTAB izazvao jači učinak u odnosu na tretmane s AgNP-PVP i AgNO₃. GSH u obrani od oksidacijskog stresa može djelovati direktno, neutralizacijom prekomjernih ROS (Lee i sur. 2007), ili indirektno, kao jedan od prekursora u sintezi fitokelatina, skupine proteina uključenih u detoksikaciju teških metala (Biba i sur. 2022b). Osim toga, GSH može i sam djelovati kao kelator iona Ag⁺ (Gondikas i sur. 2012), te na taj način smanjiti njihov toksični učinak, što je još jedno od objašnjenja za njegovu povećanu sintezu u stanicama izloženim djelovanju AgNP. U skladu s mojim rezultatima, povećanje sadržaja GSH zabilježeno je u listovima vrste *S. polyrhiza* nakon

tretmana s AgNP-PVP (Jiang i sur. 2014), što je dovelo do uspješnog ublaživanja učinaka oksidacijskog stresa.

Većina učinaka zabilježenih nakon tretmana s AgNP i AgNO₃ u korijenu i listu barem su djelomično bili ublaženi dodatkom cisteina. Od ranije je poznato da cistein može vezati ione Ag⁺ te na taj način ublažiti njihov toksični učinak (Gondikas i sur. 2012; Navarro i sur. 2008; Navarro i sur. 2015; Biba i sur. 2020, Biba i sur. 2022), međutim, utjecaj cisteina na simptome oksidacijskog stresa uzrokovanog tretmanima s AgNP vrlo je slabo istražen. Izraženiji učinak cisteina na tretmane s AgNO₃ u odnosu na kombinirane tretmane s oba tipa AgNP, zabilježen u mom istraživanju, u skladu je s početnom pretpostavkom da najveći utjecaj tretmana s AgNO₃ potječe od disociranih iona Ag⁺. Ove ione cistein uspješno kompleksira te na taj način sprječava njihovu daljnju interakciju s komponentama stanica. S druge strane, dodatak cisteina tretmanima s AgNP imao je ublažavajući učinak na parametre oksidacijskog stresa u odnosu na odgovarajuće tretmane bez cisteina. Moguće objašnjenje je da cistein destabilizira AgNP i propagira otpuštanje iona Ag⁺ koje zatim ligira (Gondikas 2012), što je u skladu s rezultatima stabilnosti AgNP u kombinaciji s cisteinom. U istraživanju Biba i sur. (2020), dodatak cisteina tretmanu s AgNP-CTAB pospješio je rast klijanaca duhana u odnosu na tretman bez cisteina, što u kombinaciji s mojim rezultatima pokazuje da je utjecaj oba tipa AgNP, barem djelomično, posljedica otpuštanja iona Ag⁺.

Generalno, tretmani s AgNP pokazali su jači učinak na aktivaciju enzimskog i neenzimskog antioksidacijskog sustava u listu u odnosu na korijen, što nije u skladu sa značajno većim sadržajem srebra izmjerenim u korijenu u odnosu na list, pri istim koncentracijama tretmana. Jači učinak AgNP na antioksidacijski odgovor u listu duhana može se povezati sa zabilježenim učinkom na fotosintetski aparat. Naime, ranije istraživanje pokazalo je da su AgNP ne samo uzrokovale smanjenje fotosintetske učinkovitosti, nego su i umanjile toleranciju biljaka na jaču svjetlost, kao i smanjenje aktivnosti enzima RuBisCo (Jiang i sur. 2017). Navedeno dovodi do smanjenja utroška svjetlosne energije, dok višak ekscitacijske energije promovira povećanu proizvodnju ROS (Hazeem i sur. 2019; Jiang i sur. 2017; Li i sur. 2018), što objašnjava povećanu potrebu za aktivacijom sustava antioksidansa. Nadalje, tretmani s AgNP pokazali su jači učinak u odnosu na tretmane s AgNO₃ pri istim koncentracijama što je u skladu s rezultatima dobivenim u korijenu. Kao zanimljivost mogu istaknuti da je aktivacija specifičnih komponenti antioksidacijskog sustava bila specifična za biljni organ; naime, u listu je zabilježen porast sadržaja neenzimskih antioksidansa, dok je u korijenu izraženija bila aktivacija enzimskih antioksidansa, primarno enzima APX i PPX. Sukladno mojim rezultatima, u ranijem

je istraživanju zabilježen različit odgovor korijena i izdanaka kukuruza (*Zea mays*) na tretmane s kombinacijom teških metala, gdje je u listu zabilježen povećan sadržaj neenzimskih antioksidansa, dok je u korijenu zabilježena pojačana aktivacija antioksidacijskih enzima POX, APX i GR (AbdElgawad i sur. 2020).

5.4. *In situ* ispitivanje ranog fiziološkog odgovora duhana na tretman s AgNP ili AgNO₃

Većina dosadašnjih istraživanja fitotoksičnosti AgNP bila je provedena u uvjetima *in vitro*, u ekstraktima cijele biljke ili biljnog organa te nakon dovoljno dugog perioda izlaganja koji bi izazvao ozbiljnije poremećaje metabolizma (Tkalec i sur. 2019; Yan i Chen 2019, Biba i sur. 2022). Dosadašnja istraživanja pojave oksidacijskog stresa u biljnim stanicama provedena *in situ* malobrojna su i uglavnom je ispitivan utjecaj teških metala (Rodriguez-Serrano i sur. 2006; Ortega-Villasante i sur. 2015; Vishwakarma i sur. 2017), dok je samo jedno istraživanje ispitalo odgovore na stres uzrokovan česticama AgNP nakon 7-dnevnog tretmana (Nair i Chung, 2014a). Kao što je već ranije navedeno, jedan od prvih znakova oksidacijskog stresa u stanicama je povećanje razine ROS (Akter i sur. 2021), čija je detekcija i kvantifikacija relativno izazovna, budući da su kratkoživuće molekule podložne brzim pretvorbama u druge oblike, a njihova razina u stanici relativno je niska u normalnim uvjetima (eng. *steady-state*) (Murphy i sur. 2022). Primjena histokemijskih metoda i osjetljivih fluorescentnih proba otvara mogućnosti brze i preciznije detekcije ROS u uvjetima *in vivo* ili *ex vivo* (McLennan i Esposti 2000; Murphy i sur. 2022) te omogućuje praćenje pojave oksidacijskog stresa nakon kraćeg vremena izlaganja i primjene značajno nižih koncentracija stresora od onih potrebnih za aktivaciju fiziološkog odgovora koji je moguće pratiti konvencionalnim metodama (Kováčik i Babula, 2017; Ortega-Villasante i sur. 2005).

Nakon kratkotrajnog izlaganja, tretmani s AgNP-PVP i AgNO₃ povećali su razine O₂^{•-} i H₂O₂ u korijenu u odnosu na kontrolu, dok je tretman s AgNP-CTAB rezultirao povećanjem sadržaja O₂^{•-}, ali smanjenjem razine H₂O₂. Pojačano stvaranje O₂^{•-} i H₂O₂, detektirano fluorescentnim probama, zabilježeno je u korijenu riže nakon 7-dnevnog tretmana česticama AgNP-citrat; jačina učinka rasla je s povećanjem koncentracije AgNP i bila je u skladu s povećanom razinom mrtvih stanica zabilježenom bojanjem probom PI (Nair i Chung 2014b), što odgovara rezultatima mog istraživanja. Nadalje, nakon tretmana s AgNP, histokemijskim bojanjem s probama NBT i 3,3'-diaminobenzidin (DAB), detektirane su povećane razine O₂^{•-} i H₂O₂ u korijenu klijanaca gorušice (Vishwakarma i sur. 2017) i luka (Panda i sur. 2011), a povećani sadržaj ROS u oba navedena slučaja bio je u pozitivnoj korelaciji s povećanom stopom mrtvih stanica zabilježenoj probom PI (Vishwakarma i sur. 2017) ili Evansovim modrilom

(Panda i sur. 2011). Pojačano stvaranje H_2O_2 i smanjenje sadržaja reduciranog GSH, detektirano fluorescentnim probama, zabilježeno je i u korijenu vrste *M. sativa* nakon 6-satnog tretmana s Cd i Hg (Ortega-Villasante i sur. 2005), što je u skladu sa smanjenom razinom reduciranog GSH izmjerenom nakon tretmana s $AgNO_3$ u mom istraživanju. Iz literature je poznato da teški metali induciraju sintezu fitokelatina, peptida uključenih u detoksikaciju teških metala (Seregin i Kozhevnikova, 2023), a budući da su fitokelatini oligomeri GSH, smanjenje razine GSH u tkivu moguće je povezati s njihovim usmjeravanjem u biosintezu fitokelatina (Rodríguez-Serrano i sur. 2006). Ostala moguća objašnjenja za smanjenje razine GSH su direktna interakcija teških metala s nukleofilnim tiolnim skupina GSH ili inhibicija enzima GST koji sudjeluje u reakciji stvaranja adukta GSH-MCB (Ortega-Villasante i sur. 2005). Za razliku od $AgNO_3$, oba tipa AgNP su u mom istraživanju izazvali povećanje razine GSH u odnosu na kontrolu, što navodi na zaključak da srebro u obliku NP ima drugačiji mehanizam djelovanja od ionskog srebra.

Povećana razina $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 izmjerena je i u listu duhana nakon sva tri tipa tretmana, a pozitivno je korelirana s povećanjem stope smrti stanica. Povećani sadržaj ovih ROS kao i povećana smrtnost stanica zabilježena je i u listu klijanaca krumpira histokemijskim metodama, nakon 30-dnevnog izlaganja $AgNO_3$ i AgNP bez omotača, a jači učinak zabilježen je nakon tretmana s AgNP u odnosu na $AgNO_3$ (Bagherzadeh Homaei i sur. 2016). Ovi rezultati nisu u skladu s mojima, a razlog tome bi mogla biti razlika u duljini tretmana. Povećane razine $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 , detektirane fluorescentnim probama, te povećana stopa mrtvih stanica zabilježene su i u listu klijanaca pšenice tretiranih 14 dana s NP titanijevog dioksida (TiO_2 -NP) (Chen i sur. 2019). Sličan rezultat histokemijskim bojanjem dobili su i Romero-Puertas i sur. (2004) u listu graška nakon tretmana biljaka s Cd u trajanju od 14 dana. Moguće objašnjenje za povećanu smrtnost stanica u mom i sličnim istraživanjima je da prekomjerno stvaranje ROS dovodi do oštećenja staničnih membrana, što rezultira povećanim propuštanjem elektrolita (eng. *electrolyte leakage*) (Demidchik i sur. 2014), kako je zabilježeno u listu klijanaca krumpira tretiranih s AgNP (Bagherzadeh Homaei i sur. 2016) i u listu graška nakon tretmana s Cd (Romero-Puertas i sur. 2004). Sva tri tipa tretmana iz mog istraživanja dovela su i do povećanja razine reduciranog GSH u listu, pri čemu je tretman s $AgNO_3$ pokazao najjači učinak. Reducirani GSH može direktno ukloniti OH^{\cdot} i 1O_2 , a indirektno sudjeluje u uklanjanju H_2O_2 putem ciklusa askorbat-glutation (Gill i sur. 2013). Stoga je povećanje razine reduciranog GSH moguće pripisati pripremi stanica za obranu od prekomjerne razine ROS, jer osim što sam GSH djeluje kao antioksidans, on ima i posrednu ulogu u uklanjanju ROS kao dio ciklusa askorbat-glutation.

Naime, u stresnim uvjetima reducirani GSH se pojačano prevodi u svoj oksidirani dimer GSSG, koji nema antioksidacijski potencijal (Tausz i sur. 2004). Kako bi se održao optimalan omjer GSH/GSSG, u stanicama dolazi do pojačane sinteze i aktivacije enzima GR, koja je također dio ciklusa askorbat-glutation i katalizira redukciju GSSG u GSH te na taj način održava visoke razine reduciranog GSH (Gill i sur. 2013). Povećana aktivnost enzima GR zabilježena je u listu klijanaca krumpira nakon izlaganja AgNP i AgNO₃ (Bagherzadeh Homae i sur. 2016) te u listu graška nakon tretmana s Cd (Romero-Puertas i sur. 2006). Stoga je povećanu razinu reduciranog GSH u listovima u mom istraživanju moguće povezati s potencijalnim povećanjem aktivnosti GR. Rezultate slične mojim objavili su Maresca i sur. (2022), koji su nakon tretmana mahovine *Leptodictyum riparium* kombinacijom teških metala (Zn, Cu, Cd, Pb) detektirali povećanu razinu reduciranog GSH primjenom probe MCB. U istom istraživanju, zabilježeno je i značajno povećanje sadržaja fitokelatina, što govori u prilog teoriji da tretmani teškim metalima i njihovim NP dovode do usmjeravanja GSH u put biosinteze fitokelatina.

Na temelju povećanja razine ROS i reduciranog GSH izmjerenih *in situ* u korijenu i listu duhana moguće je zaključiti da kratkotrajni tretmani s AgNP i AgNO₃ uzrokuju pojavu oksidacijskog stresa koji dovodi do ireverzibilnih oštećenja i povećanja smrti stanica. Međutim, usporedbom učinaka kratkotrajnog (24 sata) i dugotrajnog (7 dana) tretmana s AgNP i AgNO₃, uočene su određene diskrepancije, iako je važno naglasiti da se ne radi o istim metodama izlaganja niti o istim metodama mjerenja, zbog čega nije u potpunosti pouzdano povlačiti usporedbe. Također, treba naglasiti kako se, prema najnovijim smjernicama, mjerenje razine ROS iz ekstrakata tkiva smatra relativno nepouzdanim u usporedbi s mjerenjem provedenim u biljci ili dijelu biljke zbog: (i) relativne nestabilnosti i kratkog života molekula ROS i (ii) razaranja membrana i povećavanja ionske jakosti uslijed smrzavanja tkiva i homogenizacije, koja može dovesti do promjena u razini ROS do kojih ne bi došlo u normalnim uvjetima u stanicama i stoga nisu nužno posljedica odgovora na biotički ili abiotički stres (Murphy i sur. 2022). Kratkotrajni tretman izazvao je značajno povećanje razine ROS i GSH u korijenu duhana u odnosu na kontrolu, dok dugotrajno izlaganje načelno nije pokazalo značajan utjecaj na sadržaj ROS niti je dovelo do značajnog oštećenja biomolekula i aktivacije antioksidacijskog odgovora. Prvi razlog tome je sigurno razlika u načinu tretiranja jer je kod dugotrajnog tretmana tretirana cijela, intaktna biljka na način da je korijen bio uronjen u otopine srebra. S druge strane, kod kratkotrajnog tretmana, dijelovi korijena i lista su čitavom površinom uronjeni u otopinu srebra i tkivo je netom prije izlaganja mehanički oštećeno zbog uklanjanja s biljke, što neminovno pospješuje ulazak srebra i stoga izaziva jači stres. Drugi razlog je razlika u duljini izlaganja.

Naime, moguće je da kratkotrajni tretman uzrokuje pojavu akutnog oksidacijskog stresa, dok nakon duljeg izlaganja biljka aktivacijom antioksidacijskog sustava nadilazi disbalans u oksidacijskom metabolizmu na način da razvije djelomičnu ili potpunu prilagodbu na uvjete dugotrajnog stresa i/ili u stanicama dolazi do popravaka oksidacijskih oštećenja biomolekula i oporavka stanica zbog intenzivne sinteze novih biomolekula (Halliwell, 2006).

5.5. Utjecaj AgNP na proces fotosinteze

Dosadašnja istraživanja pokazala su da je proces fotosinteze osobito osjetljiv na utjecaj AgNP (Biba i sur. 2022), što se očituje smanjenjem asimilacije CO₂, sadržaja fotosintetskih pigmenta i učinkovitosti fotosinteze (Tkalec i sur. 2019). Međutim, mali broj ovih istraživanja bio je usmjeren na utjecaj različitih omotača i/ili potencijalne transformacije AgNP u podlozi za izlaganje biljaka. U istraživanju Liang i sur. (2018) na mahovini *Physcomitrella patens* zabilježeno je veće oštećenje fotosintetskog aparata nakon izlaganja česticama AgNP bez omotača u odnosu na tretmane s AgNP-PVP i AgNP-citrat, što pokazuje da dodatak omotača može umanjiti negativni učinak AgNP na proces fotosinteze. U istom radu, tretman česticama AgNP smanjio je vrijednosti Φ_{PSII} i qP , ukazujući na smanjenu učinkovitost prijenosa elektrona, dok je s druge strane doveo do povećanja vrijednosti NPQ , što ukazuje na rasipanje energije iz PSII u obliku topline. Ovi rezultati djelomično su potvrđeni i u mom istraživanju. Naime, tretman s AgNO₃ pokazao je slabiji učinak na većinu ispitanih parametra fotosinteze u odnosu na oba tipa AgNP, što se može povezati s većim sadržajem srebra u listu nakon tretmana s oba tipa AgNP u odnosu na iste koncentracije AgNO₃. Slabija inhibicija fotosinteze zabilježena je i u vrsti *A. thaliana* nakon tretmana s AgNO₃ u odnosu na tretman česticama AgNP-citrat pri istoj koncentraciji (Ke i sur. 2018). Nadalje, AgNP-CTAB pokazao je jači negativni učinak na parametre fotosinteze od AgNP-PVP jer je smanjio vrijednosti parametara Φ_{PSII} i qP , ali i vrijednost parametra NPQ i sadržaja svih fotosintetskih pigmenta. Ovi rezultati ukazuju na ozbiljno narušenu učinkovitost fotosinteze, što je najvjerojatnije posljedica strukturnih oštećenja reakcijskih centara PSII i poremećaja u transportnom lancu elektrona. Slični rezultati zabilježeni su i u vrstama *A. thaliana* nakon tretmana s AgNP-citrat (Ke i sur. 2018, Li i sur. 2018), *V. faba* izloženoj AgNP-PVP (Falco i sur. 2020) i *L. gibba* nakon tretmana s AgNP bez omotača (Dewez i sur. 2018). Jači toksični učinak AgNP-CTAB, zabilježen u mom istraživanju, vjerojatno potječe od manje stabilnosti ovih NP u podlozi ½ MS u odnosu na AgNP-PVP te njihovog pozitivnog naboja, za koji je poznato da ima jači toksični učinak u odnosu na neutralne ili negativno nabijene AgNP (Cvjetko i sur. 2017; Biba i sur. (2020), a može se povezati i sa povećanom produkcijom ROS i pojačanim antioksidacijskim odgovorom

(Hazeem i sur. 2019; Jiang i sur. 2017; Li i sur. 2018). Poveznica između negativnih učinaka AgNP na fotosintezu i povećanog stvaranja ROS zabilježena je u nekoliko istraživanja na algama (Hazeem i sur. 2019; Oukarroum i sur. 2012; Zhao i sur. 2021) i biljkama (Das i sur. 2018; Jiang i sur. 2017; Li i sur. 2018; Nair i Chung, 2014a; Sosan i sur. 2016) tretiranih s AgNP sa ili bez omotača. Negativni učinci AgNP-CTAB na parametre fluorescencije klorofila *a* značajno su ublaženi dodatkom cisteina u kombiniranim tretmanima, a sličan učinak cisteina u prevenciji negativnih učinaka na fotosintetsku učinkovitost zabilježen je i u algi *C. reinhardtii* koja je izložena djelovanju AgNP s 9 različitih omotača (Navarro i sur. 2015).

Smanjena učinkovitost fotokemijskih reakcija PSII može se povezati sa smanjenim sadržajem fotosintetskih pigmenata, posebice klorofila (Li i sur. 2018; Ke i sur. 2018; Jiang i sur. 2012, Dewez i sur. 2018; Behra i sur. 2013; Abbas i sur. 2019; Nair i Chung 2014b), do čega dolazi bilo raspadanjem postojećih molekula pigmenata ili inhibicijom biosinteze novih (Abbas i sur. 2019). U mom istraživanju, reducirane vrijednosti *NPQ*, praćene smanjenjem sadržaja karotenoida i de-epoksidacijskog stanja pigmenata ksantofilskog ciklusa nakon tretmana s oba tipa AgNP, mogu se povezati sa smanjenim sadržajem ukupnih klorofila. Smanjenje sadržaja klorofila umanjuje sposobnost apsorpcije svjetlosti i usmjeravanja energije u transportni lanac elektrona, što u konačnici dovodi do inhibicije fotokemijskih reakcija, zbog čega se eliminira potreba za rasapom energije u obliku topline (Peharec Štefanić i sur. 2021). S druge strane, karotenoidi, osim što neposredno sudjeluju u pokretanju fotokemijskih reakcija (Rabinovitch i Govindjee 1970), imaju i važnu zaštitnu ulogu u neutralizaciji slobodnih radikala, zbog čega je povećanje njihovog sadržaja jedan od mogućih mehanizama obrane od ROS (Havaux, 2014). Smanjeni sadržaj ukupnih klorofila i karotenoida zabilježen je nakon tretmana biljaka vrste *A. thaliana* česticama AgNP-citrat (Li i sur. 2018; Ke i sur. 2018) i vrste *O. sativa* s AgNP bez omotača (Nair i Chung 2014b). U vodenoj leći *S. polyrhiza*, smanjenje sadržaja karotenoida nakon tretmana s AgNP-PVP povezano je s inhibicijom fotoprotekcijskog kapaciteta PSII (Jiang i sur. 2017), što je također u skladu s rezultatima mog istraživanja. Iz navedenog može se zaključiti da je jedan od mogućih uzroka jačeg toksičnog učinka AgNP na fotosintezu u odnosu na AgNO₃ smanjena fotoprotekcija PSII zbog smanjenog sadržaja karotenoida, što nakon tretmana s AgNO₃ nije zabilježeno.

Iako sam mehanizam djelovanja AgNP na proces fotosinteze nije dovoljno razjašnjen, moguće objašnjenje je djelovanje iona Ag⁺, koji se otpuštaju s AgNP uslijed njihove oksidacije zbog interakcije sa sastojcima hranjive podloge ili biotransformacije unutar same biljke (Behra i sur. 2013). Naime, ioni Ag⁺ mogu konkurirati ionima Cu⁺ za vezanje na plastocijanin, jedan od

nosača u lancu prijenosa elektrona (Jansson i Hansson 2008), te na taj način ometati prijenos elektrona kroz transportni lanac. Osim toga, poznato je da ioni Ag^+ mogu stvoriti vezu s tiolnim skupinama proteina, zbog čega se smatra da bi mogli ometati proces biosinteze klorofila, vezanjem na neki od enzima koji sudjeluju u tom procesu (Xu i sur. 2010). U mom istraživanju tretman s AgNO_3 nije izazvao značajno smanjenje parametara fluorescencije klorofila *a* u odnosu na kontrolu, a zabilježene su čak i povećane vrijednosti parametara Φ_{PSII} i *qP* u odnosu na kontrolu i tretman s AgNP-CTAB, što ukazuje na blagi stimulatívni učinak AgNO_3 na učinkovitost fotokemijskih reakcija. Međutim, značajno smanjenje sadržaja klorofila, karotenoida i ksantofila zabilježeno je nakon tretmana sa 100 μM AgNO_3 , iako nije bio tako jako izraženo kao nakon izlaganja istoj koncentraciji AgNP-CTAB. Blaži učinak AgNO_3 u odnosu na AgNP moguće je pripisati povećanju de-epoksidacijskog stanja pigmenata ksantofilskog ciklusa.

Iako je analizom TEM/EDX potvrđen unos AgNP u stanice korijena, one nisu detektirane u listu, što je u skladu s rezultatima istraživanja na duhanu tretiranom česticama AgNP-citrat (Cvjetko i sur. 2018). Bez obzira na to, tretmani s 100 μM koncentracijom oba tipa AgNP izazvali su promjene u ultrastrukturi kloroplasta, koje nisu zabilježene nakon tretmana s AgNO_3 , što govori da je srebro u nekom obliku ipak translocirano do lista, što pokazuje i veća akumulacija srebra nakon tretmana s AgNP u usporedbi s AgNO_3 . Ovi rezultati sugeriraju da zabilježeni učinci barem djelomično potječu od intrinzičnih svojstava AgNP u odnosu na učinak iona Ag^+ . U listovima duhana tretiranih s AgNP zabilježeni su izduženi i stanjeni kloroplasti sa značajno većim brojem uvećanih plastoglobula u odnosu na kontrolu. Plastoglobuli su posebni strukturni i funkcionalni pododjeljci tilakoida koji sadrže specifične enzime koji sudjeluju u metabolizmu lipida, a od ranije je poznato da se veličina i broj plastoglobula može povećati uslijed stresnih uvjeta (Bréhélin i Kessler 2008; Eugeni Piller i sur. 2012). Mogući mehanizam uvećavanja plastoglobula pripisuje se degradaciji tilakoidnih membrana kloroplasta pod utjecajem stresnih uvjeta, pri kojoj dolazi do nakupljanja lipida u hidrofobnoj jezgri plastoglobula (Besagni i Kessler 2013). Poremećaj u strukturi tilakoida, koji su naizgled gusto zbijeni, u mom istraživanju zabilježen je nakon tretmana s AgNP-PVP, što je u skladu s rezultatima na klijancima duhana i uročnjaka nakon izlaganja česticama AgNP-citrat (Peharec Štefanić i sur. 2018; Qian i sur. 2013), te u vrsti *Hordeum vulgare* tretiranoj s AgNP bez omotača (Fayez i sur. 2017). Na temelju zabilježenih poremećaja u strukturi kloroplasta, popraćenih smanjenjem sadržaja fotsintetskih pigmenata i učinkovitosti PSII, može se zaključiti

da tretmani s AgNP uzrokuju strukturna i funkcionalna oštećenja fotosintetskog aparata u listu duhana.

5.6. Utjecaj AgNP na promjene u proteomu

Istraživanja ekspresijskih profila proteina daju uvid u funkciju i regulaciju molekularnih odgovora biljaka na stres, budući da su proteini uključeni u odgovor na stres bilo direktno (strukturni proteini, antioksidacijski enzimi i sl.) ili indirektno, regulacijom genoma, transkriptoma ili metaboloma (Kosová i sur. 2018; Peharec Štefanić i sur. 2019). Do sada su u ovom istraživanju zabilježene i opisane ultrastrukturne, fiziološke i biokemijske promjene u korijenu i listu duhana nakon tretmana s AgNP ili AgNO₃, a kako bih ispitala molekularnu osnovu fitotoksičnosti AgNP, analizirala sam promjene u ekspresiji ukupnih topivih proteina korijena i lista duhana nakon 7-dnevnog tretmana sa 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB ili AgNO₃. Analizom proteoma, u korijenu duhana pronašla sam 34 proteina čija je ekspresija promijenjena nakon navedenih tretmana u odnosu na kontrolu, pri čemu je najveći broj pronađenih proteina pokazao smanjenu ekspresiju. Najveći broj diferencijalno eksprimiranih proteina pronađen je nakon tretmana s AgNP-CTAB, dok je najmanje proteina pokazalo promjene u ekspresiji nakon tretmana s AgNO₃, što se može povezati s manjim sadržajem srebra izmjenjenim nakon tretmana s AgNO₃ u odnosu na tretmane s oba tipa AgNP.

Kod sva tri tipa tretmana istaknule su se četiri funkcionalne kategorije s najvećim brojem diferencijalno eksprimiranih proteina, a to su: (i) Obrana i odgovor na stres, (ii) Metabolizam ugljikohidrata, (iii) Procesi transkripcije i translacije te (iv) Transport elektrona i dobivanje energije. Tri proteina uključena u patogenezu (eng. *pathogenesis-related*, PR) imala su promijenjenu ekspresiju nakon tretmana s AgNP, a samo jedan nakon tretmana s AgNO₃. PR proteini primarno su detektirani u biljkama izloženim biotičkom stresu i smatralo se da imaju ulogu u obrani biljke od različitih patogena kao što su virusi, bakterije i gljive (dos Santos i Franco 2023). Međutim, istraživanja su pokazala da izloženost abiotičkim stresnim uvjetima, uključujući i teške metale, također može dovesti do promjene u njihovoj ekspresiji (Sudisha i sur. 2012; Vannini i sur. 2014; Peharec Štefanić i sur. 2018; 2019; Biba i sur. 2022a). U mom istraživanju, protein osmotin imao je smanjenu ekspresiju nakon tretmana s AgNP-PVP, dok je protein sličan osmotinu pokazao smanjenu ekspresiju nakon sva tri tipa tretmana. Osmotin ima ulogu u modulaciji odgovora na stres u biljkama, djelujući kao regulator transkripcije ili signalna molekula (Sudisha i sur. 2012), a njegova smanjena ekspresija zabilježena je i u korijenu duhana tretiranom česticama AgNP-citrat (Peharec Štefanić i sur. 2019). Glukan endo-1,3-beta-glukozidaza, također pripadnik skupine PR proteina čija je funkcija regulacija razine

kaloze u plazmodezmijama, pokazao je smanjenu ekspresiju nakon tretmana s oba tipa AgNP (Kebede i Kebede 2021). S druge strane, povećana ekspresija navedenog proteina zabilježena je u korijenu pšenice (Vannini i sur. 2014) nakon tretmana s AgNP-PVP te korijenu duhana nakon tretmana s AgNP-citrat (Peharec Štefanić i sur. 2019), što pokazuje da učinak na ekspresiju ovog proteina ovisi i o biljnoj vrsti i o omotaču primijenjenom za stabilizaciju AgNP. Dva proteina uključena u odgovor na stres pokazali su promijenjenu ekspresiju u tretmanima sa srebrom. Enzim GST uključen je u metabolizam GSH i njegovu konjugaciju s citotoksičnim spojevima u vakouli (Dixon i Edwards 2010), a njegova pojačana ekspresija smatra se jednom od posljedica povećanog stvaranja ROS i u korelaciji je sa smanjenjem antioksidacijskog potencijala GSH (Maurya i Rizvi 2010). Pojačana ekspresija enzima GST zabilježena je nakon sva tri tipa tretmana, a u skladu je sa smanjenim sadržajem reduciranog GSH izmjerenim spektrofotometrijski. Moguće objašnjenje je da se povećanjem količine GST u stanicama, povećava mogućnost konjugacije GSH s potencijalnim ksenobioticima. Na taj način se smanjuje razina slobodnog reduciranog GSH, a kao što je ranije navedeno, tiolna skupina GSH postaje nedostupna za vezanje na Ellmanov reagens, korišten za određivanje količine reduciranog GSH. Moji rezultati u skladu su s rezultatima dobivenim istraživanjem proteoma korijena pšenice (Vannini i sur. 2014) i u klijanaca duhana tretiranim s AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ (Biba i sur. 2022a). S druge strane, etilen-osjetljivi transkripcijski faktor 3 (eng. *ethylene-responsive transcription factor 3*, ERF3), uključen u etilenski put prijenosa signala u uvjetima stresa, bio je smanjeno ekspimiran nakon tretmana s AgNP-CTAB i tretmana s AgNO₃. Pojačana ekspresija proteina iz skupine ERF povezana je s povećanom otpornošću biljaka na različite tipove abiotičkog stresa (Müller i Munné-Bosch 2015). Zanimljivo je da se za protein ERF3 iz vrste *S. tuberosum* pokazalo da u uvjetima poplave i toplinskog stresa dolazi do povećanja njegove ekspresije, dok suša i povećani salinitet smanjuju ekspresiju ovog proteina, ukazujući na to da transkripcijski faktor ERF3 specifično reagira na različite abiotičke stresne uvjete (Klay i sur. 2014). Budući da je poznato da tretmani teškim metalima mogu dovesti do poremećaja unosa vode i do osmotske neravnoteže (Mashabela i sur. 2023), moguće je da se mehanizam odgovora sličan onome nakon suše i solnog stresa aktivira i nakon tretmana sa srebrom, s obzirom da je protein ERF3 u mom istraživanju pokazao smanjenu ekspresiju.

Iz skupine proteina uključenih u prijenos signala detektirana su dva proteina, mitogen-aktivirana protein kinaza (MAPK) i *14-3-3-like protein A*, sa smanjenom ekspresijom u svim tretmanima. MAPK su skupina proteina uključenih u prijenos signala i stanični odgovor na

egzogene i endogene podražaje, koji imaju regulatornu ulogu u proliferaciji i diferencijaciji stanica (Ren i sur. 2006). MAPK signalni put, uz hormonski i signalni put iona Ca^{2+} , tvori signalnu mrežu odgovora koju aktivira povećana razina ROS (Jalmi i sur. 2018). MAP-kinaze sudjeluju u regulaciji proizvodnje ROS mehanizmom pozitivne povratne sprege, odnosno aktivacija jedne od kaskada unutar MAPK signalnog puta dovodi do pozitivne regulacije proizvodnje ROS (Asai i sur. 2008). U ovom istraživanju, protein MAPK homolog NTF4 pokazao je smanjenu ekspresiju u odgovoru na sva tri tipa tretmana, što ukazuje na potencijalni pokušaj stanica da spriječe prekomjerno stvaranje ROS i time se zaštite od oksidacijskih oštećenja i stanične smrti. Nadalje, protein *14-3-3 like protein A* pripada obitelji signalnih proteina koji sudjeluju u prijenosu signala u procesima elongacije i diobe stanica, vegetativnog rasta i rasta reproduktivnih organa (Camoni i sur. 2018) te je njegova smanjena ekspresija vjerojatno posljedica inhibicije navedenih procesa s ciljem očuvanja energije. Suprotno ovim rezultatima, razina ekspresije proteina 14-3-3 bila je povećana u odgovoru na tretman s AgNP-PVP u korijenu klijanaca pšenice (Vannini i sur. 2014), što ponovno ukazuje na različit odgovor klijanaca i odraslih biljaka na stres izazvan s AgNP.

Smanjenu ekspresiju zabilježila sam i za proteine uključene u glikolizu i Krebsov ciklus, procese ključne za proizvodnju energije u stanicama korijena (Goodwin i Mercer 1983). Enzim gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (GAPDH) imao je smanjenu ekspresiju u tretmanima s oba tipa AgNP, dok je heksokinaza-1 smanjenje ekspresije pokazala nakon tretmana s AgNP-CTAB i AgNO_3 . Smanjena ekspresija enzima glikolize zabilježena je i u korijenu duhana tretiranom s AgNP-citrat (Peharec Štefanić i sur. 2019), što sugerira da je smanjenje proizvodnje energije odgovor biljke na stresne uvjete, iako se čini da je odgovor povezan i s razvojnim stadijem biljke. Naime, pojačana ekspresija proteina uključenih u glikolizu zabilježena je u klijanima duhana nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNP-CTAB (Biba i sur. 2022) i nakon izlaganja česticama AgNP-citrat (Peharec Štefanić i sur. 2018). To se povezuje s povećanom potrebom za energijom za održavanje normalnih funkcija u stanicama mladih biljaka, posebice za obranu od oksidacijskog stresa (Kosova i sur. 2018), dok se u odraslim biljkama smanjenjem ekspresije proteina iz glikolize potencijalno izbjegava prekomjerno stvaranje ROS i sprječava pojava oksidacijskog stresa (Vítámvás i sur. 2015). U skladu s ovim zaključkom je i smanjena ekspresija enzima izocitrat-dehidrogenaze iz Krebsovog ciklusa, koji povezuje glikolizu s mitohondrijskim lancem transporta elektrona, zabilježena nakon tretmana s AgNP-CTAB i AgNO_3 . Smanjena ekspresija navedenog enzima nakon tretmana s AgNP zabilježena je i u korijenu duhana (Peharec Štefanić i sur. 2019). Nadalje, objašnjenje da uslijed

stresa izazvanog srebrom biljke smanjuju proizvodnju stanične energije kako bi se izbjeglo prekomjerno stvaranje ROS podupire i reducirana ekspresija dva proteina iz kategorije transport elektrona i dobivanje energije. Naime, sva tri tipa tretmana smanjila su ekspresiju enzima ubikinol oksidaza 2, koji je uključen u transportni lanac elektrona u procesu staničnog disanja, i enzima NAD(P)H-kinon oksidoreduktaza, koji sudjeluje u prijenosu elektrona u fotosintetskom i mitohondrijskom lancu prijenosa elektrona. Smanjenje ekspresije ubikinol oksidaze 2 zabilježeno je i u klijancima pšenice tretiranim s AgNP bez omotača (Jhanzab i sur. 2019).

U svim tretmanima zabilježeno je smanjenje ekspresije nekoliko proteina uključenih u procese replikacije DNA, transkripcije i translacije. Nakon tretmana s AgNP-CTAB i AgNO₃, zabilježena je smanjena ekspresija ribonukleozid-disfosfat reduktaze, jednog od esencijalnih enzima u procesu replikacije koji katalizira biosintezu deoksiribonukleotida, te za DNA-usmjerenu RNA polimerazu 3A, koja ima važan doprinos u procesima sazrijevanja RNA i translaciji katalizirajući transkripciju malih molekula RNA (eng. *small RNA*, sRNA). Nadalje, tretmani s oba tipa AgNP smanjili su ekspresiju proteina cvjetanja GLOBOSA, regulatora transkripcije specifičnog za RNA polimerazu II, dok su sva tri tipa tretmana imali negativan učinak na ekspresiju proteina 50S ribosomalne podjedinice, koji ima važnu ulogu u sintezi proteina. Budući da navedeni procesi, posebice translacija, iziskuju velike količine energije (Buttgereit i Brandt 1995), moguće objašnjenje za ovakve rezultate je da stanice inhibicijom navedenih procesa štede energiju i usmjeravaju je u mehanizme obrane protiv stresa. Jedan od proteina uključenih u proces elongacije translacije, elongacijski faktor 1 alfa (EF-1A), imao je smanjenu ekspresiju u tretmanima s AgNP-CTAB i AgNO₃. Smanjenje ekspresije elongacijskog faktora Tu zabilježeno je u korijenu duhana tretiranom s AgNP-citrat i AgNO₃ (Peharec Štefanić i sur. 2019). Zanimljivo je, međutim, da je povećana ekspresija proteina uključenih u inicijaciju i elongaciju translacije zabilježena u korijenu klijanaca pšenice nakon izlaganja AgNP-PVP (Vannini i sur. 2014) i klijancima duhana tretiranim s AgNP-citrat (Peharec Štefanić i sur. 2018), što ponovo ukazuje na važnost razvojnog stadija biljke u odgovoru na stres izazvan s AgNP.

Nadalje, po jedan protein iz kategorija Metabolizam aminokiselina i Regulacija staničnog ciklusa pokazali su promijenjenu ekspresiju nakon tretmana sa srebrom. Enzim fosfo-2-dehidro-3-deoksiheptonat aldolaza 1, uključen u biosintezu aromatskih aminokiselina, pokazao je smanjenu ekspresiju u sva tri tipa tretmana. Slično tome, smanjena ekspresija proteina uključenog u proces biosinteze glutamata zabilježena je u korijenu duhana tretiranom s

česticama AgNP-citrat (Peharec Štefanić i sur. 2019). Smanjena sinteza aminokiselina u skladu je sa zabilježenom smanjenom ekspresijom proteina uključenih u proces translacije, a zajedno govore u prilog inhibiciji sinteze proteina, vjerojatno u svrhu očuvanja energije koja je potrebna za obranu od stresnih uvjeta.

Enzim ATP-ovisna cink metaloproteaza FTSH ima primarnu funkciju u kontroli kvalitete i proteolitičkoj razgradnji oštećenih proteina, no osim toga smatra se da sudjeluje u regulaciji staničnog ciklusa i diobi stanica. Za ovaj enzim zabilježena je smanjena ekspresija u tretmanima s AgNP-CTAB i AgNO₃, što se može povezati s potencijalnim usporavanjem rasta u svrhu očuvanja energije za potrebe obrane od stresa. Osim toga, smanjena ekspresija proteina 26S proteasom ne-ATPazne regulatorne podjedinice 3, uključene proteolitičku razgradnju ovisnu o ubikvitinu, zabilježena je u oba tipa tretmana s AgNP. Smanjenja proteolitička razgradnja proteina može se dovesti u vezu s inhibicijom sinteze proteina; naime moguće je da biljka inhibicijom sinteze novih proteina i očuvanjem integriteta postojećih proteina nastoji očuvati normalne razine proteina u stanicama, bez dodatnog utroška energije, čime je u mogućnosti očuvanu energiju usmjeravati u druge procese, primjerice obranu od stresa.

Dva proteina iz skupine Transport tvari pokazala su promijenjenu ekspresiju. Protein *two pore calcium channel protein* (TPCCP), koji sudjeluje u prijenosu iona Ca²⁺ kroz membranu te djeluje kao važan protein u odgovoru na prekomjernu razinu ROS (Jin i sur. 2020), imao je smanjenu ekspresiju samo nakon tretmana s AgNP-CTAB. Ranije se pokazalo da se osim esencijalnih iona metala, kroz transportne kanale poput kanala za ione Ca²⁺ mogu transportirati i ioni teških metala poput Cd²⁺ i Pb²⁺ (Moon i sur. 2019), što ostavlja otvorenu mogućnost da bi se i ioni Ag⁺ mogli transportirati na isti način. Stoga je smanjena ekspresija TPCCP potencijalni mehanizam za izbjegavanje unosa iona Ag⁺ disociranih s relativno nestabilnih čestica AgNP-CTAB u stanice. Protein TIC 214/pretpostavljeni membranski protein Ycf1, koji sudjeluje u prijenosu proteina kroz membrane plastida (Nakai, 2015), smanjenu ekspresiju pokazao je nakon sva tri tipa tretmana, što ukazuje i na smanjenu metaboličku aktivnost plastida u korijenu budući da su plastidi semiautonomni organeli koji većinu proteina potrebnih za svoje aktivnosti dobivaju iz citoplazme. Enzim fosfolipaza D alfa 1, koji sudjeluje u katabolizmu fosfolipida i regulaciji fitohormona i odgovoru na stres (Takáč i sur. 2019), imao je smanjenu ekspresiju u tretmanima s oba tipa AgNP. Suprotno tome, u klijancima duhana tretiranim s AgNP-CTAB zabilježena je povećana ekspresija proteina uključenog u razgradnju masnih kiselina (Biba i sur. 2022a), ponovno ukazujući na različit odgovor klijanaca u odnosu na odrasle biljke. U skladu sa smanjenim katabolizmom masnih kiselina, enzim acetil-koenzim A

karboksilaza-karboksil transferaza, uključen u biosintezu masnih kiselina, pokazao pojačanu ekspresiju nakon sva tri tipa tretmana. Pojačana ekspresija ovog proteina zabilježena je u odgovoru vrste *Gossypium herbaceum* na sušu (Deeba i sur. 2012), dok je u listu *Arachis hypogaea* dovela do povećanja razine PUFA koje su važne u izgradnji bioloških membrana, ali i prijenosu signala stresa (Kottapalli i sur. 2009). Uzimajući navedene rezultate u obzir, inhibicija katabolizma masnih kiselina i njihova pojačana sinteza mogli bi se povezati s izostanakom oksidacijskog oštećenja membrana u mom istraživanju.

Analizom proteoma lista duhana, pronađeno je 20 diferencijalno eksprimiranih proteina, koji su većinom pokazali smanjenu ekspresiju u odnosu na kontrolu, od čega je najveći broj proteina detektiran u odgovoru na tretman s AgNO₃, dok je najmanje proteina pokazalo promjene u ekspresiji nakon tretmana s AgNP-CTAB. Tretman s AgNP-PVP izazvao je najveće promjene u ekspresiji proteina uključenih u proces fotosinteze te procese transkripcije i translacije, dok su tretmani s AgNP-CTAB i AgNO₃ najveće promjene izazvali u ekspresiji proteina uključenih u transkripciju i translaciju, a sljedeći po zastupljenosti bili su proteini uključeni u proces fotosinteze.

Četiri proteina uključena u fotosintezu pokazali su promijenjenu, uglavnom smanjenu ekspresiju u odgovoru na ispitane tretmane, što je u skladu s ranije zabilježenom smanjenom fotosintetskom učinkovitosti. Smanjena ekspresija nakon sva tri tipa tretmana zabilježena je za protein koji djeluje kao aktivator enzima RuBisCo, ključnog enzima u procesu vezanja atmosferskog ugljikovog dioksida (CO₂) u Calvin-Bensonovom ciklusu. Smanjena ekspresija aktivaze enzima RuBisCo zabilježena je i u klijancima duhana tretiranim s AgNP-CTAB (Biba i sur. 2022a), što sugerira da je ovaj protein osjetljiv na tretmane srebrom u različitim razvojnim stadijima. S druge strane, u listu duhana tretiranom s AgNP-citrat nije došlo do promjene u ekspresiji ovog enzima (Peharec Štefanić i sur. 2019), što navodi na zaključak da tip omotača za stabilizaciju AgNP može utjecati na njegovu ekspresiju. Protein *oxygen-evolving enhancer*, koji je dio PSII i ima važnu ulogu u procesu stvaranja O₂ iz H₂O, pokazao je reduciranu ekspresiju samo nakon tretmana s AgNO₃. Smanjena ekspresija navedenog proteina zabilježena je i u listu vrste *G. max* nakon tretmana s AgNP bez omotača (Galazzi i sur. 2019) te u zelenoj algi *C. reinhardtii* tretiranoj česticama AgNP-PEG (Lindgren, 2014), što pokazuje da je ovaj protein osjetljiv na srebro, bez obzira na oblik u kojem je primijenjeno. Nadalje, protein Ycf3, esencijalan za sastavljanje kompleksa PSI, pokazao je smanjenu ekspresiju u tretmanima s AgNP-PVP i AgNO₃, ali povećanu ekspresiju u tretmanu AgNP-CTAB, što pokazuje da na ekspresiju ovog proteina utjecaj zapravo ima omotač za stabilizaciju AgNP, a ne samo srebro.

Osim toga, ovaj rezultat ukazuje na to da tretmani sa srebrom osim na PSII, imaju negativan učinak i na PSI, što odgovara rezultatima dobivenim u listu nakon tretmana duhana s AgNP-citrat (Peharec Štefanić i sur. 2019). Magnezij-kelataza, enzim uključen u proces biosinteze klorofila, pokazao je smanjenu ekspresiju u tretmanu AgNP-PVP i AgNO₃, što je u skladu s izmjerenim smanjenjem sadržaja ukupnih klorofila u odnosu na kontrolu. Tretmani sa srebrom izazvali su smanjenje ekspresije dvije podjedinice proteinskog kompleksa ATP-sintaza, uključene u transport elektrona i dobivanje energije. Kompleks ATP-sintaza sastoji se od više enzima, a nalazi se na tilakoidnoj membrani kloroplasta i unutarnjoj membrani mitohondrija. Ovaj kompleks koristi slobodnu energiju elektrokemijskog gradijenta protona za sintezu ATP-a te na taj način igra ključnu ulogu u proizvodnji energije u stanicama (Whitehouse i sur. 2019). U mom istraživanju, smanjena ekspresija podjedinice epsilon kompleksa ATP-sintaze zabilježena je nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO₃, dok je ekspresija podjedinice beta bila smanjena u tretmanima s AgNP-CTAB i AgNO₃. Ovi rezultati ukazuju na smanjenu proizvodnju energije, koja je u skladu s već ranije zabilježenom smanjenom ekspresijom proteina fotosinteze i učinkovitosti procesa fotosinteze. Smanjena ekspresija podjedinica ATP-sintaze zabilježena je i u listu vrste *G. max* nakon tretmana s AgNP bez omotača i AgNO₃ (Galazzi i sur. 2019) te u listu duhana tretiranom s AgNP-citrat (Peharec Štefanić i sur. 2019). Ekspresija enzima poligalakturonaza (PG), koji katalizira razgradnju pektina u staničnoj stijenci, čime sudjeluje u procesima rasta, razvoja i ekspanzije stanica što je osobito važno za regulaciju otvaranja i zatvaranja puči (Rui i sur. 2017), bila je smanjena u tretmanima s AgNP-PVP i AgNO₃, ali povećana nakon izlaganja česticama AgNP-CTAB. Razvoj i funkcija puči esencijalni su za odvijanje fotosinteze i transpiracije, zbog čega promjena u ekspresiji enzima PG indirektno utječe na pravilno odvijanje navedenih procesa. Do sada je otkriveno da smanjena ekspresija jedne od izoformi PG umanjuje mogućnost normalnog zatvaranja puči, dok povećana ekspresija ubrzava otvaranje puči (Rui i sur. 2017), što može izazvati poremećaje u transpiraciji. Oba poremećaja na različit način dovode do povećanog gubitka vode kroz puči, što za posljedicu može imati smanjenu fotosintetsku učinkovitost (Ma i Takahashi 2002) i u skladu je sa smanjenjem fotosintetske učinkovitosti zabilježenom u mom istraživanju. Kada se svi ovi rezultati uzmu u obzir čini se da smanjena ekspresija enzima uključenih u biosintezu klorofila dovodi do smanjenog sadržaja ukupnih klorofila, što vjerojatno rezultira smanjenom mogućnosti apsorpcije i prijenosa energije, a zajedno s inhibicijom ekspresije proteina uključenog u oksidaciju vode i evoluciju kisika dovodi do poremećaja u transportu elektrona unutar PSII. Smanjena učinkovitost transporta unutar PSII rezultira i smanjenjem sinteze ATP-a, na što dodatni učinak može imati smanjena ekspresija dviju podjedinica ATP-sintaze, a

posljedica je smanjena proizvodnja energije. Zbog smanjene proizvodnje ATP i NADPH u reakcijama na svjetlosti, vjerojatno dolazi do inhibicije reakcija Calvin-Bensonovog ciklusa, rezultirajući smanjenom asimilacijom CO₂, što podupire smanjenje ekspresije proteina aktivatora enzima RuBisCo.

Dva proteina uključena u remodeliranje kromatina i regulaciju transkripcije pokazali su promijenjenu ekspresiju u odgovoru na tretmane sa srebrom. Histon H2B, strukturna komponenta nukleosoma, bio je pojačano eksprimiran u tretmanima s AgNP-CTAB i AgNO₃. Ovaj rezultat može se povezati s izostankom oštećenja molekule DNA u navedenim tretmanima budući da su histoni, ne samo uključeni u pakiranje molekule DNA i regulaciju transkripcije i translacije, već također sudjeluju i u popravku oštećenja molekule DNA (Singh i sur. 2010). Nakon tretmana s AgNO₃, zabilježena je i smanjena ekspresija enzima histon-lizin N-metiltransferaza, koji katalizira metilaciju lizinskih ostataka histona, te igra važnu ulogu u epigenetičkoj regulaciji transkripcije (Li i sur. 2022). Od ranije je poznato da srebro ima utjecaj na stanični ciklus i inducira hipermetilaciju DNA putem signalnih putova p53 i p21, što dovodi do epigenetičke disregulacije i reprogramiranja ekspresije gena (Zhao i sur. 2021). Stoga, smanjena ekspresija navedenog proteina može predstavljati pokušaj stanica da spriječe hipermetilaciju DNA i spriječe epigenetičku disregulaciju.

Tri proteina uključena u proces translacije također su imali promijenjenu ekspresiju. Elongacijski faktor Tu, protein odgovoran za vezanje aminoacil-tRNA na ribosom u procesu sinteze peptida (Harvey i sur. 2019), bio je pojačano eksprimiran u odgovoru na tretmane s AgNP-CTAB i AgNO₃, dok je njegova ekspresija bila smanjena nakon izlaganja duhana česticama AgNP-citrat (Peharec Štefanić i sur. 2019), što još jednom ukazuje na važnost omotača u fitotoksičnom učinku AgNP. Nadalje, po jedan protein male i velike podjedinice ribosoma pokazali su smanjenu ekspresiju nakon sva tri tipa tretmana. Smanjena ekspresija strukturnih proteina ribosoma ukazuje na generalni poremećaj u sintezi proteina, a slični rezultati zabilježeni su i u proteomu lista duhana nakon izlaganja česticama AgNP-citrat (Peharec Štefanić i sur. 2019). U prilog ovom zaključku govori i smanjena ekspresija enzima histidinol-fosfat aminotransferaza, koji je uključen u biosintezu aminokiselina, zabilježena nakon svih tretmana. Smanjena ekspresija proteina uključenog u biosintezu aminokiselina detektirana je i u listu vrste *G. max* nakon tretmana s AgNP bez omotača i AgNO₃ (Galazzi i sur. 2018).

Dva antioksidacijska enzima pokazala su promjene u ekspresiji u odgovoru na tretmane sa srebrom. Enzim peroksidaza N1 imao je smanjenu ekspresiju u tretmanima s AgNP-PVP i

AgNO₃, dok je izoforma enzima CAT pokazala smanjenu ekspresiju samo nakon tretmana s AgNO₃, što nije sasvim u skladu s rezultatima imunodetekcije. Isti antioksidacijski enzim može u stanici biti prisutan u više različitih izoformi, čija se ekspresija i aktivnost može razlikovati u uvjetima stresa (Camejo i sur. 2013; Sandalio i sur. 2001; Yoshimura i sur. 2000). Zbog toga je teško povlačiti poveznicu sa rezultatima dobivenim imunodetekcijom, jer korištena antitijela ne detektiraju sve izoforme jednog enzima. Smanjena ekspresija nekih antioksidacijskih enzima pronađena je i u drugim biljnim vrstama nakon izlaganja AgNP. Primjerice, ekspresija izoenzima Fe-SOD bila je smanjena u listu duhana tretiranom s AgNP-citrat (Peharec Štefanić i sur. 2019), dok su smanjene ekspresije izoenzima Cu/Zn-SOD i Mn-SOD te enzima 2-cys peroksiredoksin, uključenog u neutralizaciju alkilnih hidroksiperoksida, pronađene u listu vrste *G. max* nakon tretmana s AgNP bez omotača (Galazzi i sur. 2018).

Dva proteina uključena u metabolizam ugljikohidrata imala su promijenjenu ekspresiju u tretmanima sa srebrom u odnosu na kontrolu. Enzim GAPDH, uključen u proces glikolize, imao je pojačanu ekspresiju nakon tretmana s AgNP-CTAB i AgNO₃, što se razlikuje od rezultata u korijenu gdje je zabilježena smanjena ekspresija ovog proteina. To sugerira da nisu svi dijelovi biljke jednako osjetljivi na tretmane sa srebrom odnosno da odgovor može biti specifičan za određeno tkivo ili organ. U listu duhana tretiranom s AgNP-citrat pronađena je smanjena ekspresija GAPDH (Peharec Štefanić i sur. 2018), što ponovo ukazuje na značajan doprinos omotača učinku AgNP. Pojačana aktivacija procesa glikolize u listu duhana može predstavljati kompenzacijski mehanizam za proizvodnju energije u uvjetima smanjene fotosintetske učinkovitosti. Enzim piruvat dekarboksilaza, koji katalizira pretvorbu piruvata u acetaldehid u procesu alkoholnog vrenja, pokazao je smanjenu ekspresiju nakon sva tri tipa tretmana. Smanjena ekspresija navedenog enzima pronađena je i u vrsti *G. max* tretiranoj s AgNP bez omotača (Mustafa i sur. 2015). Moguće objašnjenje za smanjenu ekspresiju ovog enzima je usmjeravanje piruvata u Krebsov ciklus kao odgovor stanica na pojačane zahtjeve za energijom, u svrhu obrane od stresnih uvjeta.

Nakon tretmana s AgNP-PVP i AgNO₃ zabilježena je smanjena ekspresija proteina *pleiotropic drug resistance protein 3* (PDR3), koji pripada obitelji ABC (eng. *ATP-binding cassette*) tansporteru, koji osim u transportu proteina, sudjeluju u procesima detoksifikacije, sprječavanju gubitka vode te transportu fitohormona i sekundarnih metabolita (Nuruzzaman i sur. 2014). Za neke od proteina iz skupine ABC tansporteru poznato da sudjeluju u detoksifikaciji teških metala njihovim prijenosom u vakuolu, gdje sekvstriraju s proteinima iz skupine fitokelatina ili metalotioneina, te izbacivanjem iz stanice, zbog čega je povećana ekspresija tih proteina

povezana s povećanom otpornosti biljaka na stres uzrokovan teškim metalima (Naaz i sur. 2023). Međutim, ABC proteini sudjeluju i u transportu raznih drugih metabolita, a budući da za transport troše energiju pohranjenu u obliku ATP-a (Martinoia i sur. 2000), moguće objašnjenje za smanjenu ekspresiju proteina PDR3 u mom istraživanju je inhibicija transporta tvari u svrhu očuvanja energije za obranu od stresa.

Ekspresija proteina sličnog kinezinu (KIN-5C) bila je smanjena u odnosu na kontrolu u tretmanima s AgNP-PVP i AgNO₃. Ovaj motorički protein važan je za stabilizaciju mikrotubula diobenog vretena i organizaciju mreže mikrotubula (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P82266/entry>, pristupljeno 18. kolovoza 2023.). Smanjena ekspresija ovog proteina vjerojatno negativno utječe na diobu stanica, što sugerira usporeni rast u stresnim uvjetima, a u skladu je s prethodnim istraživanjem na vrsti *A. thaliana* gdje je nakon tretmana s AgNP zabilježena smanjena brzina stvaranja mikrotubula (Angelini i sur. 2022).

Slično kao i u korijenu, tretmani sa srebrom uzrokovali su promjenu u ekspresiji proteina iz obitelji signalnih proteina 14-3-3. Ekspresija proteina *14-3-3 like protein C* bila je smanjena nakon sva tri tipa tretmana, a moguće objašnjenje je inhibicija procesa vezanih uz rast i razvoj u svrhu očuvanja energije.

Dodatak cisteina tretmanima sa srebrom u korijenu umanjio je promjene u ekspresiji za 29% proteina u kombiniranom tretmanu s AgNP-PVP, izjednačivši razinu ekspresije s onom zabilježenom u kontroli. Takav učinak cisteina zabilježen je za 52% proteina u kombiniranom tretmanu s AgNP-CTAB i 48% proteina u kombiniranom tretmanu s AgNO₃. Navedeni rezultati u skladu su sa manjom stabilnosti AgNP-CTAB u odnosu na AgNP-PVP, zbog čega se može zaključiti da AgNP-PVP sporije disociraju, stoga je manji broj otpuštenih iona Ag⁺ koje cistein može vezati. U listu je dodatak cisteina izjednačio razinu ekspresije s onom zabilježenom u kontroli za 38% proteina u kombiniranom tretmanu s AgNP-PVP, 36% u kombiniranom tretmanu s AgNP-CTAB te 11% proteina u kombiniranom tretmanu s AgNO₃. Zanimljivo je da je u listu dodatak cisteina kod oba tipa AgNP imao vrlo sličan ublažavajući učinak na promjene u ekspresiji proteina, dok je cistein najslabiji učinak pokazao na tretman s AgNO₃, što je u skladu s jačom inhibicijom akumulacije srebra u kombiniranim tretmanima AgNO₃ s cisteinom u odnosu na kombinirane tretmane AgNP s cisteinom.

Tkivno-specifičan odgovor biljaka na izloženost AgNP do sada je vrlo malo istražen, iako generalni zaključci dosadašnjih istraživanja govore o različitoj regulaciji ekspresije proteina u korijenu u odnosu na list, što ukazuje na različite mehanizme detoksifikacije metala (Tkalec i

sur. 2019). U mom istraživanju, zabilježene su razlike u zastupljenosti funkcionalnih skupina diferencijalno eksprimiranih proteina između korijena i lista, ali osim toga i među različitim tipovima tretmana sa srebrom unutar jednog tipa tkiva, što ukazuje na to da je promjena u ekspresiji ne samo tkivno-specifična, nego i da ovisi o tipu omotača korištenog u stabilizaciji AgNP, ali i o obliku tretmana sa srebrom (NP u odnosu na ione Ag^+). Istaknula bih kako je u korijenu nakon sva tri tipa tretmana najveći broj diferencijalno eksprimiranih proteina bio uključen u odgovor na stres, dok je u listu najviše proteina s promijenjenom ekspresijom bilo uključeno u procese fotosinteze. Budući da je list metabolički aktivniji organ, ne začuđuje da je najveći broj proteina s diferencijalnom ekspresijom bio uključen u procese dobivanja energije, dok je u korijenu, koji je u direktnom kontaktu s tretmanom, bilo pogođeno više proteina uključenih u obrambeni odgovor na stres. Zajedničko za oba tkiva je da su tretmani sa srebrom uvelike utjecali na ekspresiju proteina uključenih u procese transkripcije i translacije.

ZAKLJUČAK

6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata ovog istraživanja moguće je donijeti sljedeće zaključke:

- Zbog kompleksnih interkonverzija različitih oblika srebra u okolišu bogatom ionima teško je donijeti jednoznačne zaključke o biodostupnosti i mehanizmima unosa različitih oblika srebra. Dodatkom u podlogu $\frac{1}{2}$ MS stabilnost oba tipa AgNP se smanjila što se očitivalo kroz aglomeraciju i disocijaciju na ione Ag^+ , ali je bilo izraženije za čestice AgNP-CTAB. Dodatkom otopine AgNO_3 u istu podlogu došlo je do stvaranja AgNP koje su bile relativno stabilne prvih 48 sati. Dodatak cisteina ubrzao je destabilizaciju oba tipa AgNP, a u otopini s AgNO_3 rezultirao je pojavom apsorpcijskog maksimuma koji bi mogao odgovarati kompleksu Ag-cistein.
- Svi tretmani doveli su do akumulacije srebra, koja je u korijenu bila veća u odnosu na list pri istim koncentracijama, a bila je izraženija nakon tretmana s oba tipa AgNP u odnosu na tretmane s AgNO_3 . Dodatak cisteina smanjio je sadržaj srebra u tkivima u odnosu na odgovarajuće tretmane bez cisteina, a učinak je bio izraženiji kod tretmana s AgNO_3 .
- Oba tipa AgNP lokalizirana su u stanicama korijena, dok u stanicama lista nisu pronađene. To pokazuje da AgNP u većoj mjeri ostaju akumulirane u korijenu.
- Ni u korijenu ni u listu nije zabilježeno značajnije povećanje razine ROS i oštećenje biomolekula, ali je u oba organa zabilježena mobilizacija antioksidacijskog sustava, koja je, u skladu s većom akumulacijom srebra, bila izraženija nakon tretmana s oba tipa AgNP u odnosu na AgNO_3 . Jači antioksidacijski odgovor zabilježen je u listu u odnosu na korijen, a aktivacija određenih komponenti antioksidacijskog sustava bila je specifična za biljni organ. Naime, u korijenu je bila izraženija aktivacija enzimskih antioksidansa, dok je u listu zabilježen porast sadržaja neenzimskih antioksidansa. Tip omotača također je imao utjecaj na aktivaciju specifičnih komponenti antioksidacijskog sustava. Aktivnost enzima SOD i sadržaj prolina bili su povećani nakon tretmana s AgNP-PVP, dok su tretmani s AgNP-CTAB izazvali pojačanu aktivaciju enzima CAT i PPX i povećanje sadržaja reduciranog GSH.
- Kratkotrajni tretmani pokazali su da 24 sata nakon izlaganja korijena i lista svim istraživanim oblicima srebra dolazi do pojave oksidacijskog stresa i povećanog odumiranja stanica, pri čemu je AgNP-CTAB pokazao najveću toksičnost.

- Svi tretmani izazvali su promjene u procesu fotosinteze, što se očitovalo smanjenjem fotosintetske učinkovitosti i koncentracije fotosintetskih pigmenata, te promjenom ultrastrukture kloroplasta. Izraženiji negativni učinak inducivali su tretmani s oba tipa AgNP u odnosu na iste koncentracije AgNO₃, što je u skladu s većom akumulacijom srebra nakon tretmana s nanočesticama. Jači učinak AgNP-CTAB u odnosu na AgNP-PVP može se pripisati intrinzičnim svojstvima pozitivno nabijenog omotača CTAB.
- Svi tretmani rezultirali su promjenama u ekspresiji ukupnih topivih proteina u korijenu i listu duhana, pri čemu je u korijenu najveći broj diferencijalno eksprimiranih proteina zabilježen nakon tretmana s AgNP-CTAB, a u listu nakon tretmana s AgNO₃. Najveći broj proteina s promijenjenom ekspresijom u korijenu bili su proteini uključeni u odgovor na stres, dok je u listu najjači učinak zabilježen za proteine uključene u procese fotosinteze. U oba organa podjednak odgovor na tretmane sa svim istraživanim oblicima srebra pokazali su proteini uključeni u procese transkripcije i translacije.
- Većina negativnih učinaka tretmana sa svim oblicima srebra barem je djelomično ublažena dodatkom cisteina. Ublažavanje toksičnih učinaka cisteinom u tretmanima s AgNP pokazuje da fitotoksičnost nanočestica barem djelomično potječe od disociranih iona Ag⁺. Međutim, ona je uvjetovana i intrinzičnim karakteristikama AgNP, što objašnjava veću toksičnost oba tipa AgNP u odnosu na AgNO₃. Veća toksičnost čestica AgNP-CTAB u usporedbi s AgNP-PVP pokazuje da fizikalno-kemijska svojstva primijenjenog omotača također moduliraju toksične učinke, posebice razlike u aktivaciji specifičnih fizioloških i proteomskih odgovora.

POPIS LITERATURE

7. POPIS LITERATURE

- Abbas, Q., Liu, G., Yousaf, B., Ali, M.U., Ullah, H., Ahmed, R., 2019. Effects of biochar on uptake, acquisition and translocation of silver nanoparticles in rice (*Oryza sativa* L.) in relation to growth, photosynthetic traits and nutrients displacement. *Environ. Pollut.* 250, 728–736. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.083>
- Abdelgawad, H., Zinta, G., Hamed, B.A., Selim, S., Beemster, G., Hozzein, W.N., Wadaan, M.A.M., Asard, H., Abuelsoud, W., 2020. Maize roots and shoots show distinct profiles of oxidative stress and antioxidant defense under heavy metal toxicity. *Environ. Pollut.* 258, 113705–113750. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113705>
- Aebersold, R., Mann, M., 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198–207. <https://doi.org/10.1038/nature01511>
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro, u: *Methods in enzymology*. Academic Press Inc., Cambridge, SAD, str. 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Agati, G., Azzarello, E., Pollastri, S., Tattini, M., 2012. Flavonoids as antioxidants in plants: location and functional significance. *Plant Sci.* 196, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2012.07.014>
- Akter, S., Khan, M.S., Smith, E.N., Flashman, E., 2021. Measuring ROS and redox markers in plant cells. *RSC Chem. Biol.* 2, 1384–1401. <https://doi.org/10.1039/D1CB00071C>
- Albalawi, F., Hussein, M.Z., Fakurazi, S., Masarudin, M.J., 2021. Engineered nanomaterials: The challenges and opportunities for nanomedicines. *Int. J. Nanomedicine* 16, 161–184. <https://doi.org/10.2147/IJN.S288236>
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, E., 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell Environ.* 24, 1337–1344. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00778.x>
- Almutairi, Z., Alharbi, A., 2015. Effect of silver nanoparticles on seed germination of crop plants. *J. Adv. Agric.* 4, 280–285. <https://doi.org/10.24297/jaa.v4i1.4295>
- Alqudami, A., Annapoorni, S., 2007. Fluorescence from metallic silver and iron nanoparticles prepared by exploding wire technique. *Plasmonics* 2, 5–13. <https://doi.org/10.1007/s11468-006-9019-2>
- Alscher, R.G., 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53, 1331–1341. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1331>
- An, J., Zhang, M., Wang, S., Tang, J., 2008. Physical, chemical and microbiological changes in stored green asparagus spears as affected by coating of silver nanoparticles-PVP. *LWT* 41, 1100–1107. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.06.019>
- An, Y.Q., McDowell, J.M., Huang, S., McKinney, E.C., Chambliss, S., Meagher, R.B., 1996. Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant J.* 10, 107–121. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10010107.x>

- Anand, R., Bhagat, M., 2019. Silver nanoparticles (AgNPs) as nanopesticides and nanofertilizers. *MOJ Biol. Med.* 4, 19–20. <https://doi.org/10.15406/mojbm.2019.04.00107>
- Angelini, J., Klassen, R., Široká, J., Novák, O., Záruba, K., Siegel, J., Novotná, Z., Valentová, O., 2022. Silver nanoparticles alter microtubule arrangement, dynamics and stress phytohormone levels. *Plants* 11, 313–329. <https://doi.org/10.3390/plants11030313>
- Antofie, M.M., Sava Sand, C., 2021. Drought stress study on *Nicotiana tabacum* L., “baladi”, an in vitro experimental model. *Agric.* 11, 845–861. <https://doi.org/10.3390/agriculture11090845>
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- Arora, A., Sairam, R.K., Srivastava, G.C., 2002. Oxidative stress and antioxidative system in plants *Curr. Sci.* 82, 1227–1238.
- Asai, S., Ohta, K., Yoshioka, H., 2008. MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 20, 1390–1406. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055855>
- Avkin, S., Livneh, Z., 2002. Efficiency, specificity and DNA polymerase-dependence of translesion replication across the oxidative DNA lesion 8-oxoguanine in human cells. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 510, 81–90. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00254-3](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00254-3)
- Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, S., 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014, 1–31. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
- Bagherzadeh Homaei, M., Ehsanpour, A.A., 2016. Silver nanoparticles and silver ions: oxidative stress responses and toxicity in potato (*Solanum tuberosum* L) grown in vitro. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 57, 544–553. <https://doi.org/10.1007/s13580-016-0083-z>
- Balen, B., Pavoković, D., Peharec Štefanić, P., Krsnik-Rasol, M., 2011. Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. Sveučilišni priručnik: Hrvatska sveučilišna naknada, Zagreb.
- Bamdad, F., Khorram, F., Samet, M., Bamdad, K., Sangi, M.R., Allahbakhshi, F., 2016. Spectrophotometric determination of L-cysteine by using polyvinylpyrrolidone-stabilized silver nanoparticles in the presence of barium ions. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 161, 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.02.030>
- Bao, D., Oh, Z.G., Chen, Z., 2016. Characterization of silver nanoparticles internalized by Arabidopsis plants using single particle ICP-MS analysis. *Front. Plant Sci.* 7, 32–41. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00032>
- Barbasz, A., Kreczmer, B., Oćwieja, M., 2018. How the surface properties affect the nanocytotoxicity of silver? Study of the influence of three types of nanosilver on two wheat varieties. *Acta Physiol. Plant.* 40, 31–98. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2613-z>
- Barbasz, A., Kreczmer, B., Oćwieja, M., 2016. Effects of exposure of callus cells of two wheat varieties to silver nanoparticles and silver salt (AgNO₃). *Acta Physiol. Plant.* 38, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2092-z>

- Barhoum, A., García-Betancourt, M.L., Jeevanandam, J., Hussien, E.A., Mekkawy, S.A., Mostafa, M., Omran, M.M., Abdalla, M.S., Bechelany, M., 2022. Review on Natural, incidental, bioinspired, and engineered nanomaterials: history, definitions, classifications, synthesis, properties, market, toxicities, risks, and regulations. *Nanomaterials* 12, 177–225. <https://doi.org/10.3390/nano12020177>
- Barrena, R., Casals, E., Colón, J., Font, X., Sánchez, A., Puentes, V., 2009. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere* 75, 850–857. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.01.078>
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* 39, 205–207.
- Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.* 44, 276–287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
- Beer, C., Foldbjerg, R., Hayashi, Y., Sutherland, D.S., Autrup, H., 2012. Toxicity of silver nanoparticles—nanoparticle or silver ion? *Toxicol. Lett.* 208, 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.11.002>
- Behra, R., Sigg, L., Clift, M.J.D., Herzog, F., Minghetti, M., Johnston, B., Petri-Fink, A., Rothen-Rutishauser, B., 2013. Bioavailability of silver nanoparticles and ions: from a chemical and biochemical perspective. *J. R. Soc. Interface* 10, 1–15. <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0396>
- Bello-Bello, J.J., Chavez-Santoscoy, R.A., Lecona-Guzmán, C.A., Bogdanchikova, N., Salinas-Ruíz, J., Gómez-Merino, F.C., Pestryakov, A., 2017. Hormetic Response by silver nanoparticles on in vitro multiplication of sugarcane (*Saccharum spp.* Cv. Mex 69-290) using a temporary immersion system. *Dose-Response* 15, 1–9. <https://doi.org/10.1177/1559325817744945>
- Besagni, C., Kessler, F., 2013. A mechanism implicating plastoglobules in thylakoid disassembly during senescence and nitrogen starvation. *Planta* 237, 463–470. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1813-9>
- Biba, R., Cvjetko, P., Tkalec, M., Košpić, K., Štefanić, P.P., Šikić, S., Domijan, A.-M., Balen, B., 2022a. Effects of silver nanoparticles on physiological and proteomic responses of tobacco (*Nicotiana tabacum*) seedlings are coating-dependent. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 15923–15953. <https://doi.org/10.3390/ijms232415923>
- Biba, R., Košpić, K., Komazec, B., Markulin, D., Cvjetko, P., Pavoković, D., Štefanić, P.P., Tkalec, M., Balen, B., 2022b. Surface coating-modulated phytotoxic responses of silver nanoparticles in plants and freshwater green algae. *Nanomaterials* 12, 24–53. <https://doi.org/10.3390/nano12010024>
- Biba, R., Matić, D., Lyons, D.M., Štefanić, P.P., Cvjetko, P., Tkalec, M., Pavoković, D., Letofsky-Papst, I., Balen, B., 2020. Coating-dependent effects of silver nanoparticles on tobacco seed germination and early growth. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 3441–3460. <https://doi.org/10.3390/ijms21103441>
- Biba, R., Peharec Štefanić, P., Cvjetko, P., Tkalec, M., Balen, B., 2021a. Silver nanoparticles phytotoxicity mechanisms, u: Silver nanomaterials for agri-food applications. Kamel, A.A.-E., (ur.) Elsevier, Amsterdam, Nizozemska, str. 317–356., <https://doi.org/10.1016/j.optmat.2011.11.002>

- Biba, R., Tkalec, M., Cvjetko, P., Peharec Štefanić, P., Šikić, S., Pavoković, D., Balen, B., 2021b. Silver nanoparticles affect germination and photosynthesis in tobacco seedlings. *Acta Bot. Croat.* 80, 1–11. <https://doi.org/10.37427/botcro-2020-029>
- Blaser, S.A., Scheringer, M., MacLeod, M., Hungerbühler, K., 2008. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: contribution of nano-functionalized plastics and textiles. *Sci. Total Environ.* 390, 396–409. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.10.010>
- Blum, H., Beier, H., Gross, H.J., 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93–99.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.cj.2017.04.003>
- Bréhélin, C., Kessler, F., 2008. The plastoglobule: a bag full of lipid biochemistry tricks. *Photochem. Photobiol.* 84, 1388–1394. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00459.x>
- Bruna, T., Maldonado-Bravo, F., Jara, P., Caro, N., 2021. Silver nanoparticles and their antibacterial applications. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 7202–7223. <https://doi.org/10.3390/ijms22137202>
- Buttgereit, F., Brandt, M.D., 1995. A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells, *Biochem. J.* 312, 163–167. doi:10.1042/bj3120163
- Camejo, D., Romero-Puertas, M. del C., Rodríguez-Serrano, M., Sandalio, L.M., Lázaro, J.J., Jiménez, A., Sevilla, F., 2013. Salinity-induced changes in S-nitrosylation of pea mitochondrial proteins. *J. Proteomics* 79, 87–99. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.12.003>
- Camoni, L., Visconti, S., Aducci, P., Marra, M., 2018. 14-3-3 Proteins in plant hormone signaling: doing several things at once. *Front. Plant Sci.* 9, 297–305. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00297>
- Cañamares, M. V., Garcia-Ramos, J. V., Sanchez-Cortes, S., Castillejo, M., Oujja, M., 2008. Comparative SERS effectiveness of silver nanoparticles prepared by different methods: a study of the enhancement factor and the interfacial properties. *J. Colloid Interface Sci.* 326, 103–109. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2008.06.052>
- Capjak, I., Zebić Avdičević, M., Sikirić, M.D., Domazet Jurašin, D., Hozić, A., Pajić, D., Dobrović, S., Goessler, W., Vinković Vrček, I., 2018. Behavior of silver nanoparticles in wastewater: systematic investigation on the combined effects of surfactants and electrolytes in model systems. *Environ. Sci. Water Res. Technol.* 4, 2146–2159. <https://doi.org/10.1039/c8ew00317c>
- Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R., 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem. Toxicol.* 51, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- Chakavarti, B., Chakavarti, D., 2008. Electrophoretic separation of proteins. *J. Vis. Exp.* 16, 758. <https://doi.org/10.3791/758>
- Chen, X., Schluesener, H.J., 2008. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol. Lett.* 176, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.10.004>

- Chen, Y., Wu, N., Mao, H., Zhou, J., Su, Y., Zhang, Z., Zhang, H., Yuan, S., 2019. Different toxicities of nanoscale titanium dioxide particles in the roots and leaves of wheat seedlings. *RSC Adv.* 9, 19243–19252. <https://doi.org/10.1039/C9RA02984B>
- Chen, Z., Xu, J., Wang, F., Wang, L., Xu, Z., 2019. Morpho-physiological and proteomic responses to water stress in two contrasting tobacco varieties. *Sci. Rep.* 9, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54995-1>
- Colombo, G., Clerici, M., Garavaglia, M.E., Giustarini, D., Rossi, R., Milzani, A., Dalle-Donne, I., 2016. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *J. Chromatogr. B.* 1019, 178–190. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.11.052>
- Concenço, G., Galon, L., 2011. Plasmodesmata: symplastic transport of herbicides within the plant. *Planta Daninha*, 25, 423–432. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582007000200024>
- Couto, N., Wood, J., Barber, J., 2016. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic. Biol. Med.* 95, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028>
- Covian, R., Chess, D., Balaban, R.S., 2012. Continuous monitoring of enzymatic activity within native electrophoresis gels: application to mitochondrial oxidative phosphorylation complexes. *Anal. Biochem.* 431, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.08.023>
- Cvjetko, P., Milošić, A., Domijan, A.M., Vinković Vrček, I., Tolić, S., Peharec Štefanić, P., Letofsky-Papst, I., Tkalec, M., Balen, B., 2017. Toxicity of silver ions and differently coated silver nanoparticles in *Allium cepa* roots. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 137, 18–28. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.11.009>
- Cvjetko, P., Zovko, M., Štefanić, P.P., Biba, R., Tkalec, M., Domijan, A.M., Vrček, I.V., Letofsky-Papst, I., Šikić, S., Balen, B., 2018. Phytotoxic effects of silver nanoparticles in tobacco plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 5590–5602. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0928-8>
- Das, P., Barua, S., Sarkar, S., Chatterjee, S.K., Mukherjee, S., Goswami, L., Das, S., Bhattacharya, S., Karak, N., Bhattacharya, S.S., 2018. Mechanism of toxicity and transformation of silver nanoparticles: inclusive assessment in earthworm-microbe-soil-plant system. *Geoderma* 314, 73–84. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2017.11.008>
- Datta, R., Heaster, T.M., Sharick, J.T., Gillette, A.A., Skala, M.C., 2020. Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications. *J. Biomed. Opt.* 25, 1–44. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.25.7.071203>
- De Leersnyder, I., De Gelder, L., Van Driessche, I., Vermeir, P., 2019. Revealing the Importance of aging, environment, size and stabilization mechanisms on the stability of metal nanoparticles: a case study for silver nanoparticles in a minimally defined and complex undefined bacterial growth medium. *Nanomaterials* 9, 1684–1704. <https://doi.org/10.3390/nano9121684>
- de Pinto, M.C., De Gara, L., 2004. Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *J. Exp. Bot.* 55, 2559–2569. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh253>

- Deeba, F., Pandey, A.K., Ranjan, S., Mishra, A., Singh, R., Sharma, Y.K., Shirke, P.A., Pandey, V., 2012. Physiological and proteomic responses of cotton (*Gossypium herbaceum* L.) to drought stress. *Plant Physiol. Biochem.* 53, 6–18. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.01.002>
- Demidchik, V., Straltsova, D., Medvedev, S.S., Pozhvanov, G.A., Sokolik, A., Yurin, V., 2014. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *J. Exp. Bot.* 65, 1259–1270. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru004>
- Dengler, W.A., Schulte, J., Berger, D.P., Mertelsmann, R., Fiebig, H.H., 1995. Development of a propidium iodide fluorescence assay for proliferation and cytotoxicity assays. *Anticancer. Drugs* 6, 522–532. <https://doi.org/10.1097/00001813-199508000-00005>
- Dewez, D., Goltsev, V., Kalaji, H.M., Oukarroum, A., 2018. Inhibitory effects of silver nanoparticles on photosystem II performance in *Lemna gibba* probed by chlorophyll fluorescence. *Curr. Plant Biol.* 16, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.cpb.2018.11.006>
- Dewez, D., Oukarroum, A., 2012. Silver nanoparticles toxicity effect on photosystem II photochemistry of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* treated in light and dark conditions. *Toxicol. Environ. Chem.* 94, 1536–1546. <https://doi.org/10.1080/02772248.2012.712124>
- Dietz, K.J., Herth, S., 2011. Plant nanotoxicology. *Trends Plant Sci.* 16, 582–589. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.08.003>
- Dimkpa, C.O., McLean, J.E., Martineau, N., Britt, D.W., Haverkamp, R., Anderson, A.J., 2013. Silver nanoparticles disrupt wheat (*Triticum aestivum* L.) growth in a sand matrix. *Environ. Sci. Technol.* 47, 1082–1090. <https://doi.org/10.1021/es302973y>
- Dixon, D.P., Edwards, R., 2010. Glutathione transferases, u: *The Arabidopsis book*. Tori, K., (ur.) American Society of Plant Biologists, Rockville, SAD, str. 1–15. <https://doi.org/10.1199/tab.0131>
- Dobrucka, R., Szymanski, M., Przekop, R., 2019. The study of toxicity effects of biosynthesized silver nanoparticles using *Veronica officinalis* extract. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 16, 8517–8526. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02441-0>
- dos Santos, C., Franco, O.L., 2023. Pathogenesis-related proteins (PRs) with enzyme activity activating plant defense responses. *Plants* 12, 1–13. <https://doi.org/10.3390/plants12112226>
- Eka Putri, G., Rahayu Gusti, F., Novita Sary, A., Zainul, R., 2019. Synthesis of silver nanoparticles used chemical reduction method by glucose as reducing agent. *J. Phys. Conf. Ser.* 1317, 1–9. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1317/1/012027>
- El Badawy, A.M., Silva, R.G., Morris, B., Scheckel, K.G., Suidan, M.T., Tolaymat, T.M., 2011. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 45, 283–287. <https://doi.org/10.1021/es1034188>
- Elias, R.J., McClements, D.J., Decker, E.A., 2005. Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase β -lactoglobulin in oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.* 53, 10248–10253. <https://doi.org/10.1021/jf0521698>
- Ellman, G.L., 1959. Tissue sulphydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70–77.

- Emamverdian, A., Ding, Y., Mokhberdoran, F., Xie, Y., 2015. Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *Sci. World J.* 2015, 7–9. <https://doi.org/10.1155/2015/756120>
- Eugeni Piller, L., Abraham, M., Dormann, P., Kessler, F., Besagni, C., 2012. Plastid lipid droplets at the crossroads of prenylquinone metabolism. *J. Exp. Bot.* 63, 1609–1618. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers016>
- Falco, W.F., Scherer, M.D., Oliveira, S.L., Wender, H., Colbeck, I., Lawson, T., Caires, A.R.L., 2020. Phytotoxicity of silver nanoparticles on *Vicia faba*: evaluation of particle size effects on photosynthetic performance and leaf gas exchange. *Sci. Total Environ.* 701, 134816–134872. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134816>
- Faurobert, M., Pelpoir, E., Chaïb, J., 2007. Phenol extraction of proteins for proteomic studies of recalcitrant plant tissues, u: Plant proteomics. Thiellement, H., (ur.) Humana Press, New Jersey, SAD, str. 9–14. <https://doi.org/10.1385/1-59745-227-0:9>
- Fayez, K.A., El-Deeb, B.A., Mostafa, N.Y., 2017. Toxicity of biosynthetic silver nanoparticles on the growth, cell ultrastructure and physiological activities of barley plant. *Acta Physiol. Plant.* 39, 155–168. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2452-3>
- Ferdous, Z., Nemmar, A., 2020. Health impact of silver nanoparticles: a review of the biodistribution and toxicity following various routes of exposure. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 2375–2406. <https://doi.org/10.3390/ijms21072375>
- Fernández-Checa, J., Kaplowitz, N., 1990. The use of monochlorobimane to determine hepatic GSH levels and synthesis. *Anal. Biochem.* 190, 212–219. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(90\)90183-A](https://doi.org/10.1016/0003-2697(90)90183-A)
- Fernando, I., Zhou, Y., 2019. Impact of pH on the stability, dissolution and aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Chemosphere* 216, 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.122>
- Fissan, H., Ristig, S., Kaminski, H., Asbach, C., Epple, M., 2014. Comparison of different characterization methods for nanoparticle dispersions before and after aerosolization. *Anal. Methods* 6, 7324–7334. <https://doi.org/10.1039/C4AY01203H>
- Flora, S.J.S., 2009. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2, 191–206. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.4.9112>
- Flores-López, L.Z., Espinoza-Gómez, H., Somanathan, R., 2019. Silver nanoparticles: electron transfer, reactive oxygen species, oxidative stress, beneficial and toxicological effects. Mini review. *J. Appl. Toxicol.* 39, 16–26. <https://doi.org/10.1002/jat.3654>
- Frugoli, J.A., Zhong, H.H., Nuccio, M.L., McCourt, P., McPeck, M.A., Thomas, T.L., McClung, C.R., 1996. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* 112, 327–336. <https://doi.org/10.1104/pp.112.1.327>
- Galazzi, R.M., Lopes Júnior, C.A., de Lima, T.B., Gozzo, F.C., Arruda, M.A.Z., 2019. Evaluation of some effects on plant metabolism through proteins and enzymes in transgenic and non-transgenic soybeans after cultivation with silver nanoparticles. *J. Proteomics* 191, 88–106. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.03.024>

- Ganapathi, T.R., Suprasanna, P., Rao, P.S., Bapat, V.A., 2004. Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)-a model system for tissue culture interventions and genetic engineering, *Indian J. Biotechnol.* 3, 171–184.
- Geisler-Lee, J., Brooks, M., Gerfen, J., Wang, Q., Fotis, C., Sparer, A., Ma, X., Berg, R., Geisler, M., 2014. Reproductive toxicity and life history study of silver nanoparticle effect, uptake and transport in *Arabidopsis thaliana*. *Nanomaterials* 4, 301–318. <https://doi.org/10.3390/nano4020301>
- Geisler-Lee, J., Wang, Q., Yao, Y., Zhang, W., Geisler, M., Li, K., Huang, Y., Chen, Y., Kolmakov, A., Ma, X., 2013. Phytotoxicity, accumulation and transport of silver nanoparticles by *Arabidopsis thaliana*. *Nanotoxicology* 7, 323–337. <https://doi.org/10.3109/17435390.2012.658094>
- Gherasim, O., Puiu, R.A., Bîrca, A.C., Burduşel, A.C., Grumezescu, A.M., 2020. An updated review on silver nanoparticles in biomedicine, *Nanomaterials* 10. 1–44 <https://doi.org/10.3390/nano10112318>
- Ghosh, M., J, M., Sinha, S., Chakraborty, A., Mallick, S.K., Bandyopadhyay, M., Mukherjee, A., 2012. In vitro and in vivo genotoxicity of silver nanoparticles. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 749, 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.08.007>
- Gichner, T., Patková, Z., Száková, J., Demnerová, K., 2004. Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 559, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.12.008>
- Gill, S.S., Anjum, N.A., Hasanuzzaman, M., Gill, R., Trivedi, D.K., Ahmad, I., Pereira, E., Tuteja, N., 2013. Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiol. Biochem.* 70, 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.05.032>
- Gondikas, A.P., Morris, A., Reinsch, B.C., Marinakos, S.M., Lowry, G. V., Hsu-Kim, H., 2012. Cysteine-induced modifications of zero-valent silver nanomaterials: implications for particle surface chemistry, aggregation, dissolution, and silver speciation. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7037–7045. <https://doi.org/10.1021/es3001757>
- Goodwin, T.W., Mercer, E.I., 1983. Introduction to plant biochemistry, Dixon, R., (ur.) Pergamon Press, Oxford, str. 1–677.
- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R.W., Nowack, B., 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environ. Sci. Technol.* 43, 9216–9222. <https://doi.org/10.1021/es9015553>
- Guo, Y., Cichocki, N., Schattenberg, F., Geffers, R., Harms, H., Müller, S., 2019. AgNPs change microbial community structures of wastewater. *Front. Microbiol.* 10, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03211>
- Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol.* 141, 312–322. <https://doi.org/10.1104/pp.106.077073>
- Halliwell, B., Chirico, S., 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am. J. Clin. Nutr.* 57, 715S-725S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/57.5.715S>

- Harvey, K.L., Jarocki, V.M., Charles, I.G., Djordjevic, S.P., 2019. The diverse functional roles of elongation factor tu (Ef-Tu) in microbial pathogenesis. *Front. Microbiol.* 10, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02351>
- Hatami, M., Ghorbanpour, M., 2013. Effect of nanosilver on physiological performance of pelargonium plants exposed to dark storage. *J. Hortic. Res.* 21, 15–20. <https://doi.org/10.2478/johr-2013-0003>
- Havaux, M., 2014. Carotenoid oxidation products as stress signals in plants. *Plant J.* 79, 597–606. <https://doi.org/10.1111/tpj.12386>
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M.N., Wani, A.S., Pichtel, J., Ahmad, A., 2012. Role of proline under changing environments. *Plant Signal. Behav.* 7, 1456–1466. <https://doi.org/10.4161/psb.21949>
- Hayyan, M., Hashim, M.A., AlNashef, I.M., 2016. Superoxide ion: generation and chemical implications. *Chem. Rev.* 116, 3029–3085. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00407>
- Hazeem, L.J., Kuku, G., Dewailly, E., Slomianny, C., Barras, A., Hamdi, A., Boukherroub, R., Culha, M., Bououdina, M., 2019. Toxicity effect of silver nanoparticles on photosynthetic pigment content, growth, ROS production and ultrastructural changes of microalgae *Chlorella vulgaris*. *Nanomaterials* 9, 914–927. <https://doi.org/10.3390/nano9070914>
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 125, 189–198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1)
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil u : The water-culture method for growing plants without soil. The College of Agriculture, Berkley, USA, str. 29–31.
- Hossain, Z., Mustafa, G., Komatsu, S., 2015. Plant responses to nanoparticle stress. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 26644–26653. <https://doi.org/10.3390/ijms161125980>
- Hunt, P.J., Taube, H., 1952. The photochemical decomposition of hydrogen peroxide. quantum yields, tracer and fractionation effects. *J. Phys. Chem.* 74, 5999–6003. <https://doi.org/10.1021/j150150a005>
- Hutner, S.H., Provasoli, L., Schnatz, A., Haskins, C.P., 1950. Some approaches to the study of the role of metals in the metabolism of microorganisms. *Proc. Am. Philos. Soc.* 94, 152–170.
- Ighodaro, O.M., Akinloye, O.A., 2018. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J. Med.* 54, 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
- Jalmi, S.K., Bhagat, P.K., Verma, D., Noryang, S., Tayyeba, S., Singh, K., Sharma, D., Sinha, A.K., 2018. Traversing the links between heavy metal stress and plant signaling. *Front. Plant Sci.* 9, 1–21. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00012>
- Janku, M., Luhová, L., Petrivalský, M., 2019. On the origin and fate of reactive oxygen species in plant cell compartments. *Antioxidants* 8, 269–273. <https://doi.org/doi:10.3390/antiox8040105>

- Jansson, H., Hansson, Ö., 2008. Competitive inhibition of electron donation to photosystem 1 by metal-substituted plastocyanin. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1777, 1116–1121. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.03.032>
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y.S., Dufresne, A., Danquah, M.K., 2018. Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations. *Beilstein J. Nanotechnol.* 9, 1050–1074. <https://doi.org/10.3762/bjnano.9.98>
- Jhanzab, H., Razzaq, A., Bibi, Y., Yasmeen, F., Yamaguchi, H., Hitachi, K., Tsuchida, K., Komatsu, S., 2019. Proteomic analysis of the effect of inorganic and organic chemicals on silver nanoparticles in wheat. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 825. <https://doi.org/10.3390/ijms20040825>
- Jiang, H.-S., Li, M., Chang, F.-Y., Li, W., Yin, L.-Y., 2012. Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO₃ toxicity to *Spirodela polyrhiza*. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 1880–1886. <https://doi.org/10.1002/etc.1899>
- Jiang, H.-S., Qiu, X.-N., Li, G.-B., Li, W., Yin, L.-Y., 2014. Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *Spirodela polyrhiza*. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 1398–1405. <https://doi.org/10.1002/etc.2577>
- Jiang, H.S., Yin, L.Y., Ren, N.N., Zhao, S.T., Li, Z., Zhi, Y., Shao, H., Li, W., Gontero, B., 2017. Silver nanoparticles induced reactive oxygen species via photosynthetic energy transport imbalance in an aquatic plant. *Nanotoxicology* 11, 157–167. <https://doi.org/10.1080/17435390.2017.1278802>
- Jin, X., Zhang, Y., Alharbi, A., Hanbashi, A., Alhoshani, A., Parrington, J., 2020. Targeting two-pore channels: current progress and future challenges. *Trends Pharmacol. Sci.* 41, 582–594. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.06.002>
- Kalkidan Mamo, W., Fufa Abunna, K., Yonas Tolosa, R., 2021. A review on nanotechnology and its application in modern veterinary science. *Int. J. Nanomater. Nanotechnol. Nanomedicine* 7, 26–31. <https://doi.org/10.17352/2455-3492.000041>
- Karas, M., Hillenkamp, F., 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons. *Anal. Chem.* 60, 2299–2301.
- Karimi, J., Mohsenzadeh, S., 2017. Physiological effects of silver nanoparticles and silver nitrate toxicity in *Triticum aestivum*. *Iran. J. Sci. Technol. Trans. A Sci.* 41, 111–120. <https://doi.org/10.1007/s40995-017-0200-6>
- Karoui, H., Hogg, N., FréJaville, C., Tordo, P., Kalyanaraman, B., 1996. Characterization of sulfur-centered radical intermediates formed during the oxidation of thiols and sulfite by peroxynitrite. *J. Biol. Chem.* 271, 6000–6009.
- Kaur, Harmanpreet, Kaur, Harvinderjeet, Sharma, A., 2021. Study of SPR peak shifting of silver nanoparticles with change in surrounding medium. *Mater. Today Proc.* 37, 3574–3576. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.09.584>
- Kaveh, R., Li, Y.-S., Ranjbar, S., Tehrani, R., Brueck, C.L., Van Aken, B., 2013. Changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression in response to silver nanoparticles and silver ions. *Environ. Sci. Technol.* 47, 10637–10644. <https://doi.org/10.1021/es402209w>

- Ke, M., Qu, Q., Peijnenburg, W.J.G.M., Li, X., Zhang, M., Zhang, Z., Lu, T., Pan, X., Qian, H., 2018. Phytotoxic effects of silver nanoparticles and silver ions to *Arabidopsis thaliana* as revealed by analysis of molecular responses and of metabolic pathways. *Sci. Total Environ.* 644, 1070–1079. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.061>
- Kebede, A., Kebede, M., 2021. In silico analysis of promoter region and regulatory elements of glucan endo-1,3-beta-glucosidase encoding genes in *Solanum tuberosum*: cultivar DM 1-3 516 R44. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 19, 145–158. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00240-0>
- Khan, R., Ma, X., Shah, S., Wu, X., Shaheen, A., Xiao, L., Wu, Y., Wang, S., 2020. Drought-hardening improves drought tolerance in *Nicotiana tabacum* at physiological, biochemical, and molecular levels. *BMC Plant Biol.* 20, 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02688-7>
- Khanna, K., Kohli, S.K., Handa, N., Kaur, H., Ohri, P., Bhardwaj, R., Yousaf, B., Rinklebe, J., Ahmad, P., 2021. Enthraling the impact of engineered nanoparticles on soil microbiome: a concentric approach towards environmental risks and cogitation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 5, 1163-1180. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112459>
- Khromykh, N.O., Shupranova, L. V., Lykholat, Y. V., Bil'chuk, V.S., Fedenko, V.S., Boguslavs'ka, L. V., Borysova, O.I., 2015. Physiological and biochemical reactions of *Hordeum vulgare* seedlings to the action of silver nanoparticles. *Biosyst. Divers.* 23, 100–104. <https://doi.org/10.15421/011514>
- Klay, I., Pirrello, J., Riahi, L., Bernadac, A., Cherif, A., Bouzayen, M., Bouzid, S., 2014. Ethylene response factor Sl-ERF.B.3 is responsive to abiotic stresses and mediates salt and cold stress response regulation in tomato. *Sci. World J.* 2014, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/167681>
- Klughammer, C., Schreiber, U., 1994. An improved method, using saturating light pulses, for the determination of photosystem I quantum yield via P700⁺-absorbance changes at 830 nm. *Planta* 192, 261–268. <https://doi.org/10.1007/BF00194461>
- Koczur, K.M., Mourdikoudis, S., Polavarapu, L., Skrabalak, S.E., 2015. Polyvinylpyrrolidone (PVP) in nanoparticle synthesis. *Dalt. Trans.* 44, 17883–17905. <https://doi.org/10.1039/C5DT02964C>
- Kolahalam, L.A., Kasi Viswanath, I. V., Diwakar, B.S., Govindh, B., Reddy, V., Murthy, Y.L.N., 2019. Review on nanomaterials: synthesis and applications. *Mater. Today Proc.* 18, 2182–2190. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.07.371>
- Kosová, K., Vítámvás, P., Urban, M.O., Prášil, I.T., Renaut, J., 2018. Plant abiotic stress proteomics: the major factors determining alterations in cellular proteome. *Front. Plant Sci.* 9, 1–22. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00122>
- Kottapalli, K.R., Rakwal, R., Shibato, J., Burow, G., Tissue, D., Burke, J., Puppala, N., Burow, M., Payton, P., 2009. Physiology and proteomics of the water-deficit stress response in three contrasting peanut genotypes. *Plant, Cell Environ.* 32, 380–407. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2009.01933.x>
- Kováčik, J., Babula, P., 2017. Fluorescence microscopy as a tool for visualization of metal-induced oxidative stress in plants. *Acta Physiol. Plant.* 39, 157–164. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2455-0>

- Kozuleva, M.A., Ivanov, B.N., 2016. The mechanisms of oxygen reduction in the terminal reducing segment of the chloroplast photosynthetic electron transport chain. *Plant Cell Physiol.* 57, 1397–1404. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw035>
- Krause, G.H., Weis, E., 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bioi.* 42, 313–349. <https://doi.org/10.1002/9780470122563.ch3>
- Krishan, A., 1990. Rapid DNA Content analysis by the propidium iodide–hypotonic citrate method, u: *Methods in cell biology*. Academic Press Inc. Cambridge, SAD, str. 121–125. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60518-X](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60518-X)
- Krishnaraj, C., Jagan, E.G., Ramachandran, R., Abirami, S.M., Mohan, N., Kalaichelvan, P.T., 2012. Effect of biologically synthesized silver nanoparticles on *Bacopa monnieri* (Linn.) Wettst. plant growth metabolism. *Process Biochem.* 47, 651–658. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.006>
- Kumari, M., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N., 2009. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. *Sci. Total Environ.* 407, 5243–5246. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.06.024>
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lagalante, A.F., 2004. Atomic absorption spectroscopy: a tutorial review. *Appl. Spectrosc. Rev.* 34, 173–189. <https://doi.org/10.1081/asr-100100844>
- Larue, C., Castillo-Michel, H., Sobanska, S., Cécillon, L., Bureau, S., Barthès, V., Ouerdane, L., Carrière, M., Sarret, G., 2014. Foliar exposure of the crop *Lactuca sativa* to silver nanoparticles: evidence for internalization and changes in Ag speciation. *J. Hazard. Mater.* 264, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.10.053>
- Layet, C., Santaella, C., Auffan, M., Chevassus-Rosset, C., Montes, M., Levard, C., Ortet, P., Barakat, M., Doelsch, E., 2019. Phytoavailability of silver at predicted environmental concentrations: does the initial ionic or nanoparticulate form matter? *Environ. Sci. Nano* 6, 127–135. <https://doi.org/10.1039/C8EN00644J>
- Lea, M.C., 1889. On allotropic forms of silver. *Am. J. Sci.* 223, 476–492. <https://doi.org/10.2475/ajs.s3-38.223.47>
- Leclerc, S., Wilkinson, K.J., 2014. Bioaccumulation of nanosilver by *Chlamydomonas reinhardtii* - nanoparticle or the free ion? *Environ. Sci. Technol.* 48, 358–364. <https://doi.org/10.1021/es404037z>
- Lee, S., Pagoria, D., Raigrodski, A., Geurtsen, W., 2007. Effects of combinations of ROS scavengers on oxidative DNA damage caused by visible-light-activated camphorquinone/N,N-dimethyl-p-toluidine. *J. Biomed. Mater. Res.* 83, 391–399. <https://doi.org/10.1002/jbmb>
- Lee, S.H., Jun, B.H., 2019. Silver nanoparticles: synthesis and application for nanomedicine. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 865–889. <https://doi.org/10.3390/ijms20040865>
- Levard, C., Hotze, E.M., Lowry, G. V., Brown, G.E., 2012. Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environ. Sci. Technol.* 46, 6900–6914. <https://doi.org/10.1021/es2037405>

- Levard, C., Reinsch, B.C., Michel, F.M., Oumahi, C., Lowry, G. V., Brown, G.E., 2011. Sulfidation processes of PVP-coated silver nanoparticles in aqueous solution: impact on dissolution rate. *Environ. Sci. Technol.* 45, 5260–5266. <https://doi.org/10.1021/es2007758>
- Levine, A.S., Sun, L., Tan, R., Gao, Y., Yang, L., Chen, H., Teng, Y., Lan, L., 2017. The oxidative DNA damage response: a review of research undertaken with Tsinghua and Xiangya students at the University of Pittsburgh. *Sci. China Life Sci.* 60, 1077–1080. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9184-6>
- Levine, R.L., 2002. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 790–796. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00765-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00765-7)
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.P., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 233, 346–357. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9)
- Li, X., Ke, M., Zhang, M., Peijnenburg, W.J.G.M., Fan, X., Xu, J., Zhang, Z., Lu, T., Fu, Z., Qian, H., 2018. The interactive effects of diclofop-methyl and silver nanoparticles on *Arabidopsis thaliana*: growth, photosynthesis and antioxidant system. *Environ. Pollut.* 232, 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.034>
- Li, Y., Ge, K., Li, T., Run, C., Chen, Y., 2023. The engagement of histone lysine methyltransferases with nucleosomes: structural basis, regulatory mechanisms, and therapeutic implications. *Protein Cell* 14, 165–179. <https://doi.org/10.1093/procel/pwac032>
- Li, Y., Zhang, W., Niu, J., Chen, Y., 2013. Surface-coating-dependent dissolution, aggregation, and reactive oxygen species (ROS) generation of silver nanoparticles under different irradiation conditions. *Environ. Sci. Technol.* 47, 10293–10301. <https://doi.org/10.1021/es400945v>
- Liang, L., Tang, H., Deng, Z., Liu, Y., Chen, X., Wang, H., 2018. Ag nanoparticles inhibit the growth of the bryophyte, *Physcomitrella patens*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 164, 739–748. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.021>
- Liang, X., Zhang, L., Natarajan, S.K., Becker, D.F., 2013. Proline mechanisms of stress survival. *Antioxidants Redox Signal.* 19, 998–1011. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5074>
- Lindgren, A.L., 2014. The effects of silver nitrate and silver nanoparticles on *Chlamydomonas reinhardtii* : a proteomic approach. *Diplomski rad*, University of Gothenburg, Gothenburg.
- Liu, J.F., Yu, S.J., Yin, Y.G., Chao, J.B., 2012. Methods for separation, identification, characterization and quantification of silver nanoparticles. *Trends Anal. Chem.* 33, 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.10.010>
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* 4, 118–128. <https://doi.org/10.4103/0973-7847.70902>
- Lovecká, P., Macůrková, A., Záruba, K., Hubáček, T., Siegel, J., Valentová, O., 2021. Genomic damage induced in *Nicotiana tabacum* L. plants by colloidal solution with silver and gold nanoparticles. *Plants* 10, 1–13. <https://doi.org/10.3390/plants10061260>
- Lv, J., Christie, P., Zhang, S., 2019. Uptake, translocation, and transformation of metal-based

- nanoparticles in plants: recent advances and methodological challenges. *Environ. Sci. Nano* 6, 41–59. <https://doi.org/10.1039/C8EN00645H>
- Ma, C., White, J.C., Dhankher, O.P., Xing, B., 2015. Metal-based nanotoxicity and detoxification pathways in higher plants. *Environ. Sci. Technol.* 49, 7109–7122. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00685>
- Ma, J.F., Takahashi, E., 2002. Functions of silicon in plant growth, u: Soil, fertilizer, and plant silicon research in Japan. *str.* 107–180. <https://doi.org/10.1016/b978-044451166-9/50007-5>
- Ma, X., Geiser-Lee, J., Deng, Y., Kolmakov, A., 2010. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. *Sci. Total Environ.* 408, 3053–3061. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.031>
- Maehly, A.C., Chance, B., 1954. The assay of catalase and peroxidases. *Methods Biochem. Anal.* 1, 358–423.
- Mai, V.C., Bednarski, W., Borowiak-Sobkowiak, B., Wilkaniec, B., Samardakiewicz, S., Morkunas, I., 2013. Oxidative stress in pea seedling leaves in response to *Acyrtosiphon pisum* infestation. *Phytochemistry* 93, 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.02.011>
- Majsec, K., Cvjetko, P., Tolić, S., Tkalec, M., Balen, B., Pavlica, M., 2016. Integrative approach gives new insights into combined Cd/Cu exposure in tobacco. *Acta Physiol. Plant.* 38, 142–156. <https://doi.org/10.1007/s11738-016-2158-y>
- Majumdar, S., Keller, A.A., 2021. Omics to address the opportunities and challenges of nanotechnology in agriculture. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 51, 2595–2636. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1785264>
- Majumdar, S., Pagano, L., Wohlschlegel, J.A., Villani, M., Zappettini, A., White, J.C., Keller, A.A., 2019. Proteomic, gene and metabolite characterization reveal the uptake and toxicity mechanisms of cadmium sulfide quantum dots in soybean plants. *Environ. Sci. Nano* 6, 3010–3026. <https://doi.org/10.1039/C9EN00599D>
- Malinsky, M.D., Lance Kelly, K., Schatz, G.C., van Duyne, R.P., 2001. Nanosphere lithography: effect of substrate on the localized surface plasmon resonance spectrum of silver nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* 105, 2343–2350. <https://doi.org/10.1021/jp002906x>
- Mandal, S., Gole, A., Lala, N., Gonnade, R., Ganvir, V., Sastry, M., 2001. Studies on the reversible aggregation of cysteine-capped colloidal silver particles interconnected via hydrogen bonds. *Langmuir* 17, 6262–6268. <https://doi.org/10.1021/la010536d>
- Maresca, V., Bellini, E., Landi, S., Capasso, G., Cianciullo, P., Carraturo, F., Pirintsos, S., Sorbo, S., Sanità di Toppi, L., Esposito, S., Basile, A., 2022. Biological responses to heavy metal stress in the moss *Leptodictyum riparium* (Hedw.) Warnst. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 229, 113078–113085. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113078>
- Mariano, S., Panzarini, E., Inverno, M.D., Voulvoulis, N., Dini, L., 2020. Toxicity, bioaccumulation and biotransformation of glucose-capped silver nanoparticles in green microalgae *Chlorella vulgaris*. *Nanomaterials* 10, 1–15. <https://doi.org/10.3390/nano10071377>
- Martinoia, E., Massonneau, A., Frangne, N., 2000. Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants. *Plant Cell Physiol.* 41, 1175–1186.

- Mashabela, M.D., Masamba, P., Kappo, A.P., 2023. Applications of metabolomics for the elucidation of abiotic stress tolerance in plants: a special focus on osmotic stress and heavy metal toxicity. *Plants* 12, 269–287. <https://doi.org/10.3390/plants12020269>
- Maurya, P.K., Rizvi, S.I., 2010. Age-dependent changes in glutathione-S-transferase: correlation with total plasma antioxidant potential and red cell intracellular glutathione. *Indian J. Clin. Biochem.* 25, 398–400. <https://doi.org/10.1007/s12291-010-0047-5>
- Maxwell, Kate and Johnson, G., 2000. Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51, 659–668. <https://doi.org/10.1016/j.rsci.2018.02.001>
- McCord, J.M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 244, 6049–6055. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63504-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63504-5)
- McGillicuddy, E., Murray, I., Kavanagh, S., Morrison, L., Fogarty, A., Cormican, M., Dockery, P., Prendergast, M., Rowan, N., Morris, D., 2017. Silver nanoparticles in the environment: sources, detection and ecotoxicology. *Sci. Total Environ.* 575, 231–246. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.041>
- McLennan, H.R., Esposti, M.D., 2000. The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32, 153–162. <https://doi.org/10.1023/A:1005507913372>
- Mehler, A.H., 1951. Studies on reactions of illuminated chloroplasts. II. Stimulation and inhibition of the reaction with molecular oxygen. *Arch. Biochem. Biophys.* 34, 339–351. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(51\)90012-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(51)90012-4)
- Mirmoeini, T., Pishkar, L., Kahrizi, D., Barzin, G., Karimi, N., 2021. Phytotoxicity of green synthesized silver nanoparticles on *Camelina sativa* L. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 27, 417–427. <https://doi.org/10.1007/s12298-021-00946-y>
- Mirzajani, F., Askari, H., Hamzelou, S., Schober, Y., Römpf, A., Ghassempour, A., Spengler, B., 2014. Proteomics study of silver nanoparticles toxicity on *Oryza sativa* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 108, 335–339. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.07.013>
- Mittler, R., 2017. ROS are good. *Trends Plant Sci.* 22, 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
- Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7, 405–410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
- Mittler, R., Zilinskas, B.A., 1993. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. *Anal. Biochem.* 212, 540–546. <https://doi.org/10.1006/abio.1993.1366>
- Miura, Y., Honda, S., Masuda, A., Masuda, T., 2014. Antioxidant activities of cysteine derivatives against lipid oxidation in anhydrous media. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78, 1452–1455. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.918496>
- Montero, F., 2015. Photosynthesis, in: *Encyclopedia of astrobiology*. Gargaud, M., (ur.) Springer Berlin, Njemačka, str. 1878–1885. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-44185-5>
- Moon, J.Y., Belloeil, C., Ianna, M.L., Shin, R., 2019. Arabidopsis CNGC family members

contribute to heavy metal ion uptake in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 413–428.
<https://doi.org/10.3390/ijms20020413>

- Mueller, N.C., Nowack, B., 2008. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 42, 4447–4453. <https://doi.org/10.1021/es7029637>
- Müller, M., Munné-Bosch, S., 2015. Ethylene response factors: a key regulatory hub in hormone and stress signaling. *Plant Physiol.* 169, 32–41. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00677>
- Muraleetharan, V., Mantaj, J., Swedrowska, M., Vllasaliu, D., 2019. Nanoparticle modification in biological media: implications for oral nanomedicines. *RSC Adv.* 9, 40487–40497. <https://doi.org/10.1039/C9RA08403G>
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 474–497.
- Murphy, M.P., Bayir, H., Belousov, V., Chang, C.J., Davies, K.J.A., Davies, M.J., Dick, T.P., Finkel, T., Forman, H.J., Janssen-Heininger, Y., Gems, D., Kagan, V.E., Kalyanaraman, B., Larsson, N.-G., Milne, G.L., Nyström, T., Poulsen, H.E., Radi, R., Van Remmen, H., Schumacker, P.T., Thornalley, P.J., Toyokuni, S., Winterbourn, C.C., Yin, H., Halliwell, B., 2022. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nat. Metab.* 4, 651–662. <https://doi.org/10.1038/s42255-022-00591-z>
- Musante, C., White, J.C., 2012. Toxicity of silver and copper to *Cucurbita pepo*: differential effects of nano and bulk-size particles. *Environ. Toxicol.* 27, 510–517. <https://doi.org/10.1002/tox.20667>
- Mustafa, G., Sakata, K., Hossain, Z., Komatsu, S., 2015. Proteomic study on the effects of silver nanoparticles on soybean under flooding stress. *J. Proteomics* 122, 100–118. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.03.030>
- Naaz, S., Ahmad, N., Jameel, M.R., Al-Huqail, A.A., Khan, F., Qureshi, M.I., 2023. Impact of some toxic metals on important ABC transporters in soybean (*Glycine max* L.). *ACS Omega* 8, 30–46. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c03325>
- Nair, P.M.G., Chung, I.M., 2014a. Physiological and molecular level effects of silver nanoparticles exposure in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Chemosphere* 112, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.056>
- Nair, P.M.G., Chung, I.M., 2014b. Assessment of silver nanoparticle-induced physiological and molecular changes in *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 8858–8869. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2822-y>
- Nakai, M., 2015. The TIC complex uncovered: the alternative view on the molecular mechanism of protein translocation across the inner envelope membrane of chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1847, 957–967. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.02.011>
- Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867–880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N.B., Filser, J., Miao, A.-J., Quigg, A., Santschi,

- P.H., Sigg, L., 2008a. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17, 372–386. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0214-0>
- Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L., Behra, R., 2008b. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Sci. Technol.* 42, 8959–8964. <https://doi.org/10.1021/es801785m>
- Navarro, E., Wagner, B., Odzak, N., Sigg, L., Behra, R., 2015. Effects of differently coated silver nanoparticles on the photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Sci. Technol.* 49, 8041–8047. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01089>
- Nayl, A.A., Abd-Elhamid, A.I., Aly, A.A., Bräse, S., 2022. Recent progress in the applications of silica-based nanoparticles. *RSC Adv.* 12, 13706–13726. <https://doi.org/10.1039/D2RA01587K>
- Nazarewicz, R.R., Bikineyeva, A., Dikalov, S.I., 2013. Rapid and specific measurements of superoxide using fluorescence spectroscopy. *J. Biomol. Screen.* 18, 498–503. <https://doi.org/10.1177/1087057112468765>
- Niu, L., Liao, W., 2016. Hydrogen peroxide signaling in plant development and abiotic responses: crosstalk with nitric oxide and calcium. *Front. Plant Sci.* 7, 230–244. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00230>
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249–279. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.249>
- Noori, A., Bharath, L.P., White, J.C., 2022. Type-specific impacts of silver on the protein profile of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Int. J. Phytoremediation* 24, 12–24. <https://doi.org/10.1080/15226514.2021.1919052>
- Nowack, B., Krug, H.F., Height, M., 2011. 120 years of nanosilver history: implications for policy makers. *Environ. Sci. Technol.* 45, 1177–1183. <https://doi.org/10.1021/es2017895>
- Nuruzzaman, M., Zhang, R., Cao, H.Z., Luo, Z.Y., 2014. Plant pleiotropic drug resistance transporters: transport mechanism, gene expression, and function. *J. Integr. Plant Biol.* 56, 729–740. <https://doi.org/10.1111/jipb.12196>
- Ogawa, K., 2005. Glutathione-associated regulation of plant growth and stress responses. *Antioxid. Redox Signal.* 7, 973–981. <https://doi.org/10.1089/ars.2005.7.973>
- Omar, R.A., Chyan, Y.J., Andorn, A.C., Poeggeler, B., Robakis, N.K., Pappolla, M.A., 1999. Increased expression but reduced activity of antioxidant enzymes in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 1, 139–145. <https://doi.org/10.3233/JAD-1999-1301>
- Ortega-Villasante, C., Rellán-Álvarez, R., Del Campo, F.F., Carpena-Ruiz, R.O., Hernández, L.E., 2005. Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *J. Exp. Bot.* 56, 2239–2251. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri223>
- Ostling, O., Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123, 291–298. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(84\)90411-X](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(84)90411-X)
- Oukarroum, A., Barhoumi, L., Pirastru, L., Dewez, D., 2013. Silver nanoparticle toxicity effect

on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemna gibba*. Environ. Toxicol. Chem. 32, 902–907. <https://doi.org/10.1002/etc.2131>

- Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F., Popovic, R., 2012. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 78, 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.012>
- Owens, B., 2013. Silver makes antibiotics thousands of times more effective, Nature. Springer Science and Business Media LLC. <https://doi.org/10.1038/nature.2013.13232>
- Pal, S., Tak, Y.K., Song, J.M., 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 73, 1712–1720. <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>
- Pallavi, Mehta, C.M., Srivastava, R., Arora, S., Sharma, A.K., 2016. Impact assessment of silver nanoparticles on plant growth and soil bacterial diversity. 3 Biotech 6, 254–264. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0567-7>
- Panda, K.K., Achary, V.M.M., Krishnaveni, R., Padhi, B.K., Sarangi, S.N., Sahu, S.N., Panda, B.B., 2011. In vitro biosynthesis and genotoxicity bioassay of silver nanoparticles using plants. Toxicol. Vitro. 25, 1097–1105. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.03.008>
- Paramelle, D., Sadovoy, A., Gorelik, S., Free, P., Hobley, J., Fernig, D.G., 2014. A rapid method to estimate the concentration of citrate capped silver nanoparticles from UV-visible light spectra. Analyst 139, 4855–4861. <https://doi.org/10.1039/c4an00978a>
- Pardha-Saradhi, P., Shabnam, N., Sharmila, P., Ganguli, A.K., Kim, H., 2018. Differential sensitivity of light-harnessing photosynthetic events in wheat and sunflower to exogenously applied ionic and nanoparticulate silver. Chemosphere 194, 340–351. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.122>
- Paredes, D., Ortiz, C., Torres, R., 2014. Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Int. J. Nanomedicine 9, 1717–1729. <https://doi.org/10.2147/IJN.S57156>
- Parvaiz, A., Jaleel, C.A., Salem, M.A., Nabi, G., Sharma, S., 2010. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. Crit. Rev. Biotechnol. 30, 161–175. <https://doi.org/10.3109/07388550903524243>
- Patlolla, A.K., Berry, A., May, L., Tchounwou, P.B., 2012. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Vicia faba*: a pilot study on the environmental monitoring of nanoparticles. Int. J. Environ. Res. Public Health 9, 1649–1662. <https://doi.org/10.3390/ijerph9051649>
- Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B., Sharma, A., 2004. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. Environ. Exp. Bot. 52, 199–223. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.02.009>
- Pavoković, D., Križnik, B., Krsnik-Rasol, M., 2012. Evaluation of protein extraction methods for proteomic analysis of non-model recalcitrant plant tissues. Croat. Chem. Acta 85,

177–183. <https://doi.org/10.5562/cca1804>

- Pędziwiatr, P., Mikołajczyk, F., Zawadzki, D., Mikołajczyk, K., Bedka, A., 2018. Decomposition of hydrogen peroxide-kinetics and review of chosen catalysts. *Acta Innov.* 45–52. <https://doi.org/10.32933/ActaInnovations.26.5>
- Peharec Štefanić, P., Cvjetko, P., Biba, R., Domijan, A.-M., Letofsky-Papst, I., Tkalec, M., Šikić, S., Cindrić, M., Balen, B., 2018. Physiological, ultrastructural and proteomic responses of tobacco seedlings exposed to silver nanoparticles and silver nitrate. *Chemosphere* 209, 640–653. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.128>
- Peharec Štefanić, P., Jarnević, M., Cvjetko, P., Biba, R., Šikić, S., Tkalec, M., Cindrić, M., Letofsky-Papst, I., Balen, B., 2019. Comparative proteomic study of phytotoxic effects of silver nanoparticles and silver ions on tobacco plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 22529–22550. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05552-w>
- Peharec Štefanić, P., Koffler, T., Adler, G., Bar-Zvi, D., 2013. Chloroplasts of salt-grown *Arabidopsis* seedlings are impaired in structure, genome copy number and transcript levels. *PLoS One* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082548>
- Peharec Štefanić, P., Košpić, K., Lyons, D.M., Jurković, L., Balen, B., Tkalec, M., 2021. Phytotoxicity of silver nanoparticles on tobacco plants: evaluation of coating effects on photosynthetic performance and chloroplast ultrastructure. *Nanomaterials* 11, 744–764. <https://doi.org/10.3390/nano11030744>
- Peharec Štefanić, P., Šikić, S., Cvjetko, P., Balen, B., 2012. Cadmium and zinc induced similar changes in protein and glycoprotein patterns in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seedlings and plants. *Arch. Ind. Hyg. Toxicol.* 63, 321–335. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-63-2012-2173>
- Pem, B., Čurlin, M., Domazet Jurašin, D., Vrček, V., Barbir, R., Micek, V., Fratila, R.M., de la Fuente, J.M., Vinković Vrček, I., 2021. Fate and transformation of silver nanoparticles in different biological conditions. *Beilstein J. Nanotechnol.* 12, 665–679. <https://doi.org/10.3762/bjnano.12.53>
- Pham, T.-L., 2019. Effect of silver nanoparticles on tropical freshwater and marine microalgae. *J. Chem.* 2019, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2019/9658386>
- Pokhrel, L.R., Dubey, B., 2013. Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles. *Sci. Total Environ.* 452, 321–332. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.059>
- Pongrac, I.M., Ahmed, L.B., Mlinarić, H., Jurašin, D.D., Pavičić, I., Marjanović Čermak, A.M., Milić, M., Gajović, S., Vinković Vrček, I., 2018. Surface coating affects uptake of silver nanoparticles in neural stem cells. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 50, 684–692. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.12.003>
- Pradas del Real, A.E., Vidal, V., Carrière, M., Castillo-Michel, H., Levard, C., Chaurand, P., Sarret, G., 2017. Silver nanoparticles and wheat roots: a complex interplay. *Environ. Sci. Technol.* 51, 5774–5782. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00422>
- Qian, H., Peng, X., Han, X., Ren, J., Sun, L., Fu, Z., 2013. Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. *J. Environ. Sci.* 25, 1947–1956. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60301-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60301-5)

- Rabinovitch, E., Govindjee, 1970. The photosynthetic pigments u Photosynthesis. John Wiley and Sons, New York, SAD. str. 102-119.
- Rahman, K., 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. Clin. Interv. Aging 2, 219–236.
- Rajput, V.D., Harish, Singh, R.K., Verma, K.K., Sharma, L., Quiroz-Figueroa, F.R., Meena, M., Gour, V.S., Minkina, T., Sushkova, S., Mandzhieva, S., 2021. Recent developments in enzymatic antioxidant defence mechanism in plants with special reference to abiotic stress. Biology (Basel) 10, 267–295. <https://doi.org/10.3390/biology10040267>
- Ramagli, L.S., Rodriguez, L.V., 1985. Quantitation of microgram amounts of protein in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer, Electrophoresis 6, 559–563. <https://doi.org/10.1002/elps.1150061109>
- Reidy, B., Haase, A., Luch, A., Dawson, K.A., Lynch, I., 2013. Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: A critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications. Materials (Basel). 6, 2295–2350. <https://doi.org/10.3390/ma6062295>
- Ren, D., Yang, K.Y., Li, G.J., Liu, Y., Zhang, S., 2006. Activation of Ntf4, a tobacco mitogen-activated protein kinase, during plant defense response and its involvement in hypersensitive response-like cell death. Plant Physiol. 141, 1482–1493. <https://doi.org/10.1104/pp.106.080697>
- Reynolds, E.S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17, 208–212. <https://doi.org/10.1083/jcb.17.1.208>
- Richardson, A.D., Duigan, S.P., Berlyn, G.P., 2011. An evaluation of noninvasive methods to estimate foliar chlorophyll content. New Phytol. 153, 185–194. <https://doi.org/10.1046/j.0028-646X.2001.00289.x>
- Rico, C.M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2011. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. J. Agric. Food Chem. 59, 3485–3498. <https://doi.org/10.1021/jf104517j>
- Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., Zabalza, A., Corpas, F.J., Gómez, M., Del Río, L.A., Sandalio, L.M., 2006. Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. Plant, Cell Environ. 29, 1532–1544. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01531.x>
- Romero-Puertas, M.C., Corpas, F.J., Sandalio, L.M., Leterrier, M., Rodriguez-Serrano, M., Rio, L.A., Palma, J.M., 2006. Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. New Phytol. 170, 43–52. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01643.x>
- Romero-Puertas, M.C., Rodríguez-Serrano, M., Corpas, F.J., Gómez, M., Del Río, L.A., Sandalio, L.M., 2004. Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂⁻ and H₂O₂ in pea leaves. Plant, Cell Environ. 27, 1122–1134. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01217.x>
- Romero, N., Visentini, F.F., Márquez, V.E., Santiago, L.G., Castro, G.R., Gagneten, A.M., 2020. Physiological and morphological responses of green microalgae *Chlorella vulgaris*

- to silver nanoparticles. *Environ. Res.* 189, 109857–109867. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109857>
- Rothe, G., Valet, G., 1990. Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescin. *J. Leukoc. Biol.* 47, 440–448. <https://doi.org/10.1002/jlb.47.5.440>
- Rui, Y., Xiao, C., Yi, H., Kandemir, B., Wang, J.Z., Puri, V.M., Anderson, C.T., 2017. Polygalacturonase involved in expansion functions in seedling development, rosette growth, and stomatal dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 29, 2413–2432. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00568>
- Sadak, M.S., 2019. Impact of silver nanoparticles on plant growth, some biochemical aspects, and yield of fenugreek plant (*Trigonella foenum-graecum*). *Bull. Natl. Res. Cent.* 43, 38–44. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0077-y>
- Saeb, A.T.M., Alshammari, A.S., Al-Brahim, H., Al-Rubeaan, K.A., 2014. Production of silver nanoparticles with strong and stable antimicrobial activity against highly pathogenic and multidrug resistant bacteria. *Sci. World J.* 2014, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/704708>
- Salbitani, G., Bottone, C., Carfagna, S., 2017. Determination of reduced and total glutathione content in extremophilic microalga *Galdieria phlegrea*. *Bio-protocol* 7, 2–6. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2372>
- Sandalio, L.M., Dalurzo, H.C., Gómez, M., Romero-Puertas, M.C., del Río, L.A., 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.* 52, 2115–2126. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.364.2115>
- Sari, S., Suorsa, M., Paakkarinen, V., Aro, E.-M., 2011. Optimized native gel systems for separation of thylakoid protein complexes: novel super- and mega complexes. *Biochem. J.* 439, 207–214. <https://doi.org/10.1042/BJ20102155>
- Schaeffer, S., Koepke, T., Dhingra, A., 2012. Tobacco: a model plant for understanding the mechanism of abiotic stress tolerance, u: Improving crop resistance to abiotic stress. Tuteja, N., (ur.) Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Njemačka. str. 1169–1201. <https://doi.org/10.1002/9783527632930.ch46>
- Schmitt, F.-J., Renger, G., Friedrich, T., Kreslavski, V.D., Zharmukhamedov, S.K., Los, D.A., Kuznetsov, V. V., Allakhverdiev, S.I., 2014. Reactive oxygen species: re-evaluation of generation, monitoring and role in stress-signaling in phototrophic organisms. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1837, 835–848. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.02.005>
- Schulze-Osthoff, K., Bakker, A.C., Vanhaesebroeck, B., Beyaert, R., Jacob, W.A., Fiers, W., 1992. Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J. Biol. Chem.* 267, 5317–5323. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)42768-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)42768-8)
- Seregin, I. V., Kozhevnikova, A.D., 2023. Phytochelatin: sulfur-containing metal(loid)-chelating ligands in plants. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 2430–2468. <https://doi.org/10.3390/ijms24032430>
- Shabnam, N., Sharmila, P., Pardha-Saradhi, P., 2017. Impact of ionic and nanoparticle speciation states of silver on light harnessing photosynthetic events in *Spirodela polyrhiza*.

- Shaikh, W.A., Chakraborty, S., Owens, G., Islam, R.U., 2021. A review of the phytochemical mediated synthesis of AgNP (silver nanoparticle): the wonder particle of the past decade. *Appl. Nanosci.* 11, 2625–2660. <https://doi.org/10.1007/s13204-021-02135-5>
- Shalan, A.E., Barhoum, A., Elseman, A.M., Rashad, M.M., Lira-Cantú, M., 2019. Nanofibers as promising materials for new generations of solar cells, u: Handbook of nanofibers. Barhoum, A. i sur., (ur.) Springer, Berlin, Njemačka. str. 1017–1048. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53655-2_51
- Sharma, P., Bhatt, D., Zaidi, M.G.H., Saradhi, P.P., Khanna, P.K., Arora, S., 2012. Silver nanoparticle-mediated enhancement in growth and antioxidant status of *Brassica juncea*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167, 2225–2233. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9759-8>
- Sharma, V.K., Siskova, K.M., Zboril, R., Gardea-Torresdey, J.L., 2014. Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: fate, stability and toxicity. *Adv. Colloid Interface Sci.* 204, 15–34. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.12.002>
- Shen, J.J., Chen, Q.S., Li, Z.F., Zheng, Q.X., Xu, Y.L., Zhou, H.N., Mao, H.Y., Shen, Q., Liu, P.P., 2022. Proteomic and metabolomic analysis of *Nicotiana benthamiana* under dark stress. *FEBS Open Bio* 12, 231–249. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.13331>
- Shoeib, T., Siu, K.W.M., Hopkinson, A.C., 2002. Silver ion binding energies of amino acids: Use of theory to assess the validity of experimental silver ion basicities obtained from the kinetic method. *J. Phys. Chem. A.* 106, 6121–6128. <https://doi.org/10.1021/jp013662z>
- Shu, D.-F., Wang, L.-Y., Duan, M., Deng, Y.-S., Meng, Q.-W., 2011. Antisense-mediated depletion of tomato chloroplast glutathione reductase enhances susceptibility to chilling stress. *Plant Physiol. Biochem.* 49, 1228–1237. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.04.005>
- Siddiqi, K.S., Husen, A., Rao, R.A.K., 2018. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J. Nanobiotechnology* 16, 14–42. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0334-5>
- Sierro, N., Battey, J.N.D., Ouadi, S., Bakaher, N., Bovet, L., Willig, A., Goepfert, S., Peitsch, M.C., Ivanov, N. V., 2014. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nat. Commun.* 5, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms4833>
- Sies, H., Jones, D.P., 2020. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21, 363–383. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3>
- Sigg, L., Lindauer, U., 2015. Silver nanoparticle dissolution in the presence of ligands and of hydrogen peroxide. *Environ. Pollut.* 206, 582–587. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.08.017>
- Sim, S., Wong, N., 2021. Nanotechnology and its use in imaging and drug delivery (Review). *Biomed. Reports* 14, 1–9. <https://doi.org/10.3892/br.2021.1418>
- Singh, R.K., Liang, D., Gajjalaiahvari, U.R., Kabbaj, M.H.M., Paik, J., Gunjan, A., 2010. Excess histone levels mediate cytotoxicity via multiple mechanisms. *Cell Cycle* 9, 4236–4244. <https://doi.org/10.4161/cc.9.20.13636>

- Song, Kangkang, Li, B., Wu, H., Sha, Y., Qin, L., Chen, X., Liu, Y., Tang, H., Yang, L., 2022. The function of BBX gene family under multiple stresses in *Nicotiana tabacum*. *genes* (Basel). 13, 1841–1858. <https://doi.org/10.3390/genes13101841>
- Song, Kexiao, Zhao, D., Sun, H., Gao, J., Li, S., Hu, T., He, X., 2022. Green nanoprimering: responses of alfalfa (*Medicago sativa* L.) seedlings to alfalfa extracts capped and light-induced silver nanoparticles. *BMC Plant Biol.* 22, 323–339. <https://doi.org/10.1186/s12870022-03692-9>
- Song, U., Jun, H., Waldman, B., Roh, J., Kim, Y., Yi, J., Lee, E.J., 2013. Functional analyses of nanoparticle toxicity: a comparative study of the effects of TiO₂ and Ag on tomatoes (*Lycopersicon esculentum*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 93, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.033>
- Sosan, A., Svistunenko, D., Straltsova, D., Tsiurkina, K., Smolich, I., Lawson, T., Subramaniam, S., Golovko, V., Anderson, D., Sokolik, A., Colbeck, I., Demidchik, V., 2016. Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify the physiology of *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant J.* 85, 245–257. <https://doi.org/10.1111/tpj.13105>
- Spinoso-Castillo, J.L., Chavez-Santoscoy, R.A., Bogdanchikova, N., Pérez-Sato, J.A., Morales-Ramos, V., Bello-Bello, J.J., 2017. Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on in vitro regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 129, 195–207. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1169-8>
- Stampoulis, D., Sinha, S.K., White, J.C., 2009. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environ. Sci. Technol.* 43, 9473–9479. <https://doi.org/10.1021/es901695c>
- Steen, H., Mann, M., 2004. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 699–711. <https://doi.org/10.1038/nrm1468>
- Stegemeier, J.P., Colman, B.P., Schwab, F., Wiesner, M.R., Lowry, G. V., 2017. Uptake and distribution of silver in the aquatic plant *Landoltia punctata* (duckweed) exposed to silver and silver sulfide nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 51, 4936–4943. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b06491>
- Stegemeier, J.P., Schwab, F., Colman, B.P., Webb, S.M., Newville, M., Lanzirrotti, A., Winkler, C., Wiesner, M.R., Lowry, G. V., 2015. Speciation matters: bioavailability of silver and silver sulfide nanoparticles to alfalfa (*Medicago sativa*). *Environ. Sci. Technol.* 49, 8451–8460. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01147>
- Stephenie, S., Chang, Y.P., Gnanasekaran, A., Esa, N.M., Gnanaraj, C., 2020. An insight on superoxide dismutase (SOD) from plants for mammalian health enhancement. *J. Funct. Foods* 68, 1039175–1039185. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.103917>
- Strasser, R.J., Tsimilli-Michael, M., Srivastava, A., 2004. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient, u: Chlorophyll a fluorescence. *Advances in photosynthesis and respiration*. Papageorgiou G.C., Govindjee, G. (ur.), Springer, Dordrecht, Nizozemska. str. 321–362. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-3218-9_12
- Sudisha, J., Sharathchandra, R.G., Amruthesh, K.N., Kumar, A., Shekar Shetty, H., 2012.

- Pathogenesis related proteins in plant defense response, u: Plant defence: biological control. Mérillon, J.M. Ramawat, K.G., (ur.) Springer Science, str. 379–403. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-1933-0>
- Sun, J., Wang, L., Li, S., Yin, L., Huang, J., Chen, C., 2017. Toxicity of silver nanoparticles to *Arabidopsis*: inhibition of root gravitropism by interfering with auxin pathway. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 2773–2780. <https://doi.org/10.1002/etc.3833>
- Suresh, A.K., Pelletier, D.A., Wang, W., Moon, J.W., Gu, B., Mortensen, N.P., Allison, D.P., Joy, D.C., Phelps, T.J., Doktycz, M.J., 2010. Silver nanocrystallites: biofabrication using *Shewanella oneidensis*, and an evaluation of their comparative toxicity on gram-negative and gram-positive bacteria. *Environ. Sci. Technol.* 44, 5210–5215. <https://doi.org/10.1021/es903684r>
- Suzuki, N., Kōchi, M., Wada, N., Mashiko, S., Nomoto, T., Yoda, B., 1992. Antioxidative activity of amino acids and sulfur-containing compounds to superoxide: measurement by quenching the chemiluminescence of a Cypridina luciferin analogue. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 56, 409–411. <https://doi.org/10.1271/bbb.56.409>
- Szabados, L., Savouré, A., 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 15, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.11.009>
- Takáč, P., Michalková, R., Čižmáriková, M., Bedlovičová, Z., Balážová, E., Takáčová, G., 2023. The role of silver nanoparticles in the diagnosis and treatment of cancer: are there any perspectives for the future? *Life* 13, 466–510. <https://doi.org/10.3390/life13020466>
- Takáč, T., Pechan, T., Šamajová, O., Šamaj, J., 2019. Proteomic analysis of *Arabidopsis* Pld α 1 mutants revealed an important role of phospholipase D alpha 1 in chloroplast biogenesis. *Front. Plant Sci.* 10, 89–105. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00089>
- Tausz, M., Šircelj, H., Grill, D., 2004. The glutathione system as a stress marker in plant ecophysiology: is a stress-response concept valid? *J. Exp. Bot.* 55, 1955–1962. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh194>
- Thayer, S.S., Björkman, O., 1990. Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC. *Photosynth. Res.* 23, 331–343. <https://doi.org/10.1007/BF00034864>
- Thwala, M., Musee, N., Sikhwivhilu, L., Wepener, V., 2013. The oxidative toxicity of Ag and ZnO nanoparticles towards the aquatic plant *Spirodela punctata* and the role of testing media parameters. *Environ. Sci. Process. Impacts* 15, 1830–1875. <https://doi.org/10.1039/c3em00235g>
- Tkalec, M., Peharec Štefanić, P., Balen, B., 2019. Phytotoxicity of silver nanoparticles and defence mechanisms u: Analysis, fate, and toxicity of engineered nanomaterials in plants - *Comprehensive Analytical Chemistry*. Verma, S.K., Das AK (ur.), Elsevier, Amsterdam, str. 145–198. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2019.04.010>
- Tkalec, M., Štefanić, P.P., Cvjetko, P., Šikić, S., Pavlica, M., Balen, B., 2014. The effects of cadmium-zinc interactions on biochemical responses in tobacco seedlings and adult plants. *PLoS One* 9, e87582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087582>
- Tola, A.J., Jaballi, A., Missihoun, T.D., 2021. Protein carbonylation: emerging roles in plant redox biology and future prospects. *Plants* 10, 1–27. <https://doi.org/10.3390/plants10071451>
- Tolaymat, T.M., El Badawy, A.M., Genaidy, A., Scheckel, K.G., Luxton, T.P., Suidan, M.,

2010. An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Sci. Total Environ.* 408, 999–1006. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.11.003>
- Torrent, L., Iglesias, M., Marguí, E., Hidalgo, M., Verdaguer, D., Llorens, L., Kodre, A., Kavčič, A., Vogel-Mikuš, K., 2020. Uptake, translocation and ligand of silver in *Lactuca sativa* exposed to silver nanoparticles of different size, coatings and concentration. *J. Hazard. Mater.* 384, 121201–121215. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121201>
- Tripathi, Durgesh Kumar, Singh, Swati, Singh, Shweta, Srivastava, P.K., Singh, V.P., Singh, Samiksha, Prasad, S.M., Singh, P.K., Dubey, N.K., Pandey, A.C., Chauhan, D.K., 2017. Nitric oxide alleviates silver nanoparticles (AgNps)-induced phytotoxicity in *Pisum sativum* seedlings. *Plant Physiol. Biochem.* 110, 167–177. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.06.015>
- Tripathi, Durgesh K., Tripathi, A., Shweta, Singh, S., Singh, Y., Vishwakarma, K., Yadav, G., Sharma, S., Singh, V.K., Mishra, R.K., Upadhyay, R.G., Dubey, N.K., Lee, Y., Chauhan, D.K., 2017. Uptake, accumulation and toxicity of silver nanoparticle in autotrophic plants, and heterotrophic microbes: a concentric review. *Front. Microbiol.* 08, 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00007>
- Tripathy, B.C., Oelmüller, R., 2012. Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signal. Behav.* 7, 1621–1633. <https://doi.org/10.4161/psb.22455>
- Van Lijsebettens, M., Angenon, G., De Block, M., 2013. Transgenic plants: from first successes to future applications. *Int. J. Dev. Biol.* 57, 461–465. <https://doi.org/10.1387/ijdb.130063mv>
- Vance, M.E., Kuiken, T., Vejerano, E.P., McGinnis, S.P., Hochella, M.F., Rejeski, D., Hull, M.S., 2015. Nanotechnology in the real world: redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J. Nanotechnol.* 6, 1769–1780. <https://doi.org/10.3762/bjnano.6.181>
- Vannini, C., Domingo, G., Onelli, E., De Mattia, F., Bruni, I., Marsoni, M., Bracale, M., 2014. Phytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles exposure on germinating wheat seedlings. *J. Plant Physiol.* 171, 1142–1148. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.05.002>
- Vannini, C., Domingo, G., Onelli, E., Prinsi, B., Marsoni, M., Espen, L., Bracale, M., 2013. Morphological and proteomic responses of *Eruca sativa* exposed to silver nanoparticles or silver nitrate. *PLoS One* 8, e68752. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068752>
- Vega-Baudrit, J., Gamboa, S.M., Rojas, E.R., Martinez, V.V., 2019. Synthesis and characterization of silver nanoparticles and their application as an antibacterial agent. *Int. J. Biosens. Bioelectron.* 5, 166–173. <https://doi.org/10.15406/ijbsbe.2019.05.00172>
- Viehweger, K., 2014. How plants cope with heavy metals. *Bot. Stud.* 55, 1–12.
- Vishwakarma, K., Shweta, Upadhyay, N., Singh, J., Liu, S., Singh, V.P., Prasad, S.M., Chauhan, D.K., Tripathi, D.K., Sharma, S., 2017. Differential phytotoxic impact of plant mediated silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate (AgNO₃) on *Brassica sp.* *Front. Plant Sci.* 8, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01501>
- Vítámvás, P., Urban, M.O., Škodáček, Z., Kosová, K., Pitelková, I., Vítámvás, J., Renaut, J., Prášil, I.T., 2015. Quantitative analysis of proteome extracted from barley crowns grown

- under different drought conditions. *Front. Plant Sci.* 6, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00479>
- Wang, J., Koo, Y., Alexander, A., Yang, Y., Westerhof, S., Zhang, Q., Schnoor, J.L., Colvin, V.L., Braam, J., Alvarez, P.J.J., 2013. Phytostimulation of poplars and *Arabidopsis* exposed to silver nanoparticles and Ag⁺ at sublethal concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 47, 5442–5449. <https://doi.org/10.1021/es4004334>
- Wang, P., Lombi, E., Sun, S., Scheckel, K.G., Malysheva, A., McKenna, B.A., Menzies, N.W., Zhao, F.-J., Kopittke, P.M., 2017. Characterizing the uptake, accumulation and toxicity of silver sulfide nanoparticles in plants. *Environ. Sci. Nano* 4, 448–460. <https://doi.org/10.1039/C6EN00489J>
- Wang, Y., Zhang, X., Bai, Y., Li, W., Li, X., Xing, X., Wang, C., Gao, L., Yogi, M., Swamy, M.K., Dupadahalli, K., Rudramurthy, G.R., Purushotham, B., Rohit, K.C., Fu, J., 2020. Anticancer and antibacterial activities of silver nanoparticles (AgNPs) synthesized from *Cucumis melo* L. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 20, 4143–4151. <https://doi.org/10.1166/jnn.2020.17524>
- Wang, Z., Hu, T., Liang, R., Wei, M., 2020. Application of zero-dimensional nanomaterials in biosensing. *Front. Chem.* 8, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00320>
- Waśkiewicz, A., Beszterda, M., Goliński, P., 2014. Nonenzymatic antioxidants in plants, u: oxidative damage to plants. Ahmad, P., (ur.) Elsevier, Amsterdam, Nizozemska, str. 201–234. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00007-1>
- Wassink, E.C., 1951. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis, u: Advances in enzymology and related areas of molecular biology. Nord, F.F., Interscience Publishers Inc. Wageningen, Nizozemska, str. 91–199. <https://doi.org/10.1002/9780470122563.ch3>
- Whitehouse, D.G., May, B., Moore, A.L., 2019. Respiratory chain and ATP synthase, reference module in biomedical sciences u: Reference Module in Biomedical Sciences. Elsevier Inc., str. 1–6. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.95732-5>
- Whitmarsh, J., Govindjee, 1999. The photosynthetic process, u: Concepts in photobiology: photosynthesis and photomorphogen. Singhal, G.S. i sur., (ur.), Narosa Publishing House, New Delhi, India, str. 11–51. https://doi.org/10.1007/978-94-011-4832-0_2
- Willekens, H., Villarroel, R., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W., 1994. Molecular identification of catalases from *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *FEBS Lett.* 352, 79–83. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00923-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00923-6)
- Wojcieszek, J., Jiménez-Lamana, J., Ruzik, L., Szpunar, J., Jarosz, M., 2020. To-do and not-to-do in model studies of the uptake, fate and metabolism of metal-containing nanoparticles in plants. *Nanomaterials* 10, 1–16. <https://doi.org/10.3390/nano10081480>
- Woodbury, W.A., Spencer, K., Stahlmann, M.A., 1971. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes. *Anal. Biochem.* 44, 301–305. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90375-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90375-7)
- Xu, L., Wang, Y.-Y., Huang, J., Chen, C.-Y., Wang, Z.-X., Xie, H., 2020. Silver nanoparticles: synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics* 10, 8996–9031. <https://doi.org/10.7150/thno.45413>
- Xu, Q.S., Hu, J.Z., Xie, K.B., Yang, H.Y., Du, K.H., Shi, G.X., 2010. Accumulation and acute toxicity of silver in *Potamogeton crispus* L. *J. Hazard. Mater.* 173, 186–193.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.08.067>

- Yakes, F.M., Van Houten, B., 1997. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 514–519. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.2.514>
- Yan, A., Chen, Z., 2019. Impacts of silver nanoparticles on plants: a focus on the phytotoxicity and underlying mechanism. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 23–25. <https://doi.org/10.3390/ijms20051003>
- Yang, C., Jiang, L., Zhang, H., Shimoda, L.A., Deberardinis, R.J., Semenza, G.L., 2014. Analysis of hypoxia-induced metabolic reprogramming, 1. izdanje, u *Methods in enzymology*. Elsevier Inc. str. 425–455. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416618-9.00022-4>
- Yang, Q., Shan, W., Hu, L., Zhao, Y., Hou, Y., Yin, Y., Liang, Y., Wang, F., Cai, Y., Liu, J., Jiang, G., 2019. Uptake and transformation of silver nanoparticles and ions by rice plants revealed by dual stable isotope tracing. *Environ. Sci. Technol.* 53, 625–633. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02471>
- Yang, Q., Xu, W., Liu, G., Song, M., Tan, Z., Mao, Y., Yin, Y., Cai, Y., Liu, J., Jiang, G., 2020. Transformation and uptake of silver nanoparticles and silver ions in rice plant (*Oryza sativa* L.): the effect of iron plaque and dissolved iron. *Environ. Sci. Nano* 7, 599–609. <https://doi.org/10.1039/C9EN01297D>
- Yasur, J., Rani, P.U., 2013. Environmental effects of nanosilver: impact on castor seed germination, seedling growth, and plant physiology. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 8636–8648. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1798-3>
- Yates, J.R., Ruse, C.I., Nakorchevsky, A., 2009. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 11, 49–79. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-061008-124934>
- Yin, L., Cheng, Y., Espinasse, B., Colman, B.P., Auffan, M., Wiesner, M., Rose, J., Liu, J., Bernhardt, E.S., 2011. More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. *Environ. Sci. Technol.* 45, 2360–2367. <https://doi.org/10.1021/es103995x>
- Yoshimura, K., Yabuta, Y., Ishikawa, T., Shigeoka, S., 2000. Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol.* 123, 223–233. <https://doi.org/10.1104/pp.123.1.223>
- You, W. -c., 2000. Gastric dysplasia and gastric cancer: *Helicobacter pylori*, serum vitamin C, and other risk factors. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1607–1612. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.19.1607>
- Yu, S., Yin, Y., Liu, J., 2013. Silver nanoparticles in the environment. *Environ. Sci. Process. Impacts* 15, 78–92. <https://doi.org/10.1039/C2EM30595J>
- Zamzami, N., Marchetti, P., Castedo, M., Decaudin, D., Macho, A., Hirsch, T., Susin, S.A., Petit, P.X., Mignotte, B., Kroemer, G., 1995. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Med.* 182, 367–377. <https://doi.org/10.1084/jem.182.2.367>
- Zhao, C.-M., Wang, W.-X., 2012. Importance of surface coatings and soluble silver in silver

- nanoparticles toxicity to *Daphnia magna*. *Nanotoxicology* 6, 361–370. <https://doi.org/10.3109/17435390.2011.579632>
- Zhao, Z., Xu, L., Wang, Y., Li, B., Zhang, W., Li, X., 2021. Toxicity mechanism of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*: photosynthesis, oxidative stress, membrane permeability, and ultrastructure analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 15032–15042. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11714-y>
- Zook, J.M., Long, S.E., Cleveland, D., Geronimo, C.L.A., MacCuspie, R.I., 2011. Measuring silver nanoparticle dissolution in complex biological and environmental matrices using UV–visible absorbance. *Anal. Bioanal. Chem.* 401, 1993–2002. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5266-y>
- Zou, X., Li, P., Lou, J., Zhang, H., 2017. Surface coating-modulated toxic responses to silver nanoparticles in *Wolffia globosa*. *Aquat. Toxicol.* 189, 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.06.010>
- Zovko, M., 2018. Učinak nanočestica srebra na pojavu oksidacijskogastresa i ekspresiju proteina u duhanu (*Nicotiana tabacum*). Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
- Zuverza-Mena, N., Armendariz, R., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., 2016. Effects of silver nanoparticles on radish sprouts: root growth reduction and modifications in the nutritional value. *Front. Plant Sci.* 7, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00090>

ŽIVOTOPIS

7. ŽIVOTOPIS

Karla Košpić rođena je 26. listopada 1992. u Zadru, gdje je završila osnovnu i srednju školu. Godine 2011. upisala je preddiplomski studij biotehnologije na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu, a 2018. diplomirala je na diplomskom studiju molekularne biotehnologije s temom *Enantioselektivne biotransformacije katalizirane cijelim stanicama biljaka u prirodnim eutekničkim otapalima*. Nakon studija, radila je kao profesorica kemije u srednjoj Pomorskoj školi u Zadru, a od lipnja 2018. zaposlena je kao asistentica na Zavodu za molekularnu biologiju, Prirodoslovno matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, gdje iste godine upisuje i poslijediplomski studij Biologije.

Doktorsku disertaciju izrađivala je kao suradnica na HRZZ projektu *Fitotoksičnost nanosrebra: mehanizmi akcije i interakcije u stanicama duhana* (NanoPhytoTox) pod vodstvom prof. dr. sc. Biljane Balen, a znanstvenim radom sudjelovala je i u projektu *Functionalized Tomato Products* (FunTomP), financiranom od strane European Union's Horizon programa. Autorica je 6 znanstvenih radova objavljenih u časopisima s međunarodnom recenzijom. S posterskim priopćenjem sudjelovala je na 9 kongresa s međunarodnim sudjelovanjem kao prvi autor, a sudjelovala je i na tri simpozija i četiri stručne radionice u Hrvatskoj i inozemstvu. Osim toga, stručno se usavršavala na konfokalnom i multifotonskom mikroskopu na Institutu Ruđer Bošković, te Institutu za fiziologiju u Pragu. Članica je četiri znanstvene udruge, a u 2022. godini održala je i pozvano predavanje pred članovima Hrvatskog društva za biljnu biologiju (HDBB). Dobitnica je HDBB stipendije za sudjelovanje na 4. Hrvatskom mikroskopijskom kongresu, te stipendije Hrvatskog toksikološkog društva za sudjelovanje na 3. Međunarodnom kongresu o sigurnosti i kvaliteti hrane, na kojem je osvojila i 3. nagradu za najbolji poster. Dobitnica je i dvije međunarodne stipendije za stručno usavršavanje, dodijeljene od strane *Federation of European Societies of Plant Biology* (FESPB), te *Czech BioImaging*. Osim znanstvenog rada, sudjeluje i u izvođenju praktikumske nastave u sklopu kolegija Biologija stanice, Stanična i molekularna biologija, Metode istraživanja proteina, Kultura animalnih i biljnih stanice, te laboratorijske stručne prakse, a osim toga pomagala je u izradi dva diplomskog rada kao neposredni voditelj. Sudjelovala je u popularizaciji znanosti kao koordinator projekta „Noć biologije“ te u znanstvenoj emisiji HRT-a „Prometej“. Bila je ispitni koordinator na 32. Međunarodnoj biološkoj olimpijadi.

Biba, R., Cvjetko, P., Tkalec, M., Košpić, K., Štefanić, P.P., Šikić, S., Domijan, A.-M., Balen, B., 2022a. Effects of Silver Nanoparticles on Physiological and Proteomic Responses of Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Seedlings Are Coating-Dependent. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 15923. <https://doi.org/10.3390/ijms232415923>

Biba, R*, Košpić, K.*, Komazec, B.*, Markulin, D., Cvjetko, P., Pavoković, D., Štefanić, P.P., Tkalec, M., Balen, B., 2022b. Surface coating-modulated phytotoxic responses of silver nanoparticles in plants and freshwater green algae. *Nanomaterials* 12, 24–53. <https://doi.org/10.3390/nano12010024>

Dukić, J., Košpić, K., Kelava, V., Mavrić, R., Nutrizio, M., Balen, B., Butorac, A., Halil Öztop, M., Režek Jambrak, A., 2023. Alternative methods for RuBisCO extraction from sugar beet waste: A comparative approach of ultrasound and high voltage electrical discharge. *Ultrason. Sonochem.* 99. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106535>

Košpić, K., Biba, R., Peharec Štefanić, P., Cvjetko, P., Tkalec, M., Balen, B., 2022. Silver Nanoparticle Effects on Antioxidant Response in Tobacco Are Modulated by Surface Coating. *Plants* 11. <https://doi.org/10.3390/plants11182402>

Pavoković, D., Košpić, K., Panić, M., Radojčić Redovniković, I., Cvjetko Bubalo, M., 2020. Natural deep eutectic solvents are viable solvents for plant cell culture-assisted stereoselective biocatalysis. *Process Biochem.* 93, 69–76. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.03.020>

Peharec Štefanić, P., Košpić, K., Lyons, D.M., Jurković, L., Balen, B., Tkalec, M., 2021. Phytotoxicity of silver nanoparticles on tobacco plants: evaluation of coating effects on photosynthetic performance and chloroplast ultrastructure. *Nanomaterials* 11, 744–764. <https://doi.org/10.3390/nano11030744>

PRILOZI

8. PRILOZI

Prilog 1. Sastav hranjive podloge $\frac{1}{2}$ MS i MS korištene za isključavanje sjemenki i uzgoj odraslih biljaka duhana. pH vrijednost podloga namještena je na 5,6.

Sastav	$\frac{1}{2}$ MS (mg L ⁻¹)	MS (mg L ⁻¹)
ORGANSKI DODACI		
Saharoza	1500,000	1500,000
2-N-morfolino-etansulfonska kiselina (MES)	500,000	500,000
Mio-inozitol	100,000	100,000
Tiamin-HCl	0,050	0,050
MIKROELEMENTI		
H ₃ BO ₃	6,200	6,200
MnSO ₄ × H ₂ O	22,300	22,300
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	8,600	8,600
KI	0,830	0,830
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,250	0,250
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,025	0,025
CoCl ₂ × 6H ₂ O	0,025	0,025
MAKROELEMENTI		
CaCl ₂ × 2H ₂ O	220,000	440,000
Na ₂ EDTA	18,600	37,200
MgSO ₄ × 7H ₂ O	185,000	370,000
KH ₂ PO ₄	85,000	170,000
NH ₄ NO ₃	825,000	1650,000
KNO ₃	950,000	1900,000
FeSO ₄	13,900	27,800

Prilog 2. Sastav otopina za tretman duhana.

Tretman	Konc. (μM)	Kombinirani tretman	Konc. (μM)
AgNP-PVP	25	AgNP-PVP + cys	25 + 125
	50		50 + 250
	100		100 + 500
AgNP-CTAB	25	AgNP-CTAB + cys	25 + 125
	50		50 + 250
	100		100 + 500
AgNO ₃	25	AgNO ₃ + cys	25 + 125
	50		50 + 250
	100		100 + 500

Prilog 3. Sastav otopina za pripremu gelova za PAG elektroforezu u nativnim uvjetima.

Sastojci	12% gel za razdvajanje	4% gel za sabijanje
ultra-čista voda	21 mL	9,15 mL
Tris/HCl	15 mL (1,5 M; pH 8,8)	3,75 mL (0,5 M; pH 6,8)
29,2% (w/v) akrilamid/0,8% (w/v) bisakrilamid (AA/Bis)	24 mL	1,95 mL
10% (w/v) amonijev peroksodisulfat (APS)	300 μL	100 μL
tetrametiletilendiamin (TEMED)	25 μL	15 μL

Prilog 4. Sastav otopina za pripremu gelova za SDS-PAGE.

	10% gel za razdvajanje	12% gel za razdvajanje	4% gel za sabijanje
ultra-čista voda	4,000 mL	3,350 mL	3,050 mL
Tris-HCl	2,5000 mL (1,5 M; pH 8,8)	2,500 mL (1,5 M; pH 8,8)	1,250 mL (0,5 M; pH 6,8)
29,2% (w/v) AA / 0,8% (w/v) Bis	3,330 mL	4,000 mL	0,665 mL
10% SDS	100 µL	100 µL	50 µL
10% APS	50 µL	50 µL	35 µL
TEMED	5 µL	5 µL	8 µL

Prilog 5. Priprema primarnih i sekundarnih antitijela korištenih za imunodetekciju proteina SOD, CAT, APX, HRP i ACT.

Protein	Primarno antitijelo	Razrjeđenje	Sekundarno antitijelo	Razrjeđenje
SOD	poliklonalno, kunićji anti-Cu/Zn SOD	1:1000	anti-kunićji IgG-HRP	1:10000
CAT	poliklonalno, kunićji anti-CAT	1:1000	anti-kunićji IgG-HRP	1:10000
APX	poliklonalno, kunićji anti-APX	1:1000	anti-kunićji IgG-HRP	1:10000
HRP	poliklonalno, kunićji anti-HRP	1:2000	anti-kunićji IgG-HRP	1:10000
ACT	poliklonalno, kunićji anti-ACT	1:1000	anti-kunićji IgG-HRP	1:10000

Prilog 6. Sastav otopina za pripremu 12%-tnih SDS gelova za drugu dimenziju.

12% gel za razdvajanje	
ultra-čista voda	21 mL
1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	15 mL
29,2% (w/v) AA /0,8% (w/v) Bis	24 mL
10% (w/v) SDS	600 µL
10% (w/v) APS	300 µL
TEMED	25 µL

Prilog 7. Parametri analize peptida spektrometrom masa MALDI TOF/TOF.

Tip analize	MS	MS/MS
detekcija iona	pozitivna	pozitivna
zrcalo	reflektron	reflektron
broj snimaka/spektara	80	120
raspon masa (Da)	900-4000	900-4000
brzina snimanja (Hz)	200	200
kolizijski plin	uključen	uključena

Prilog 8. Sadržaj fotosintetskih pigmenata u listu duhana nakon tretmana sa 100 μM AgNP-PVP, AgNP-CTAB i AgNO₃ te njihove kombinacije s 500 μM cisteinom izražen kao % od kontrole i prikazan kao srednja vrijednost \pm standardna pogreška iz tri nezavisna pokusa, svaki sa po tri replike.

Tretman	Konc. (μM)	Anteraksantin	Violaksantin	Zeaksantin	Klorofil <i>b</i>	Klorofil <i>a</i>	Karoten
Kontrola	0	100 \pm 10,64	100 \pm 10,81	100 \pm 4,95	100 \pm 6,15	100 \pm 4,26	100 \pm 8,18
AgNP-PVP	100	121,65 \pm 0,54	117,64 \pm 4,20	88,86 \pm 9,47	106,70 \pm 11,38	100,41 \pm 13,44	99,39 \pm 9,45
AgNP-PVP + cys	100 + 500	123,64 \pm 1,75	123,39 \pm 2,70	96,93 \pm 10,94	94,21 \pm 1,98	95,20 \pm 9,39	89,10 \pm 7,14
AgNP-CTAB	100	103,91 \pm 2,83	103,16 \pm 12,90	107,49 \pm 4,52	103,69 \pm 7,99	102,46 \pm 11,25	102,19 \pm 10,74
AgNP-CTAB + cys	100 + 500	116,24 \pm 6,50	109,59 \pm 11,99	98,06 \pm 5,15	109,01 \pm 1,85	107,87 \pm 3,46	90,88 \pm 4,81
AgNO₃	100	120,66 \pm 9,46	106,67 \pm 10,69	76,98 \pm 5,55	93,81 \pm 3,32	94,55 \pm 2,45	94,76 \pm 6,78
AgNO₃ + cys	100 + 500	119,72 \pm 8,66	102,97 \pm 2,92	93,05 \pm 8,96	104,56 \pm 4,70	104,83 \pm 2,31	99,02 \pm 8,90