

Katalitička aktivnost i ekspresija izoformi antioksidacijskih enzima u klijanaca duhana (*Nicotiana tabacum* L.) nakon tretmana s česticama nanosrebra

Živković, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:169843>

Rights / Prava: [In copyright](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2022-10-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Kristina Marković

**Katalitička aktivnost i ekspresija izoformi
antioksidacijskih enzima u klijanaca duhana
(*Nicotiana tabacum* L.) nakon tretmana s
česticama nanosrebra**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

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

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

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Ana-Mariji Domijan na iznimnom strpljenju i velikoj pomoći od početka izrade ovoga rada.

Hvala prof. dr. sc. Biljani Balen i Renati Biba i cijeloj ekipi s PMF-a na pomoći i ugodnoj radnoj atmosferi tijekom izrade eksperimenata.

Posebno hvala mom zaručniku na svojoj ljubavi i strpljenju i hvala mu što je vjerovao u mene i moj uspjeh kada ni sama nisam.

Najviše zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj ljubavi i potpori tijekom studiranja i cijelog života bez kojih ne bih bila tu gdje jesam. Od srca hvala.

SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
1.1	NANOTEHNOLOGIJA I NANOČESTICE.....	1
1.1.1	Nanočestice srebra.....	1
1.2	OKSIDACIJSKI STRES.....	3
1.2.1	Antioksidacijski enzimi.....	4
2	OBRAZLOŽENJE TEME.....	7
3	MATERIJALI I METODE.....	8
3.1	MATERIJALI.....	8
3.1.1	Kemikalije.....	8
3.1.2	Oprema.....	9
3.2	METODE.....	10
3.2.1	Biološki pokus.....	10
3.2.2	Određivanje aktivnosti SOD.....	12
3.2.3	Određivanje aktivnosti CAT.....	13
3.2.4	Određivanje aktivnosti APX.....	14
3.2.5	Određivanje aktivnosti PPX.....	15
3.2.6	Razdvajanje proteina nativnom poliakrilamid gel elektroforezom.....	16
3.3	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	17
4	REZULTATI I RASPRAVA.....	18
4.1	SOD.....	18
4.2	CAT.....	20
4.3	APX.....	21
4.4	PPX.....	23
5	ZAKLJUČAK.....	26
6	LITERATURA.....	27
7	SAŽETAK.....	30
	PRILOG.....	
	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA.....	

1 UVOD

1.1 NANOTEHNOLOGIJA I NANOČESTICE

U širem smislu pojam nanotehnologija uključuje istraživanje i razvoj tehnologija i novih svojstava struktura s dimenzijama na nanoskali (1-100 nm) (Mijović, 2015). Nanočestice se definiraju kao čestice čija veličina mora biti manja ili jednaka 100 nm. Za usporedbu, veličina zrna prašine je od 2500 do 10 000 nm, a debljina lista papira je oko 100 000 nm. Stoga je većina nanočestica sastavljena od oko samo 100 atoma. Svojstva materijala se mijenjaju sukladno promijeni veličine čestica usporedno s veličinom atoma. Zbog male veličine, dolazi do povećanja omjera specifične površine i volumena, što nanočesticama daje neočekivana kemijska i fizikalna svojstva (www.twi-global.com).

Nanočestice su normalna pojava u prirodi, kao čestice u zraku koje uzrokuju da voda kondenzira u kišu, planktoni u moru te proteini, lipidi i DNA u ljudskom tijelu (Brabazon, 2016). Nanočestice se teoretski mogu proizvesti iz bilo kojeg minerala ili kemijskog spoja te se mogu razlikovati na temelju veličine, oblika, ovojnice i sastava. Jedan od poznatijih primjera kako se nanočestice mogu oblikovati u različite oblike su fulereni tj. molekule ugljika koje mogu tvoriti sfere, cijevi i elipsoide (www.niehs.nih.gov). Zbog činjenice da se nanočestice mogu proizvesti na točno određeni način - da budu željene veličine i svojstava, njihova upotreba je široka, od medicine i kozmetičke industrije do prehrambene industrije, ekologije i astronomije.

U medicini se nanomaterijali mogu koristiti kao sredstva za dostavu lijeka na željeno mjesto djelovanja. U tu svrhu se koriste nanomaterijali koji pomažu antitumorskim lijekovima da ciljano djeluju na tumoske izrasline ili kardiovaskularnim lijekovima da djeluju na željeni dio krvnih žila (www.twi-global.com).

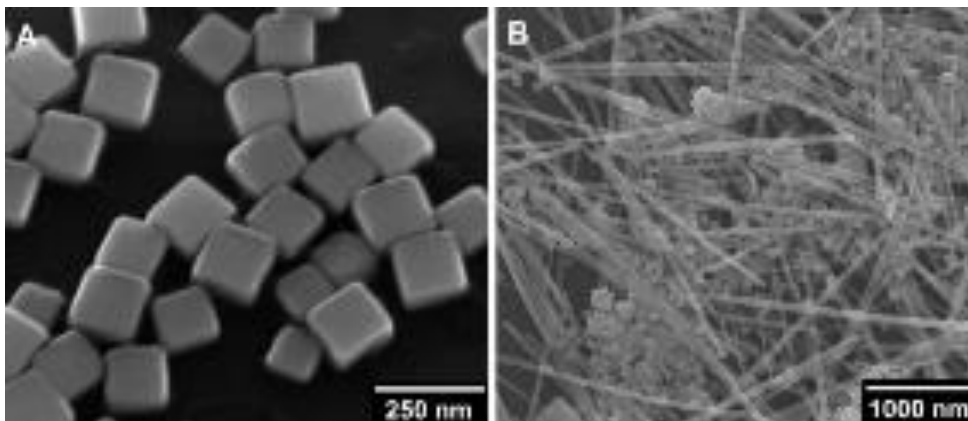
1.1.1 Nanočestice srebra

Nanočestice srebra (AgNP) su jedne od najvažnijih i najkorištenijih nanočestica metala u biomedicini. Zbog već spomenutog velikog omjera površine i volumena, imaju različita fizikalna i kemijska svojstva u odnosu na čestice srebra normalne veličine. Zbog tih svojih

osobina koriste se u razne svrhe: kao antibakterijsko sredstvo u oblozima za rane, kozmetičkim proizvodima, zaštitnim filmovima za medicinske uređaje, u uređajima u kućanstvu i industriji, kao protutumorsko sredstvo i kao pojačivači učinka protutumorskih lijekova (Mijović, 2015).

Razvijeno je više metoda sinteze AgNP. Klasične fizikalne i kemijske metode pokazuju se kao loše zbog skupoće i štetnosti. Zanimljivo je da su biološke metode te koje imaju velik prinos te daju čestice s dobrom topljivosti i visokom stabilnosti. Nakon sinteze potrebna je potpuna karakterizacija dobivenih nanočestica jer njihova fizikalno-kemijska svojstva imaju velik utjecaj na njihovu biološku aktivnost (Zhang i sur., 2016).

Najčešće korištena i najviše istraživana metoda sinteze AgNP je polirolna metoda. U toj se metodi ionske soli srebra reduciraju etilen glikolom na temperaturi od +140°C do +180°C u prisutnosti polivinilpirolidona (PVP). PVP služi kao omotač koji stabilizira čestice i sprječava aglomeraciju i igra ulogu u formaciji različitih veličina i oblika nanočestica kao što je prikazano na Slici 1.



Slika 1 AgNP u obliku kocke (A) i AgNP različitih oblika (B) dobivenih polirolnom sintezom s PVP. Slike su dobivene skenirajućim elektronskim mikroskopom (SEM). Preuzeto iz: Ahlberg i sur. (2014).

Velik omjer specifične površine i volumena, osim što im daje različitu kemijsku aktivnost i biološko djelovanje, donosi sa sobom i toksičnost koja se razlikuje od toksičnosti klasičnih čestica srebra. Iz tog razloga, u posljednje vrijeme postoji sve više istraživanja toksičnosti AgNP. Unatoč sve većem zanimanju znanstvenika za toksičnost AgNP, još uvijek su mehanizmi djelovanja na organizme većinom nepoznanica, djelom i zbog tendencije AgNP da ne podliježe istim metodama analize kao i srebro normalne veličine. Drugi problem u istraživanju toksičnosti AgNP je činjenica da varijacije u obliku i veličini čestica imaju jako

velik utjecaj na njihovo biološko djelovanje jer AgNP imaju različita fizikalno-kemijska svojstva s obzirom na tip i izvor istih (Stensberg i sur., 2011).

Budući da površina AgNP lako oksidira, bilo zbog djelovanja molekuskog kisika (O_2) ili drugih bioloških molekula, pretpostavlja se da je oksidirani oblik (Ag^+) uglavnom odgovoran za toksičnost AgNP, uz same nanočestice. Iako mehanizam toksičnosti još nije u potpunosti poznat, istraživanja pokazuju da bi se mogao povezati s povećanom proizvodnjom reaktivnih kisikovih spojeva (engl. *reactive oxygen species*, ROS). Poveća razina ROS-ova uzrokuje oksidacijski stres i negativno utječe na makromolekule stanica/organizma. Pitanja koja se postavljaju vezana za toksičnost AgNP su: koji je omjer utjecaja ionskog srebra u odnosu na same nanočestice u njihovoj toksičnosti i koji su to ključni enzimi i enzimatski signalni putevi koji su odgovorni za interakciju s AgNP, a time i za njihovu toksičnost (McShan i sur., 2014).

1.2 OKSIDACIJSKI STRES

Biljke su tijekom svog životnog ciklusa podvrgnute različitim uvjetima stresa iz okoliša. U tome važnu ulogu imaju ROS-ovi koje sudjeluju u održavanju normalnog rasta i razvoja te poboljšavaju toleranciju biljke na stres. ROS-ovi su nusprodukti aerobnog metabolizma u stanicama i proizvode se u različitim odjeljcima stanice kao što su kloroplasti, peroksisomi i mitohondriji. Osim što ROS-ovi uzrokuju oštećenja i smrt stanice, oni također djeluju kao signalne molekule koje reguliraju normalni rast biljke i odgovore na stres. To znači da ROS-ovi imaju dualnu ulogu u stanicama, ovisno o njihovoj reaktivnosti, mjestima proizvodnje i sposobnosti prelaska bioloških membrana (Huang i sur., 2019).

U biljaka ROS-ovi postoje u ionskom i/ili molekularnom obliku. Ionski oblici uključuju hidroksilni radikal ($\cdot OH$) i superoksidni anion radikal ($\cdot O_2^-$), dok molekularni oblici uključuju uglavnom vodikov peroksid (H_2O_2) te singlet kisika (1O_2). Svaki tip ROS-a ima različit oksidativni kapacitet i djeluje na različite biokemijske i fiziološke reakcije (Khan i Upadhyaya, 2019).

Kao reaktivne molekule, ROS-ovi oksidiraju i time modificiraju određene stanične komponente/makromolekule. Oksidirane stanične komponente više nisu u mogućnosti obavljati svoje normalne funkcije. Pod nepovoljnim uvjetima, biljke proizvode velike količine ROS-a

što ima negativan utjecaj na razvoj tkiva i organa, posljedično i na rast biljke kao takve, u konačnici i smrt (Huang i sur., 2019).

Da bi se održala stanična redoks homeostaza, biljke su morale razviti različite mehanizme kontrole razine ROS-a. Ti mehanizmi se mogu klasificirati u dvije vrste: enzimatski i neenzimatski, a oba rade u sinergiji kako bi neutralizirali slobodne radikale. Od neenzimatskih mehanizama najvažniji su neenzimatski antioksidansi: askorbinska kiselina, glutation, alfa-tokoferoli, alkaloidi, karotenoidi, neproteinske aminokiseline i flavonoidi. Enzimatski sustavi se sastoje većinom od: enzima superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), askorbat peroksidaze (APX) i pirogalol peroksidaze (PPX) (Huang i sur., 2019; Mehla i sur., 2017).

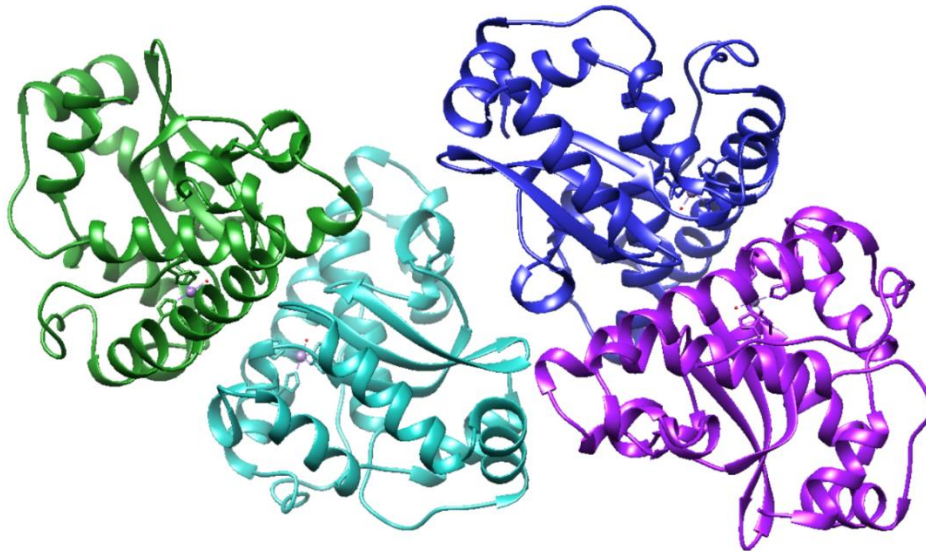
1.2.1 Antioksidacijski enzimi

SOD

SOD su enzimi koji su prva linija obrane od oštećenja uzrokovanih kisikovim radikalima i najučinkovitiji unutarstanični antioksidansi u aerobnim organizmima (Afzal i sur., 2014). To je skupina enzima koja katalizira dismutaciju radikala $\cdot\text{O}_2^-$ u molekularni kisik (O_2) i H_2O_2 i tako smanjuje koncentraciju slobodnog radikala koji oštećuje stanicu kada je u previsokim koncentracijama. Ova reakcija se događa uz naizmjeničnu oksidaciju i redukciju metalnih iona u aktivnom središtu enzima SOD. Ovisno o vrsti metalnih iona koji se nalaze u aktivnom središtu SOD-a, razlikuju se 4 izoforme i to: bakar-cink-SOD (Cu/Zn-SOD), željezo-SOD (Fe-SOD), mangan-SOD (Mn-SOD, kvarterna struktura prikazana na Slici 2.) i nikal-SOD (Ni-SOD). Različite izoforme enzima su rasprostranjene po cijelom živom svijetu koji je izložen kisiku i u svim stanicama, a svaka se nalazi u specifičnim staničnim odjeljcima (Younus, 2018).

Reakcije koje kataliziraju SOD mogu se zapisati kao:



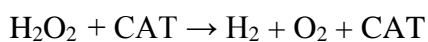


Slika 2 Kvarterna struktura MnSOD napravljena računalnim programima Chimera PBD 1 VEW. Svaki monomer je u drugoj boji. Preuzeto iz: chem.libretexts.org.

CAT

CAT su antioksidacijski enzimi prisutni u svim aerobnim organizmima. Oni pretvaraju toksični H_2O_2 u O_2 i H_2O . Budući da imaju važnu ulogu u stanicama, nalaze se u svim odjeljcima u kojima se proizvodi H_2O_2 , najviše u peroksisomima, ali i u mitohondrijima, kloroplastima i citosolu. Postoje tri izoforme enzima katalaze: CAT-1, CAT-2 i CAT-3 (Sharma i Ahmad, 2014).

Reakcija koju kataliziraju CAT je:

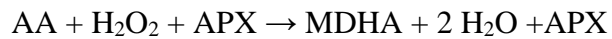


APX

APX su antoksidacijski enzimi koji su dio askorbat-glutation ciklusa. APX koristi askorbinsku kiselinu (AA) kao donor elektrona za redukciju H_2O_2 do H_2O uz generaciju monodehidroaskorbata (MDHA) kao nusprodukta koji zbog svoje nestabilnosti odmah prelazi u AA i dehidroaskorbat (DHA).

To je porodica enzima čiji se izoenzimi mogu podijeliti prema odjeljcima u kojima imaju najveću aktivnost, i to na: citosolne APX, APX vezane za tilakoidne membrane u kloroplastima, stromalne APX i APX u membranama mikrotjelešaca (peroksisoma i glioksisoma) (Noctor i Foyer, 1998).

Reakcija koju kataliziraju APX je:



PPX

PPX su enzimi koji imaju više supstrata, među kojima je i pirogalol. To su nespecifični enzimi koji koriste H_2O_2 za oksidacijske reakcije i time ga reduciraju do H_2O . Postoje različite izoforme pirogalol peroksidaze koje se nalaze u različitim staničnim odjeljcima, tako ih je moguće naći u citosolu, mitohondrijima, Golgijevim tjelešcima i dr. (Milošić, 2014).

2 OBRAZLOŽENJE TEME

Zbog specifičnih karakteristika nanočestica, nanotehnologija ima sve veću primjenu u brojnim industrijama. Od svih nanošestica, AgNP imaju najveću upotrebu te se koriste kao antibakterijsko sredstvo u oblozima za rane, kremama, uređajima u kućanstvu i industriji, medicinskim uređajima, kao pomoćne tvari u lijekovima i dr. Iako je njihova prisutnost u okolišu sve veća, malo se zna o njihovom utjecaju na okoliš i na ljudsko zdravlje.

Dosadašnja istraživanja pokazuju da AgNP imaju toksičan učinak na biljke, a kao mogući mehanizam njihove fitotoksičnosti navodi se oksidacijski stres.

Cilj ovoga istraživanja bio je ispitati oksidacijski stres kao mogući mehanizam toksičnosti AgNP, odnosno utvrditi uzrokuju li AgNP promjene u aktivnosti i ekspresiji izoformi antioksidacijskih enzima. Istraživanje će se provesti na biljnome modelu, a kao biljni model koristiti će se klijanci biljke duhana (*Nicotiana tabacum* L.). Klijanci biljke duhana tretirati će se s AgNP u koncentracijskom rasponu 25 – 150 μ M kroz sedam dana. Potom će se u ekstraktu biljnoga tkiva izmjeriti aktivnost antioksidacijskih enzima SOD, CAT, APX i PPX i analizirati razlike u ekspresiji njihovih izoformi. Dobiveni rezultati trebali bi pokazati uzrokuju li AgNP promjenu u aktivnosti i ekspresiji izoformi antioksidacijskih enzima, odnosno uzrokuju li oksidacijski stres u modelnom organizmu.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 MATERIJALI

3.1.1 Kemikalije

- AgNP-PVP, nanočestice srebra s polivinilpirolidonskom ovojnicom, Centar za istraživanje mora, IRB, Rovinj, pripremio dr. sc. Daniel Mark Lyons, IRB, Centar za istraživanje mora, Rovinj, Hrvatska
- Saharoza, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Mio-inozitol, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- kalijeve sol 2-(N-Morfolino)etansulfonske kiseline (MES, engl. 2-(N-Morpholino)-ethanesulfonic acid potassium salt), Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Vitamin B₁, tiamin, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- FeSO₄ željezov (II) sulfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- CaCl₂ x 2H₂O, kalcijev klorid dihidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Na₂EDTA, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- MgSO₄ x 7H₂O, magnezijev sulfat heptahidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- NH₄NO₃, amonijev nitrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- KNO₃, kalijev nitrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- H₃BO₃, borna kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- MnSO₄ x H₂O, manganov (II) sulfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- ZnSO₄ x 7H₂O, cinkov sulfat heptahidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- KI, kalijev jodid, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Na₂MoO₄ x 2H₂O, natrijev molibdat dihidrat Kemika, Zagreb, Hrvatska
- CuSO₄ x 5H₂O, bakrov sulfat pentahidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- CoCl₂ x 6H₂O, kobaltov klorid heksahidrat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- PVP-40, polivinilpirolidon, Merck, Darmstadt, Njemačka
- K₂HPO₄, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- KH₂PO₄, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- NaOCl, natrijev hipoklorit, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Metionin, Merck, Darmstadt, Njemačka

- NBT, nitroblue tetrazolon, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
- EDTA, etilendiamintetraoctene kiseline, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Riboflavin, Merck, Darmstadt, Njemačka
- SOD standard, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
- H₂O₂, vodikov peroksid, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Askorbinska kiselina, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Pirogalol, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Etanol, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Bromfenol plavo (*BromoPhenol Blue*, BFB), Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
- Tris-HCl, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Akrilamid/bisakrilamid, AA/Bis Merck, Darmstadt, Njemačka
- Amonijev peroksodisulfat, APS, Sigma Aldrich, St. Louis, SAD
- Tetrametiletilendiamin, TEMED, Merck, Darmstadt, Njemačka

3.1.2 Oprema

- mikropipete, Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- magnetska miješalica, MM-540, Tehnica, Železniki, Slovenija
- analitička vaga, Sartorius, Göttingen, Njemačka
- elektronička vaga, Sartorius, Göttingen, Njemačka
- pH-metar, PB-11, Sartorius, Göttingen, Njemačka
- *laminar-flow* uređaj, Heraeus, Hanau, Njemačka
- autoklav, Bari, Italija
- centrifuga, Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg, Njemačka
- vorteks, IKA MS3 basic, Straufen, Njemačka
- termomikser, Eppendorf Thermomixer Comfort, Hamburg, Njemačka
- UV-Vis spektrofotometar, Unicam UV4, Thermo Spectronic, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo
- tresilica za uzgoj biljaka – Edmund Bühler SM-30, Bodelshausen, Njemačka
- kadica za elektroforezu PROTEAN® II xi cell, Bio-Rad, Hercules, Kalifornija, SAD

3.2 METODE

3.2.1 Biološki pokus

Modelni organizam – duhan (*Nicotiana tabacum* L.)

Kao modelni organizam u ovom je istraživanju korišten duhan, *Nicotiana tabacum* L., iz porodice *Solanaceae*. Duhan je jedna od najviše kultiviranih neprehrambenih biljaka na Zemlji. Kao biljka iz porodice *Solanaceae*, duhan sadrži alkaloida, od kojih je najzastupljeniji nikotin. Biljka duhana brzo raste i dobro se prilagođava klimi i tlu, ima kratko regeneracijsko vrijeme i lako se transformira. Iz tih razloga se koristi u znanosti kao modelni organizam u istraživanjima u molekularnoj biologiji, staničnoj biologiji, kulturi tkiva i genetičkom inženjerstvu (Bajan, 2017).

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

Provedba biološkog pokusa

Biljke se u laboratorijskim uvjetima uzgajaju u sterilnoj okolini te je rad s biljkama proveden u *laminar-flow* uređaju za održavanje sterilne atmosfere. Za uzgoj biljaka korištena je specifična hranjiva podloga koju su razvili Murashige i Skoog (1962), tzv. MS hranjiva podloga, s točno određenom količinom mikro i makro nutrijenata, minerala, vitamina i organskih tvari. Za isključivanje i uzgoj u ovome pokusu se koristila hranjiva podloga MS^{1/2} – podloga prema Murashigeu i Skoogu s pola količine makroelemenata.

Za izradu 500 mL MS^{1/2} hranjive podloge pomiješane su tvari u količinama prikazanim u Tablici 1 te je uz pH-metar namješten pH na 5,6 pomoću 1 M HCl, a smjesa je potom autoklavirana.

Znanstvenici s Instituta Ruđer Bošković pripremili su čestice AgNP koje su stabilizirane omotačem od polivinilpirolidona (AgNP-PVP). U hranjivu podlogu MS^{1/2} dodane su AgNP-PVP u koncentracijama 25, 50, 75, 100 i 150 µM kojima su klijanci duhana bili izloženi sedam

dana. Također, u pokus je uključena i negativna kontrola, klijanci duhana koji nisu bili tretirani AgNP-PVP, već su rasli sedam dana u hranjivoj podlozi MS $\frac{1}{2}$ bez dodatka AgNP-PVP.

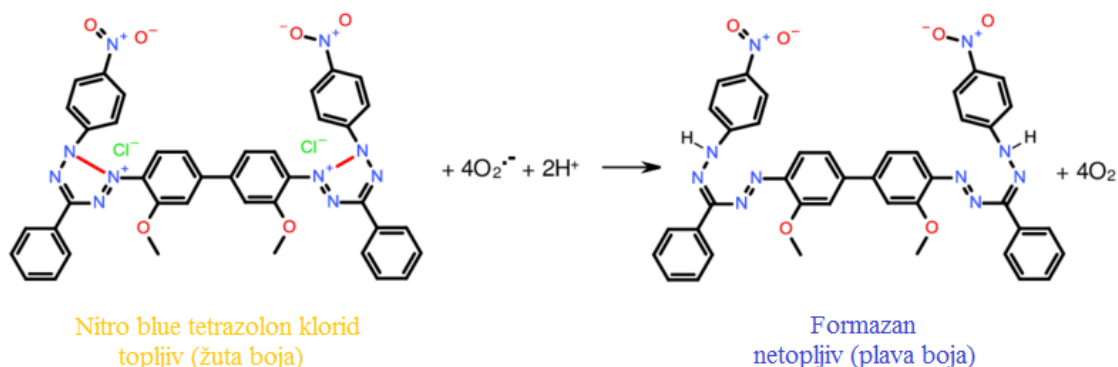
Tablica 1 Sastav MS $\frac{1}{2}$ hranjive podloge (za pripremu 500 mL)

Tvar	Količina
<i>Saharozza</i>	7,5 g
<i>MES</i>	0,25 g
<i>Mio-ionzitol</i>	0,05 g
<i>Vitamin B₁</i>	50 mL
<i>Makroelement FeSO₄</i>	1,25 mL
<i>Ostali makroelementi (CaCl₂ x 2H₂O, Na₂EDTA, MgSO₄ x 7H₂O, KH₂PO₄, NH₄NO₃, KNO₃)</i>	po 2,5 mL svaki
<i>Mikroelementi (H₃BO₃, MnSO₄ x H₂O, ZnSO₄ x 7H₂O, KI, Na₂MoO₄ x 2H₂O, CuSO₄ x 5H₂O, CoCl₂ x 6H₂O)</i>	po 500 μ L svaki

Priprema homogenata tkiva – proteinskog ekstrakta biljnoga tkiva

Nakon 7-dnevnog rasta na hranjivoj podlozi s AgNP-PVP ili samo na hranjivoj podlozi (negativna kontrola) biljno tkivo je liofilizirano, izvagano i stavljeno u tarionik držan na ledu kako bi se spriječila degradacija proteina. Potom je dodano malo PVP-40 (na vrh špatule), koji sprječava djelovanje biljnih fenolnih komponenti, i 1 mL hladnog 0,1 M K-fosfatnog pufera pH 7,0 te je biljno tkivo homogenizirano tučkom. Homogenat je potom centrifugiran 15 minuta na 14000 rpm pri +4°C, te njegov supernatant 60 minuta na 14000 rpm pri +4°C. U tako dobivenom proteinskom ekstraktu (uzorku) određivana je katalitička aktivnost antioksidacijskih enzima SOD, CAT, APX i PPX spektrofotometrijski, a ekspresije njihovih izoformi analizirane su poliakrilamid gel elektroforezom u nativnim uvjetima.

3.2.2 Određivanje aktivnosti SOD



Slika 3 Pretvorba NBT u formazan. Preuzeto iz: Bakr i Rahaman, 2016.

Aktivnost SOD određena je metodom prema Beauchampu i Fridovichu (1971). Za ovaj se postupak koristi nitroblue tetrazolon (NBT), kojega $\cdot\text{O}_2^-$ nastali fotokemijski reduciraju u netopivi, plavo obojeni formazan (Slika 3). SOD sprječava tu redukciju pa se aktivnost SOD može računati iz smanjenja koncentracije formazana koja se mjeri spektrofotometrijski.

Postupak određivanja aktivnosti SOD

U 800 μL reakcijske smjese, koja se sastojala od 13 mM metionina, 75 μM NBT i 0,1 M etilendiamintetraoctene kiseline (EDTA), dodano je 190 μL K-fosfatnog pufera pH 7,8 i 10 μL otopine 2 mM riboflavina. Potom je kiveta s reakcijskom smjesom promiješana i izložena djelovanju svjetlosti transiluminatora (15 W) u trajanju od 8 minuta. U prisutnosti $\cdot\text{O}_2^-$ NBT se reducira u netopivi plavo obojeni formazan koji ima apsorpcijski maksimum na valnoj duljini od 560 nm. Navedena smjesa koja nije bila izložena svjetlosti korištena je kao slijepa proba. Potom je pripremljena reakcijska smjesa u koju je umjesto K-fosfatnog pufera dodano 190 μL proteinskog ekstrakta (supernatant homogenata biljnoga tkiva - uzorak) i postupak određivanja aktivnosti SOD je ponovljen.

SOD standardi su pripremljeni u koncentracijskom rasponu od 0,025 do 1 U/ μL . SOD standardi su služili za izradu baždarne krivulje, na osnovu koje je izračunata aktivnost SOD za svaki uzorak. Aktivnost SOD-a izražena je kao μmol produkta/min/mg proteina odnosno U/ mg proteina.

3.2.3 Određivanje aktivnosti CAT

Određivanje aktivnosti CAT najčešće se provodi kontinuiranim UV-spektrofotometrijskim testom. Test se temelji na praćenju sniženja apsorbancije reakcijske smjese pri 240 nm (UV-područje), nastale kao rezultat enzimske razgradnje H₂O₂ koji pokazuje maksimum apsorpcije pri 240 nm (Aebi, 1984).

Postupak određivanja aktivnosti CAT

Reakcijska otopina za mjerenje katalitičke aktivnosti CAT sadržavala je 50 mM K-fosfatnog pufera pH 7,0, 10 mM H₂O₂ i uzorak (proteinski ekstrakt) te je mjeren pad apsorbancije (zbog razgradnje H₂O₂) svakih 10 sekundi tijekom 2 minute pri valnoj duljini od 240 nm. Aktivnost CAT izražena je kao količina potrošenog H₂O₂ u μmolu po minuti (μmol/min = 1 U) po miligramu proteina (U/mg proteina), a izračunata je uz korištenje odgovarajućeg ekstinkcijskog koeficijenta (ε₂₄₀ = 40 mM⁻¹ cm⁻¹).

Aktivnost CAT izračunata je prema izrazima:

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A_{s.v.} \times 60 \times V_{r.s.}}{V_{uz.} \times \epsilon \times l} \quad [\mu\text{mol produkta /min/mg proteina}]$$

$$\text{CAT} = \frac{\Delta A_{s.v.} \cdot \mu\text{mol/min mL}}{\text{mg proteina/mL}} \quad [\mu\text{mol produkta /min/mg proteina}]$$

$$\lambda = 240 \text{ nm}$$

ΔA_{s.v.} = srednja vrijednost promjene apsorbancije u 10 s

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

V_{uz.} = volumen uzorka (0,03 mL)

ε = ekstinkcijski koeficijent (40 mM⁻¹ cm⁻¹)

l = dužina optičkog puta (1 cm).

Aktivnost CAT je izražena u jedinici μmol produkta/min/mg proteina.

3.2.4 Određivanje aktivnosti APX

Aktivnost APX mjerena je metodom prema Nakano i Asada (1981). Prema toj metodi se aktivnost APX izračunava iz smanjenja koncentracije enzimskog supstrata, koji je u ovom slučaju askorbinska kiselina, a koja ima maksimum apsorpcije na 290 nm.

Postupak određivanja aktivnosti APX

Prvo su pripremljene otopine 10 mM EDTA, 50 mM K-fosfatni pufer pH 7,0, 12 mM H₂O₂ i 10 mM askorbinska kiselina te je pripremljen pufer A sastavljen od 50 mL 50 mM K-fosfatnog pufera pH 7,0 i 500 μL 10 mM EDTA. Slijepa proba se sastojala od 800 μL pufera A, 180 μL 0,1 M K-fosfatnog pufera, 10 μL 10 mM askorbinske kiseline i 10 μL 12 mM H₂O₂. Reakcijska smjesa za mjerenje aktivnosti APX sastojala se od 800 μL pufera A, 10 μL mM askorbinske kiseline i 10 μL 12 mM H₂O₂ u koju je dodano 180 μL proteinskog ekstrakta (uzorak). Zbog oksidacije askorbinske kiseline, aktivnost je određena mjereći pad apsorbancije na valnoj duljini od 290 nm svake sekunde tijekom 15 sekundi. Aktivnost APX izračunata je prema izrazima:

$$APX = \frac{\Delta A_{s.v.} \times 4 \times V_{r.s.}}{V_{uz.} \times \epsilon \times l} \quad [\mu\text{mol produkta /min/mg proteina}]$$

$$APX = \frac{\Delta A \text{ } \mu\text{mol/min mL}}{\text{mg proteina/mL}} \quad [\mu\text{mol produkta /min/mg proteina}]$$

$$\lambda = 290 \text{ nm}$$

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

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

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

$V_{uz.}$ - volumen uzorka (180 μL)

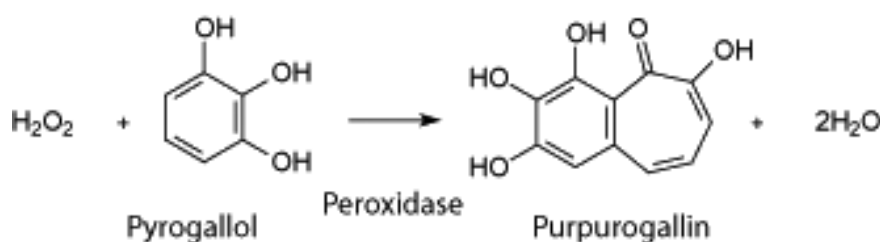
ϵ - molarni apsorpcijski koeficijent (2,8 mM⁻¹ cm⁻¹)

l - duljina optičkog puta (1 cm).

Aktivnost APX je izražena u jedinici μmol produkta/min/mg proteina.

3.2.5 Određivanje aktivnosti PPX

Katalitička aktivnost PPX mjerena je metodom prema Chance i Maehlyju (1955). Tom metodom se aktivnost PPX mjeri na principu porasta koncentracije purpurogalina koji ima maksimum apsorpcije na 430 nm. On se stvara iz pirogalola pomoću PPX uz redukciju H_2O_2 (Slika 4).



Slika 4 Redukcija H_2O_2 pirogalolom uz nastajanje purpurogalina. Preuzeto s: www.sigmaaldrich.com.

Postupak određivanja aktivnosti PPX

Reakcijska smjesa (950 μL) sastojala se od 50 μL proteinskog ekstrakta (uzorak), 0,1 M K-fosfatnog pufera pH 7,0, 20 mM pirogalola te 1 mM H_2O_2 , dodanog u smjesu neposredno prije mjerenja. Aktivnost PPX određena je mjereći porast apsorbanције svakih 15 sekundi tijekom 1 min na valnoj duljini od 430 nm. Za slijepu probu korišten je 0,1 M K-fosfatni pufer pH 7,0. Aktivnost PPX izražena je prema jednadžbama:

$$\text{PPX} = \frac{\Delta A_{s.v.} \times 4 \times V_{r.s.}}{V_{uz.} \times \epsilon \times l} \quad [\mu\text{mol produkta /min/mg proteina}]$$

$$\text{PPX} = \frac{\Delta A \text{ } \mu\text{mol/min mL}}{\text{mg proteina/mL}} \quad [\mu\text{mol produkta /min/mg proteina}]$$

$$\lambda = 430 \text{ nm}$$

$\Delta A_{s.v.}$ - srednja vrijednost promjene apsorbancije pri 430 nm u 15 s

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

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

$V_{uz.}$ - volumen uzorka (50 μ L)

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

l - duljina optičkog puta (1 cm).

Aktivnost PPX je izražena u jedinici μmol produkta/min/mg proteina.

3.2.6 Razdvajanje proteina nativnom poliakrilamid gel elektroforezom

Elektroforeza je metoda razdvajanja čestica u električnom polju na temelju njihove veličine, naboja i oblika. Elektroforetski razdvojene čestice se u tekućini nakon prestanka djelovanja električnog polja opet pomiješaju pa su potrebni nosači koji ih drže u odvojenim zonama. U poliakrilamid gel elektroforezi (PAGE) se za te potrebe koristi nosač poliakrilamidni gel. Elektroforeza u nativnim uvjetima primjenjuje se kada je potrebno sačuvati interakcije među proteinskim podjedinicama i njihovu nativnu konformaciju, što omogućava analizu različitih izoformi enzima koji imaju različitu elektroforetsku pokretljivost ovisno o gustoći naboja molekule, molekulskoj masi i izoelektričnoj točki (Krsnik-Rasol i sur., 2004).

Postupak razdvajanja proteina nativnom PAGE

Za nativnu elektroforezu pripremljene su otopine za gelove prema uputama (Tablica 2) i izlivena u sendvič sastavljen od staklenih ploča koje su prethodno očišćene 96%-tnim etanolom, kako je opisano u Krsnik-Rasol i sur. (2004). Nakon polimerizacije gelova, staklene ploče su prenesene na elektrodni nosač te je u kadicu dodan elektrodni pufer. Proteinski ekstrakt (uzorak) je pomiješan s 0,5%-tnom otopinom saharoze i boje bromfenol plavo (engl. *BromoPhenol Blue*, BFB) te je nakon toga nanesen u jažice. Saharoza služi kako bi uzorcima povećala gustoću i osigurala njihovo sjedanje u jažice, a boja BFB olakšava praćenje tijekom same elektroforeze. Na gel je nanoseno 100 μ L svakog od uzorka po jažici. Elektroforeza je provedena u kadici na $+4^{\circ}\text{C}$; prvih 45 minuta tekla je pri 100 V kako bi uzorci ušli u gel za razdvajanje, nakon čega je napon povišen na 220 V do kraja elektroforeze.

Tablica 2 Priprema gelova za elektroforezu

	gel za razdvajanje (10%)	gel za koncentriranje (4%)
<i>reH₂O</i>	16,8 mL	6,1 mL
<i>Tris-HCl</i>	1,5 M; pH 8,8; 10 mL	0,5 M; pH 6,8; 2,5 mL
<i>akrilamid/bisakrilamid (AA/Bis)</i>	13,2 mL	1,3 mL
<i>10% amonijev peroksodisulfat (APS)</i>	200 μ L	50 μ L
<i>tetrametiletilendiamin (TEMED)</i>	20 μ L	10 μ L

Nakon elektroforeze uslijedilo je tretiranje gelova i vizualizacija vrpce ovisno o enzimu koji se istražuje.

3.3 STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Za statističku obradu rezultata korištena je jednosmjerna analiza varijance (ANOVA), potom je proveden post-hoc Duncan test u računalnom programu Statistica 12.0 (Stat Soft Inc., SAD). Razina značajnosti postavljena je na $p < 0,05$. Na slikama rezultata katalitičke aktivnosti pojedinog enzima stupci označeni različitim slovima međusobno se statistički značajno razlikuju.

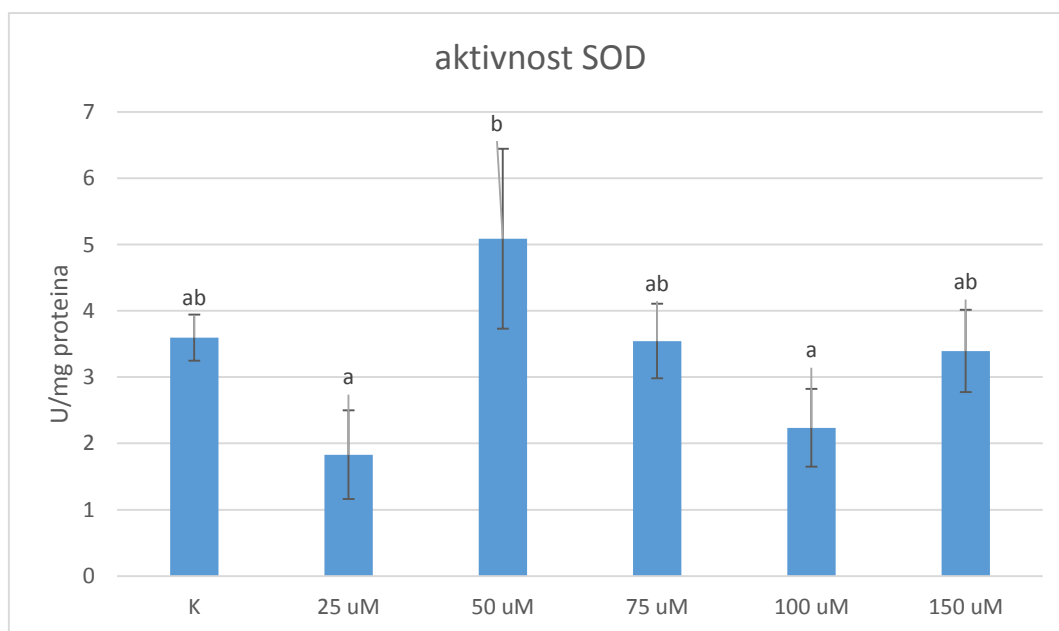
4 REZULTATI I RASPRAVA

U ovom istraživanju klijanci modelne biljke duhana bili su izloženi 7 dana AgNP-PVP u koncentracijama: 25, 50, 75, 100 i 150 μM . Nakon toga sakupljeno je biljno tkivo i pripremljeni su proteinski ekstrakti u kojima je određena aktivnosti antioksidacijskih enzima SOD, CAT, APX i PPX, a nativnom elektroforezom je analizirana ekspresija njihovih izoformi.

4.1 SOD

SOD su enzimi koji uklanjaju slobodni $\cdot\text{O}_2^-$ stvarajući O_2 i H_2O_2 . Time pomažu stanici u smanjenju razine ROS-ova pa time i oksidacijskog stresa.

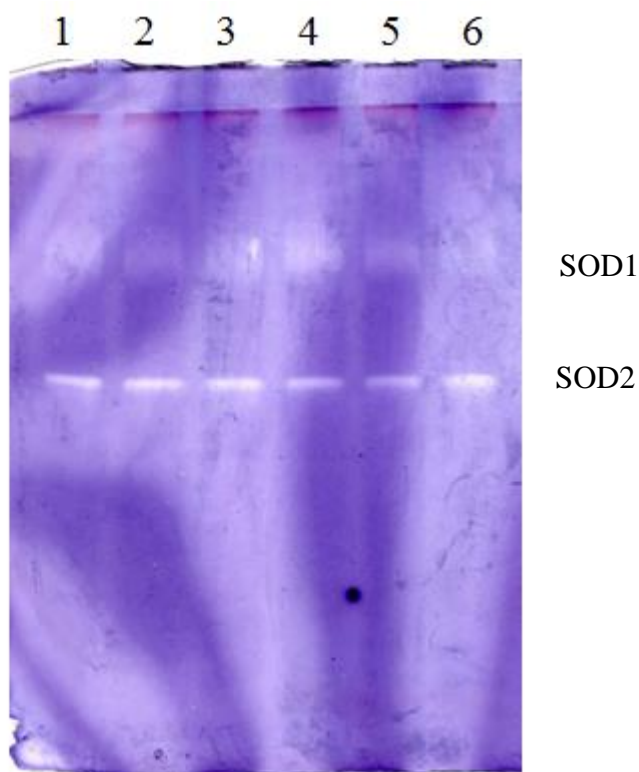
U ovom istraživanju tretman s AgNP-PVP nije uzrokovao statistički značajne promjene u aktivnosti SOD u usporedbi s negativnom kontrolom (klijanci koji nisu bili izloženi AgNP-PVP; Slika 5). Ipak, može se primijetiti da je najniža koncentracija AgNP-PVP (25 μM) najviše snizila aktivnost SOD, što se može pripisati trošenju SOD na uklanjanje $\cdot\text{O}_2^-$. Tretman s AgNP-PVP u koncentraciji 50 μM AgNP uzrokovao je najveće povećanje u aktivnosti SOD u odnosu na kontrolne klijance, iako ono nije bilo statistički značajno.



Slika 5 Katalitička aktivnost SOD u klijanaca duhana nakon tretmana s AgNP-PVP u koncentracijama 25, 50, 75, 100 i 150 μM kroz 7 dana. K – kontrola.

Slika 6 prikazuje izoforme SOD-a proteinskog ekstrakta klijanaca duhana razdvojenih nativnom elektroforezom. U svim uzorcima jasno se mogu uočiti dvije izoforme, SOD1 i

SOD2, a SOD2 je izraženija izoforma. Razdvojene izoforme SOD na gelu pokazuju da je vrpca izoforme SOD2 intenzivnija nakon tretmana sa 150 μM AgNP-PVP u odnosu na kontrolu (klijance koji nisu tretirani s AgNP-PVP).



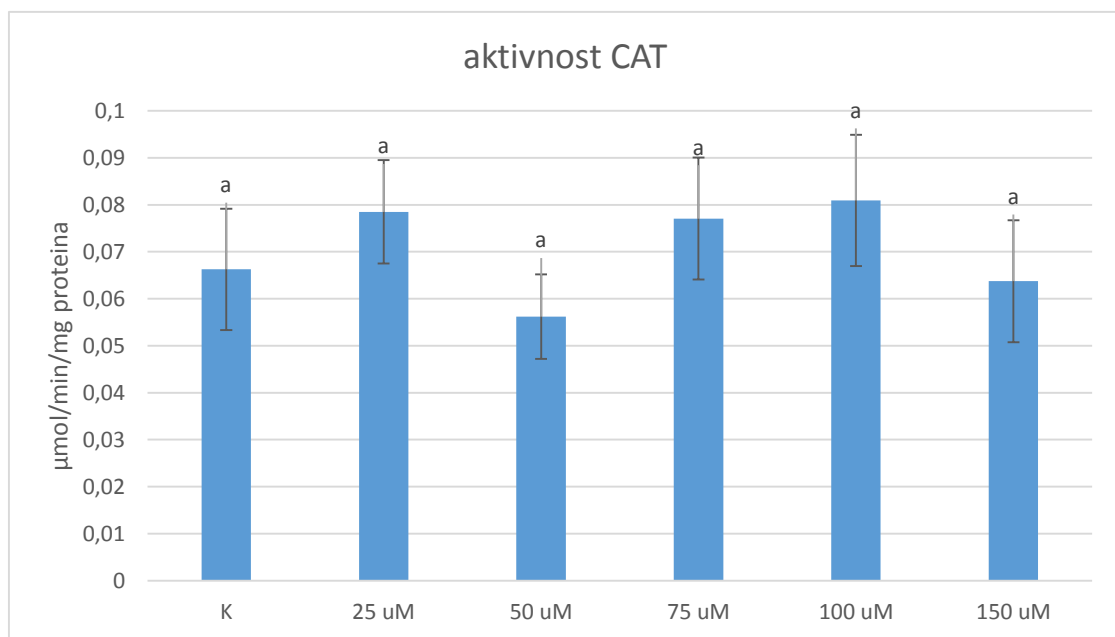
Slika 6 Ekspresija izoformi SOD nakon razdvajanja nativnom PAGE u klijanaca duhana tretiranim AgNP-PVP; 1 – kontrola; 2 – 25 μM AgNP-PVP; 3 – 50 μM AgNP-PVP; 4 – 75 μM AgNP-PVP; 5 – 100 μM AgNP-PVP; 6 – 150 μM AgNP-PVP.

U ovome istraživanju primijećena je promjena katalitičke aktivnosti SOD-a te promjena u ekspresiji izoformi SOD-a u klijanaca duhana nakon tretmana s AgNP-PVP, no ona nije bila značajna. S druge strane druga istraživanja pokazala su da AgNP uzrokuju promjenu u aktivnosti SOD. Tako je tretman s AgNP-PVP u koncentracijama do 4000 mg/L (što je oko 37 mM) kroz 7 dana uzrokovao povećanje aktivnosti SOD u klijanaca ricinusa (*Ricinus communis* L.) (Yasur i Rani, 2013). Istraživanje na vodenom zumbulu (*Eichhornia crassipes* L.) zabilježilo je znatnu inhibiciju SOD nakon izlaganja AgNP-PVP u koncentracijama od 1 – 100 mg/L (oko 0,9 mM) kroz 5 dana (Rani i sur., 2016). Razlike u dobivenim rezultatima mogu se pripisati različitom modelnom organizmu (biljnoj vrsti), ali i duljini tretmana te koncentraciji AgNP-PVP (u ovome istraživanju koncentracije AgNP-PVP su puno niže).

4.2 CAT

CAT su antioksidacijski enzimi koji neutraliziraju H_2O_2 iz stanice konvertirajući ga u H_2O i O_2 . U ovome istraživanju u proteinskom ekstraktu klijanaca duhana nakon tretmana s AgNP-PVP katalitička aktivnost ovih enzima određivala se spektrofotometrijski, mjerenjem smanjenja koncentracije H_2O_2 .

Katalitička aktivnost CAT u klijanaca tretiranih AgNP-PVP (25-150 μM) kroz 7 dana nije se statistički značajno razlikovala u odnosu na kontrolne klijance, klijance koji nisu bili tretirani s AgNP-PVP (Slika 7).

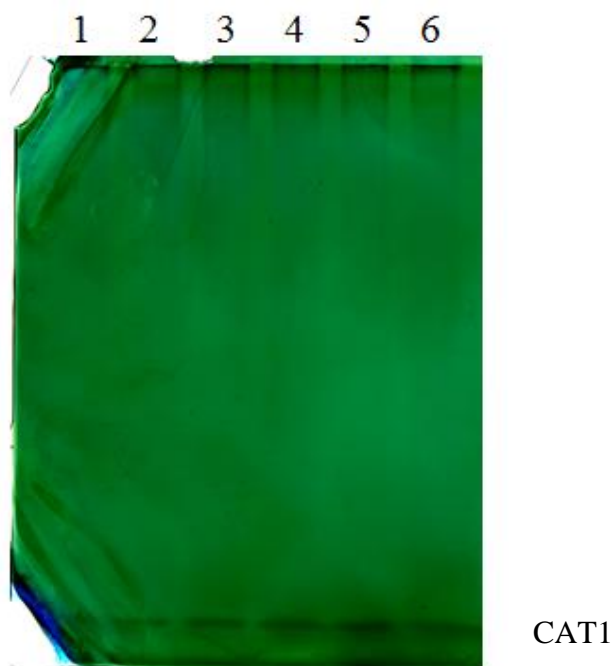


Slika 7 Katalitička aktivnost CAT u klijanaca duhana nakon tretmana s AgNP-PVP u koncentracijama 25, 50, 75, 100 i 150 μM kroz 7 dana. K – kontrola.

Slika 8 prikazuje gel dobiven nativnom elektroforezom proteinskog ekstrakta klijanaca duhana nakon tretmana s AgNP-PVP. Iako izoforme CAT enzima nisu jasno vidljive, može se razaznati izoforma CAT1. Slabija ekspresija izoformi CAT može se pripisati tome što u klijanaca nisu razvijeni peroksisomi pa su koncentracije CAT niže.

U istraživanju koje je provela Milošić (2014) s AgNP-PVP na korječićima luka (*Allium cepa* L.) zabilježeno je smanjenje aktivnosti CAT nakon 72-satnog tretmana s AgNP-PVP u koncentracijama 50 – 500 μM . Hong i sur. (2015) proveli su istraživanje utjecaja nanočestica bakra (CuNP) na aktivnost CAT u zelenoj salati (*Lactuca sativa* L.) i lucerni (*Medicago sativa*

L.) te su također zabilježili smanjenje katalitičke aktivnosti CAT nakon tretmana s CuNP u koncentracijama 5 – 20 mg/L kroz 15 dana. Stoga se može zaključiti da nanočestice djeluju na CAT (mijenjaju njihovu aktivnost). U ovome istraživanju to nije zabilježeno stoga što je provedeno na klijancima, koji još nisu razvili peroksisome, glavne organele u kojima se nalaze ovi enzimi.

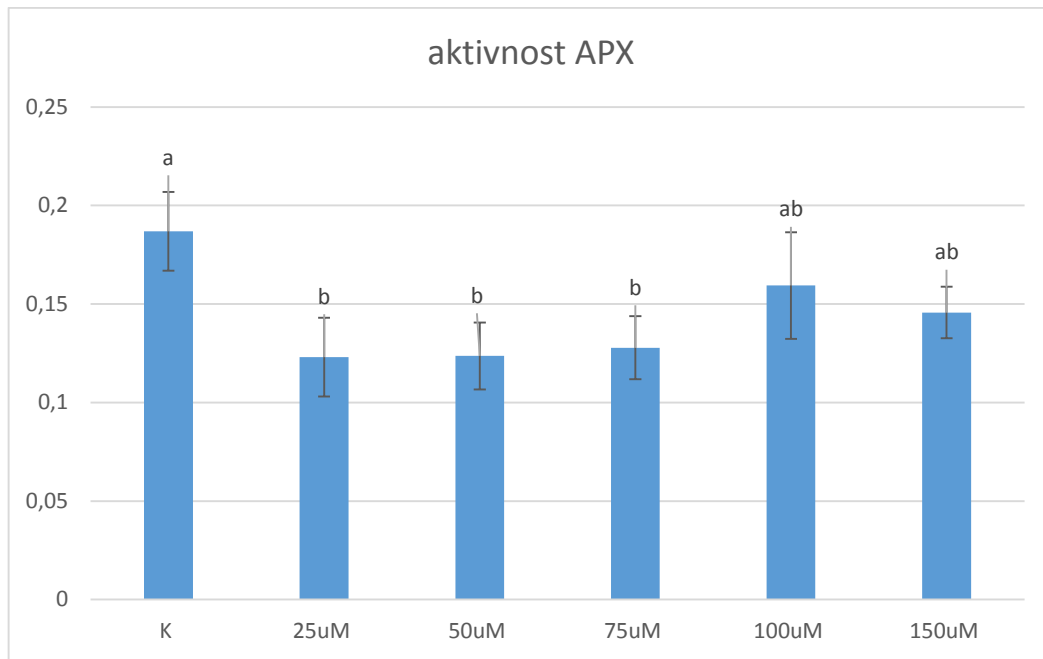


Slika 8 Ekspresija izoformi CAT nakon razdvajanja nativnom PAGE u klijanaca duhana tretiranim AgNP-PVP. 1 – kontrola; 2 – 25 μM AgNP-PVP; 3 – 50 μM AgNP-PVP; 4 – 75 μM AgNP-PVP; 5 – 100 μM AgNP-PVP; 6 – 150 μM AgNP-PVP.

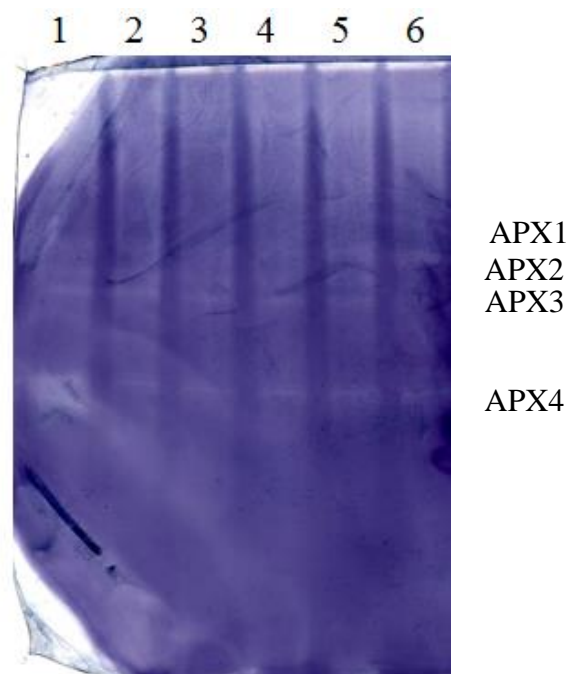
4.3 APX

APX su enzimi koji koriste askorbinsku kiselinu kao donora elektrona za redukciju H_2O_2 do H_2O . Njihovu katalitičku aktivnost moguće je mjeriti spektrofotometrijski praćenjem smanjenja koncentracije askorbinske kiseline.

Tretman s AgNP-PVP u svim koncentracijama (25-150 μM) uzrokovao je smanjenje katalitičke aktivnosti APX u klijanaca duhana u odnosu na kontrolu, iako je smanjenje bilo statistički značajno samo za tretmane s 25, 50 i 75 μM AgNP-PVP ($p < 0,05$; Slika 9).



Slika 9 Katalitička aktivnost APX u klijanaca duhana nakon tretmana s AgNP-PVP u koncentracijama 25, 50, 75, 100 i 150 µM kroz 7 dana. K – kontrola.



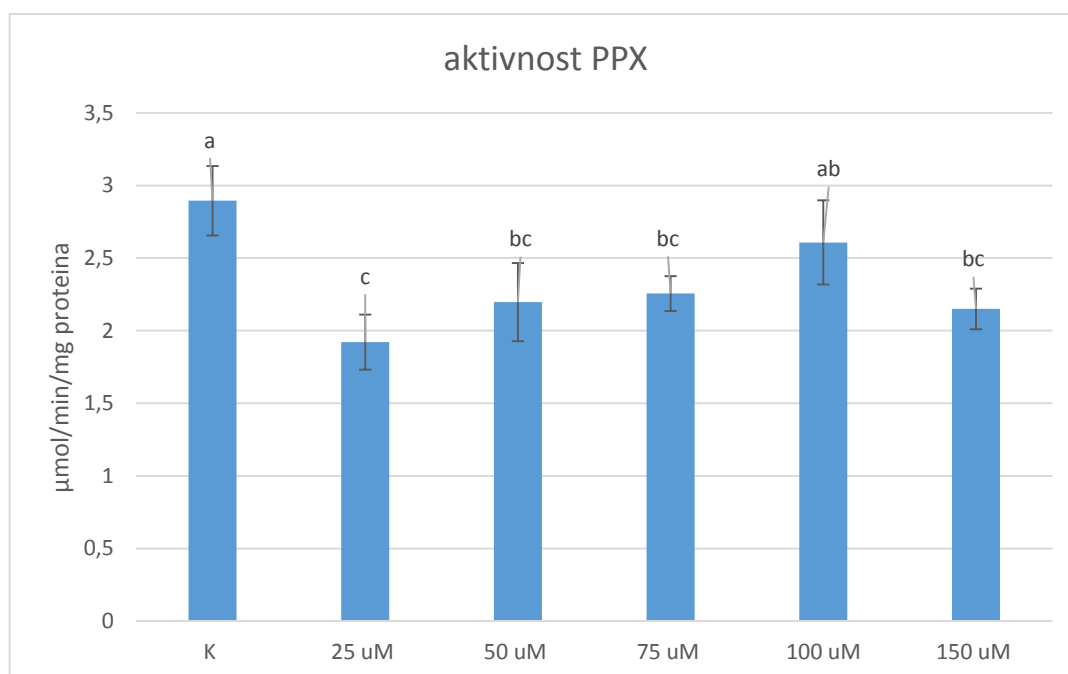
Slika 10 Ekspresija izoformi APX nakon razdvajanja nativnom PAGE u klijanaca duhana tretiranim AgNP-PVP. 1 – kontrola; 2 – 25 µM AgNP-PVP; 3 – 50 µM AgNP-PVP; 4 – 75 µM AgNP-PVP; 5 – 100 µM AgNP-PVP; 6 – 150 µM AgNP-PVP.

Na Slici 10 prikazani su rezultati razdvajanja izoenzima APX nativnom elektroforezom. Na slici gela vidljive su 4 jednako izražene izoforme APX enzima u klijanaca duhana nakon tretmana s AgNP-PVP i u kontrolnim klijanacima.

U istraživanju koje je provela Milošić (2014) u korijenčićima luka (*A. cepa*) nakon tretmana s AgNP-PVP u koncentracijama 25 – 500 μM kroz 72 sata nije zabilježena promjena katalitičke aktivnosti APX. U već spomenutom istraživanju na zelenoj salati i lucerni tretman s CuNP (koncentracije 5 – 20 mg/L, 15 dana) doveo je do porasta katalitičke aktivnosti APX (Hong i sur., 2015). Stoga se može zaključiti da tretman s nanočesticama uzrokuje promjenu u aktivnosti APX, no ta promjena ovisi o vrsti čestica (bakar ili srebro), duljini tretmana ili pak modelnom organizmu (biljci).

4.4 PPX

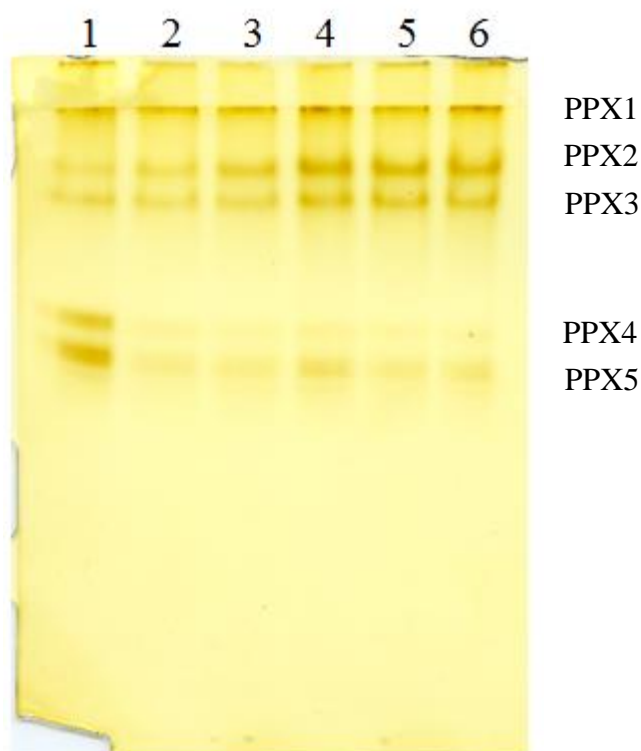
PPX su enzimi koji sudjeluju u smanjenju oksidacijskog stresa u stanicama reducirajući H_2O_2 uz supstrat pirogalol kojeg oksidiraju u purpurogalin. Stoga se katalitička aktivnost tih enzima može odrediti spektrofotometrijski mjerenjem porasta koncentracije produkta purpurogalina.



Slika 11 Katalitička aktivnost PPX u klijanaca duhana nakon tretmana s AgNP-PVP u koncentracijama 25, 50, 75, 100 i 150 μM kroz 7 dana. K – kontrola.

Rezultati ovoga istraživanja pokazuju da je tretman s AgNP-PVP uzrokovao smanjenje aktivnosti PPX u klijanaca duhana (Slika 11). Tretman sa svim koncentracijama AgNP-PVP uzrokovao je značajan pad aktivnosti PPX u klijanaca duhana ($p < 0,05$), osim tretmana sa 100 μM AgNP-PVP, kod kojega je zabilježena tek neznatno niža aktivnost PPX u odnosu na negativnu kontrolu (klijance koji nisu tretirani s AgNP-PVP).

Na Slici 12 prikazani su rezultati razdvajanja izoenzima PPX nativnom elektroforezom iz proteinskih ekstrakata klijanaca duhana nakon tretmana s AgNP-PVP i kontrolnih klijanaca. Vidljivo je 5 izoformi PPX koje su se razdvojile u gelu, PPX1, PPX2, PPX3, PPX4 i PPX5. Intenzitet vrpce (izoformi) PPX4 i PPX5 je izraženiji u kontrolnih klijanaca nego u biljaka koje su tretirane s AgNP-PVP. Izoforme PPX1, PPX2 i PPX3 slabije su vidljive u kontrolnih klijanaca i u klijanaca tretiranih s nižim koncentracijama AgNP-PVP, a izraženije nakon tretmana s koncentracijama AgNP-PVP 75, 100 i 150 μM .



Slika 12 Ekspresija izoformi PPX nakon razdvajanja nativnom PAGE u klijanaca duhana tretiranim AgNP-PVP. 1 – kontrola; 2 – 25 μM AgNP; 3 – 50 μM AgNP; 4 – 75 μM AgNP; 5 – 100 μM AgNP; 6 – 150 μM AgNP.

Prema istraživanjima koja su provedena na duhanu (Matić, 2018) i vodenom zumbulu (vodeni zumbul bio je izložen AgNP-PVP u koncentracijama 1-100 mg/L kroz 5 dana) (Rani i sur., 2016) tretman s AgNP-PVP, dovodi do pada katalitičke aktivnosti PPX. U drugim je istraživanjima tretman s AgNP-PVP u korjenčićima luka (72-satni tretman s AgNP-PVP u koncentracijama 50-500 μ M) (Milošić, 2014) i klijancima ricinusa (7-dnevni tretman s AgNP-PVP u koncentraciji do 4000 mg/L) (Yasur i Rani, 2013) izazvao porast katalitičke aktivnosti PPX. Uloga PPX u stanicama nije samo uklanjanje ROS, nego i sudjelovanje u lignifikaciji, suberizaciji, katabolizmu auksina i zarastanju rana (Hiraga i sur., 2001) pa se ovi različiti rezultati mogu objasniti tom činjenicom. Ipak, nedvojbeno je da je u navedenim istraživanjima tretman s AgNP izazvao promjenu katalitičke aktivnosti PPX enzima što je u sukladnosti s rezultatima koji su dobiveni u ovome istraživanju. Ovo je istraživanje potvrdilo da AgNP uzrokuju promjenu aktivnosti PPX, ali je također pokazano da tretman s AgNP dovodi do različite ekspresije njegovih izoformi.

5 ZAKLJUČAK

U provedenom istraživanju tretman klijanaca duhana s AgNP-PVP uzrokovao je promjenu katalitičke aktivnosti antioksidacijskih enzima SOD, CAT, APX i PPX i promjenu ekspresije njihovih izoformi te se može zaključiti da je oksidacijski stres jedan od mehanizama toksičnosti AgNP-PVP.

6 LITERATURA

Aebi H. Catalase in vitro. U: *Methods in Enzymology*. Packer L, urednik, Oxford, Academic press, 1984, str. 121–126.

Afzal F, Khurshid R, Ashraf M, Kazi AG. Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Response to Pathogens and Wounding. U: *Oxidative Damage to Plants*. Ahmad P, urednik, Oxford, Academic Press, 2014, str. 397-424.

Ahlberg S, Antonopulos A, Diendorf J, Dringen R, Epple M, Flöck R, Goedecke W, Graf C, Haberl N, Helmlinger J, Herzog F, Heuer F, Hirn S, Johannes C, Kittler S, Köller M, Korn K, Kreyling WG, Krombach F, Lademann J, ... Zellner R. PVP-coated, negatively charged silver nanoparticles: A multi-center study of their physicochemical characteristics, cell culture and in vivo experiments. *Beilstein J Nanotechnol*, 2014, 5, 1944–1965.

Arora S, Jain J, Rajwade JM, Paknikar KM. Cellular responses induced by silver nanoparticles: *In vitro* studies. *Toxicol Lett*, 2008, 179, 93-100.

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

Bakr AR, Rahaman S. Electrochemical efficacy of a carboxylated multiwalled carbon nanotube filter for the removal of ibuprofen from aqueous solutions under acidic conditions. *Chemosphere*, 2016, 153, 508-520.

Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*, 1971, 44, 276-287.

Brabazon D. Nanostructured Materials. U: *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*. Hashmi S, urednik, Amsterdam, Elsevier, 2016. str. 1524-1570.

Chance B, Maehly AC. Assay of catalases and peroxidases. U: *Methods in Enzymology*. Colowick SP, Kaplan NO, urednici, New York, Academic press, 1955, str. 764–775.

Hiraga S, Sasaki K, Ito H, Ohoshi Y, Matsui H. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42, 462-468.

Hong J, Rico CM, Zhao L, Adeleye AS, Keller AA, Peralta-Videa JR, Gardea-Torresdey J. Toxic effects of copper-based nanoparticles or compounds to lettuce (*Lactuca sativa*) and alfalfa (*Medicago sativa*). *Environ Sci: Process Impacts*, 2015, 17, 177-185.

Horseradish Peroxidase (HRP) Enzymes, <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/technical-article/protein-biology/enzyme-activity-assays/peroxidase-enzymes>, pristupljeno 27. 9. 2021.

Huang H, Ullah F, Zhou D-X, Yi Mand Zhao Y. Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses. *Front Plant Sci*, 2019, 10, 800.

Khan Z, Upadhyaya H. Impact of Nanoparticles on Abiotic Stress Responses in Plants: An Overview. U: *Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms*. Tripathi DK, Ahmad P, Sharma S, Chauhan DK, Dubey NK, urednici, New York, Academic Press, 2019, str. 305-322.

Krsnik-Rasol M, Balen B, Maček B, Pavoković D. Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2004.

Manganese Superoxide Dismutase (MnSOD), 2019., <https://chem.libretexts.org/>, pristupljeno 27. 9. 2021.

McShan D, Ray PC, Yu H, Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *J Food Drug Anal*, 2014, 22, 116-127.

Mehla N, Sindhi V, Josula D, Bisht P, Wani SH. An Introduction to Antioxidants and Their Roles in Plant Stress Tolerance. U: *Reactive Oxygen Species and Antioxidant Systems in Plants: Role and Regulation under Abiotic Stress*. Khan M, Khan N, urednici, Singapur, Springer, 2017, str. 1-23.

Matić D. Fitotoksični učinci nanočestica srebra stabiliziranih s različitim omotačima na duhan (*Nicotiana tabacum* L.). Diplomski rad, Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2018.

Mijović B. Nano - mnoštvo rizika i koristi. *Sigurnost*, 2015, 57, 205-209.

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

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

Nakano Y, Asada K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 1981, 22, 867-880.

Nanomaterials, 2021., <https://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/sya-nano/index.cfm>, pristupljeno 27. 9. 2021.

Noctor G, Foyer CH. Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu Rev Plant Biol*, 1998, 49, 249-279.

Rani PU, Yasur J, Loke Karthik S, Dutta D. Effect of synthetic and biosynthesized silver nanoparticles on growth, physiology and oxidative stress of water hyacinth: *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms. *Acta Physiol Plant*, 2016, 38, 58.

Reaction mechanism of NBT with superoxide to form NBT-Formazan and diatomic, 2016, https://www.researchgate.net/figure/fig-S8-Reaction-mechanism-of-NBT-with-superoxide-to-form-NBT-Formazan-and-diatomic_fig2_299486916, pristupljeno 27. 9. 2021.

Sharma I, Ahmad P. Catalase: A Versatile Antioxidant in Plants. U: Oxidative Damage to Plants. San Diego, Academic Press, 2014, str. 131-148.

Stensberg MC, Wei Q, McLamore ES, Porterfield DM, Wei A, Sepúlveda MS. Toxicological studies on silver nanoparticles: challenges and opportunities in assessment, monitoring and imaging. *Nanomedicine*, 2011, 6, 879–898.

Tkalec M, Stefanić PP, 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*, 2014, 9(1), e87582.

What are nanoparticles? Definition, size, uses and properties, <https://www.twi-global.com/technical-knowledge/faqs/what-are-nanoparticles>, pristupljeno 27. 9. 2021.

Yasur J, Rani PU. Environmental effects of nanosilver: impact on castor seed germination, seedling growth, and plant physiology. *Environ Sci Pollut Res*, 2013, 20, 8636-8648.

Younus H. Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *Int J Health Sci*, 2018, 12, 88–93.

Zhang XF, Liu ZG, Shen W, Gurunathan S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int J Mol Sci*, 2016, 17, 1534.

7 SAŽETAK

Sažetak

Nanočestice srebra (AgNP) zbog svojih specifičnih svojstava imaju široku upotrebu, no trenutno nema puno saznanja o njihovom potencijalno toksičnom utjecaju na okoliš i čovjeka. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati uzrokuju li AgNP povećanu razinu oksidacijskog stresa, kao jednog od mogućih mehanizama njihove toksičnosti. Modelni organizam, klijanci duhana (*Nicotiana tabacum* L.) tretirani su AgNP stabiliziranim s omotačem od polivinilpirolidona (AgNP-PVP) u koncentracijama od 25, 50, 75, 100 i 150 μM sedam dana. Nakon tretmana u proteinskom ekstraktu praćena je aktivnost i ekspresija izoformi antioksidacijskih enzima: superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), askorbat peroksidaze (APX) i pirogalol peroksidaze (PPX). Katalitička aktivnost enzima SOD, CAT, APX i PPX određena je spektrofotometrijski, a njihove izoforme su analizirane nativnom elektroforezom na poliakrilamidnom gelu (PAGE). Dobiveni rezultati obrađeni su statistički (Duncan test, razina značajnosti $p < 0,05$).

Tretman s AgNP-PVP nije imao značajniji utjecaj na aktivnost enzima SOD i CAT u klijanaca duhana, ali je uzrokovao značajno smanjenje aktivnosti APX i PPX u usporedbi s negativnom kontrolom (klijancima koji nisu bili izloženi AgNP-PVP). Također, nakon tretmana s AgNP-PVP u klijanaca duhana uočena je različita ekspresija izoformi PPX u odnosu na kontrolu. Povećana ekspresija izoformi PPX1 i PPX2 zabilježena je u klijanaca koji su bili izloženi 75, 100 i 150 μM AgNP-PVP, dok je najveća ekspresija izoformi PPX4 i PPX5 zabilježena u kontroli. AgNP-PVP nisu imale značajniji učinak na ekspresiju izoformi ostalih ispitivanih enzima.

Dobiveni rezultati pokazuju da AgNP-PVP utječu na katalitičku aktivnosti i ekspresiju izoformi enzima koji su uključeni u antioksidacijsku obranu u biljci duhana. Stoga se može zaključiti da je oksidacijski stres uključen u mehanizam toksičnosti AgNP-PVP.

Summary

Due to their specific properties silver nanoparticles (AgNP) have numerous applications. However, there is currently little knowledge about their potentially toxic effects on the environment and humans. The aim of this study was to examine whether AgNPs cause increased levels of oxidative stress, as one of the possible mechanisms of their toxicity. Model organism tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seedlings were treated with AgNP coated with polyvinylpyrrolidone (AgNP-PVP) at concentrations of 25, 50, 75, 100 and 150 μM for seven days. After the treatment, activity and expression of isoforms of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and pyrogallol peroxidase (PPX) in plant protein extracts were monitored. The catalytic activity of the enzymes SOD, CAT, APX and PPX was determined spectrophotometrically, and their isoforms were analyzed by native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The obtained results were statistically analysed (Duncan test, significance level $p < 0.05$).

Treatment with AgNP-PVP had no significant effect on SOD and CAT enzyme activity in tobacco seedlings, however caused a significant reduction in APX and PPX activity compared to the negative control (seedlings that were not exposed to AgNP-PVP). Also, after treatment with AgNP-PVP in tobacco seedlings different expression of PPX isoforms was observed compared to the negative control. Increased expression of PPX1 and PPX2 isoforms was observed in tobacco seedling exposed to 75, 100, and 150 μM AgNP-PVP, while the highest expression of PPX4 and PPX5 isoforms was observed in the negative control. AgNP-PVP did not have a significant effect on the expression of isoforms of other investigated enzymes.

The results of this study show that AgNP-PVP affects the catalytic activity and the expression of enzyme isoforms involved in antioxidant defense in the tobacco plant. Therefore, it can be concluded that oxidative stress is involved in the mechanism of AgNP-PVP toxicity.

PRILOG

Popis kratica

AA- askorbinska kiselina

AgNP – nanočestice srebra

AgNP-PVP – nanočestice srebra s polivinilpirolidonskom ovojnicom

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

APX – enzim askorbat peroksidaza

BFB – bromfenol plavo (engl. *BromoPhenol Blue*)

CAT – enzim katalaza

DHA - dehidroaskorbat

DNA – deoksiribonukleinska kiselina

EDTA – etilendiaminotetraoctena kiselina

H₂O₂ – vodikov peroksid

MDHA – monodehidroaskorbat

NBT - nitroblue tetrazolon

PAGE – poliakrilamid gel elektroforeza

PPX – enzim pirogalol peroksidaza

PVP – polivinilpirolidon

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

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

rpm – okretaji po minuti (eng. *revolutions per minute*)

SEM – skenirajući elektronski mikroskop

SOD – superoksid dismutaza

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

KATALITIČKA AKTIVNOST I EKSPRESIJA IZOFORMI ANTIOKSIDACIJSKIH ENZIMA U KLIJANACA DUHANA (*NICOTIANA TABACUM* L.) NAKON TRETMANA S ČESTICAMA NANOSREBRA

Kristina Marković

SAŽETAK

Nanočestice srebra (AgNP) zbog svojih specifičnih svojstava imaju široku upotrebu, no trenutno nema puno saznanja o njihovom potencijalno toksičnom utjecaju na okoliš i čovjeka. Cilj ovog istraživanja bio je ispitati uzrokuju li AgNP povećanu razinu oksidacijskog stresa, kao jednog od mogućih mehanizama njihove toksičnosti. Modelni organizam, klijanci duhana (*Nicotiana tabacum* L.) tretirani su AgNP stabiliziranim s omotačem od polivinilpirolidona (AgNP-PVP) u koncentracijama od 25, 50, 75, 100 i 150 μ M sedam dana. Nakon tretmana u proteinskom ekstraktu praćena je aktivnost i ekspresija izoformi antioksidacijskih enzima: superoksid dismutaze (SOD), katalaze (CAT), askorbat peroksidaze (APX) i pirogalol peroksidaze (PPX). Katalitička aktivnost enzima SOD, CAT, APX i PPX određena je spektrofotometrijski, a njihove izoforme su analizirane nativnom elektroforezom na poliakrilamidnom gelu (PAGE). Dobiveni rezultati obrađeni su statistički (Duncan test, razina značajnosti $p < 0,05$).

Tretman s AgNP-PVP nije imao značajniji utjecaj na aktivnost enzima SOD i CAT u klijanaca duhana, ali je uzrokovao značajno smanjenje aktivnosti APX i PPX u usporedbi s negativnom kontrolom (klijancima koji nisu bili izloženi AgNP-PVP). Također, nakon tretmana s AgNP-PVP u klijanaca duhana uočena je različita ekspresija izoformi PPX u odnosu na kontrolu. Povećana ekspresija izoformi PPX1 i PPX2 zabilježena je u klijanaca koji su bili izloženi 75, 100 i 150 μ M AgNP-PVP, dok je najveća ekspresija izoformi PPX4 i PPX5 zabilježena u kontroli. AgNP-PVP nisu imale značajniji učinak na ekspresiju izoformi ostalih ispitivanih enzima.

Dobiveni rezultati pokazuju da AgNP-PVP utječu na katalitičku aktivnosti i ekspresiju izoformi enzima koji su uključeni u antioksidacijsku obranu u biljci duhana. Stoga se može zaključiti da je oksidacijski stres uključen u mehanizam toksičnosti AgNP-PVP.

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

Rad sadrži: 31 stranicu, 12 grafičkih prikaza, 2 tablice i 36 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: nanočestice srebra, toksičnost, oksidativni stres, antioksidacijski enzimi

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

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

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

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

Dr. sc. Mario Jug, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2021.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

CATALYTIC ACTIVITY AND EXPRESSION OF ISOFORMS OF ANTIOXIDANT ENZYMES IN TOBACCO SEEDLINGS (*NICOTIANA TABACUM* L.) AFTER TREATMENT WITH NANOSILVER PARTICLES

Kristina Marković

SUMMARY

Due to their specific properties silver nanoparticles (AgNP) have numerous applications. However, there is currently little knowledge about their potentially toxic effects on the environment and humans. The aim of this study was to examine whether AgNPs cause increased levels of oxidative stress, as one of the possible mechanisms of their toxicity. Model organism tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seedlings were treated with AgNP coated with polyvinylpyrrolidone (AgNP-PVP) at concentrations of 25, 50, 75, 100 and 150 μM for seven days. After the treatment, activity and expression of isoforms of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and pyrogallol peroxidase (PPX) in plant protein extracts were monitored. The catalytic activity of the enzymes SOD, CAT, APX and PPX was determined spectrophotometrically, and their isoforms were analyzed by native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The obtained results were statistically analysed (Duncan test, significance level $p < 0.05$).

Treatment with AgNP-PVP had no significant effect on SOD and CAT enzyme activity in tobacco seedlings, however caused a significant reduction in APX and PPX activity compared to the negative control (seedlings that were not exposed to AgNP-PVP). Also, after treatment with AgNP-PVP in tobacco seedlings different expression of PPX isoforms was observed compared to the negative control. Increased expression of PPX1 and PPX2 isoforms was observed in tobacco seedling exposed to 75, 100, and 150 μM AgNP-PVP, while the highest expression of PPX4 and PPX5 isoforms was observed in the negative control. AgNP-PVP did not have a significant effect on the expression of isoforms of other investigated enzymes.

The results of this study show that AgNP-PVP affects the catalytic activity and the expression of enzyme isoforms involved in antioxidant defense in the tobacco plant. Therefore, it can be concluded that oxidative stress is involved in the mechanism of AgNP-PVP toxicity.

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

Thesis includes: 31 pages, 12 figures, 2 tables i 36 references. Original is in Croatian language.

Keywords: silver nanoparticles, toxicity, oxidative stress, antioxidant enzymes

Mentors: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Dr. sc. Biljana Balen, Full professor, University of Zagreb Faculty of Science, Department of Biology

Reviewers: **Dr. sc. Ana-Marija Domijan**, Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Dr. sc. Biljana Balen, Full professor, University of Zagreb Faculty of Science, Department of Biology

Dr. sc. Mario Jug, Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2021.