

Utjecaj veličine nanočestica srebra na biokemijske markere i reprodukciju kod vrste *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta)

Galinović, Tea

Master's thesis / Diplomski rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of biology / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za biologiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:181:598367>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Department of biology, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni

Tea Galinović

**Utjecaj veličine nanočestica srebra na biokemijske markere i
reprodukciju kod vrste *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta)**

Diplomski rad

Osijek, 2019.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku | Odjel za biologiju
Diplomski sveučilišni studij Biologija; smjer: znanstveni
Znanstveno područje: Prirodne znanosti
Znanstveno polje: Biologija

UTJECAJ VELIČINE NANOČESTICA SREBRA NA BIOKEMIJSKE MARKERE I REPRODUKCIJU
KOD VRSTE *Enchytraeus albidus* (OLIGOCHAETA)

Tea Galinović

Rad je izrađen na: Odjel za biologiju, Zavod za kvantitativnu ekologiju
Mentor: Dr. sc. Davorka K. Hackenberger, izv. prof.
Komentor: Dr. sc. Željka Lončarić, viši asistent

Kratak sažetak diplomskog rada:

Zbog svoje izuzetne antimikrobne aktivnosti nanočestice srebra poželjni su materijal za medicinsku ali i za komercijalnu primjenu. Upotrebljavaju se u sve većem broju proizvoda, kao što su kozmetika, medicinski uređaji, higijenski proizvodi, odjeća, boje i mnogi drugi. Međutim, isti mehanizmi koji stoje iza antimikrobnih svojstava ovih nanočestica povezani su i s njihovim citotoksičnim i genotoksičnim utjecajem na druge organizme. Zbog sposobnosti ulaska u stanice i stvaranja interakcija sa staničnim strukturama nužno je razumjeti njihovo ponašanje i sudbinu u ekosustavu. Cilj ovog rada bio je istražiti kako različite veličine nanočestica srebra mogu utjecati na reprodukciju i biokemijske markere (AChE, CAT i GST) kod vrste *Enchytraeus albidus*. Organizmi su izloženi nanočesticama veličine 35, 50-60 i 150 nm te srebrovom nitratu (AgNO_3), koji je služio kao pozitivna kontrola. Nanočestice veličine 35 nm nisu pokazale statistički značajnu inhibiciju reprodukcije u usporedbi s kontrolom, nanočestice veličine 50-60 nm pokazale su inhibiciju pri 1000 mg/kg, a čestice veličine 150 nm već pri 300 mg/kg. Iako prijašnja istraživanja indiciraju da manje nanočestice pokazuju veću toksičnost naši rezultati pokazuju drugačije.

Broj stranica: 40

Broj slika: 31

Broj tablica: 3

Broj literaturnih navoda: 34

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: srebro, nanočestice, veličina, *E. albidus*, test reprodukcije, toksičnost, biokemijski marker

Datum obrane: 22.10.2019.

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. Dr. sc. Branimir K. Hackenberger, prof., *predsjednik*,
2. Dr. sc. Davorka K. Hackenberger, izv. prof., *mentor*,
3. Dr. sc. Olga Jovanović Glavaš, doc., *član*,
4. Dr. sc. Goran Palijan, doc., *zamjena člana*.

Rad je pohranjen: na mrežnim stranicama Odjela za biologiju te u Nacionalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice u Zagrebu.

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek | Department of Biology

Graduate university study programme in Biology

Scientific Area: Natural sciences

Scientific Field: Biology

**EFFECT OF SILVER NANOPARTICLES SIZE ON BIOCHEMICAL MARKERS AND
REPRODUCTION OF *Enchytraeus albidus* SPECIES (OLIGOCHAETA)**

Tea Galinović

Thesis performed at: Department of Biology, Subdepartment of quantitative ecology

Supervisor: Davorka K. Hackenberger, PhD, Associate Professor

Co-supervisor: Željka Lončarić, PhD, Assistant professor

Short Abstract:

Due to its exceptional antimicrobial activity silver nanoparticles are desirable material for medical but also for commercial application. They are used in a growing number of products like cosmetics, medical devices, hygiene products, clothing, paints etc. However, the same mechanisms behind the antibacterial activity of these particles are related with their cytotoxic and genotoxic potential to other organisms. Because of their ability to enter cells and cause the interaction with cell structures, it is important to understand their behavior and destiny in the ecosystem. The aim of this research was to explore how different sizes of silver nanoparticles can influence the reproduction and biochemical markers (AChE, CAT and GST) in the *Enchytraeus albidus* species. Organisms were exposed to nanoparticles of 35, 50-60 and 150 nm size, as to silver nitrate (AgNO_3), which served as positive control. Silver nanoparticles size 35 nm didn't show statistically significant reproduction inhibition compared to control, while size 50-60 nm have shown inhibition at conc. 1000 mg/kg, and size 150 nm already at 300 mg/kg. Even though previous research indicate that smaller nanoparticles cause greater toxicity our results show different.

Number of pages: 40

Number of figures: 31

Number of tables: 3

Number of references: 34

Original in: Croatian

Keywords: silver, nanoparticles, size, *E. albidus*, reproduction test, toxicity, biochemical markers

Date of the thesis defence: 22.10.2019.

Reviewers:

1. Branimir K. Hackenberger, PhD, Professor, *chair*,
2. Davorka K. Hackenberger, PhD, Associate Professor, *supervisor*,
3. Olga Jovanović Glavaš, PhD, Assistant professor, *member*,
4. Goran Palijan, PhD, Assistant professor, *supstitute*.

Thesis deposited: on the Department of Biology website and the Croatian Digital Theses Repository of the National and University Library in Zagreb.

Ovaj rad je izrađen u okviru projekta „Različiti učinci okolišno relevantnih mješavina me temeljenih nanočestica i pesticida na faunu tla: Nove smjernice za procjenu rizika (DEFENSoil)” financiranog sredstvima Hrvatske naklade za znanost (IP-09-2014-4459); voditelj projekta: prof. dr. sc. Branimir K. Hackenberger.

Prije svega želim se zahvaliti svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Davorki K. Hackenberger na prilici za rad i iskustvo te vodstvu prilikom izrade diplomskog rada. Također hvala laborantici Luci Zelić na pomoći pri izvedbi eksperimenata, doc. dr. sc. Željki Lončarić na pomoći pri obradi podataka, Filipu koji je u sklopu svoje stručne prakse pomagao pri postavljanju i skidanju eksperimenata, Mariji koja je pomogla kad god je zatrebalo te svim ostalim članovima Zavoda za kvantitativnu biologiju koji su stvorili ugodno okruženje za rad. Zahvaljujem se, također, i svima koji su svojim znanjem dali doprinos mojem obrazovanju.

Zahvaljujem se i članovima svoje obitelji, svojim roditeljima i baki koji su bili finacijska i moralna podrška prilikom studiranja. Hvala mami i Ivani što su čuvale Erika kako bih mogla uspješno ispunjavati svoje studentske obveze. Hvala prijateljima i kolegama koji su me bodrili kada je bilo najteže. Posebno hvala Igoru koji usprkos svemu nikad nije prestao vjerovati u mene. I na kraju hvala mom sinu Eriku koji me motivira da uvijek budem bolja, zbog čega ovaj rad posvećujem njemu.

Sadržaj

1. UVOD	1
1.1. Nanotehnologija	1
1.1.1. Nanočestice	1
1.2. Nanočestice srebra.....	2
1.2.1. Mehanizam unosa nanočestica u stanice	2
1.2.2. Mehanizam nanotoksičnosti	3
1.3. Nanotoksikologija	5
1.4. Biokemijski markeri kao indikatori stresa	5
1.4.1. Acetilkinesteraza (AChE)	5
1.4.2. Katalaza (CAT)	6
1.4.3. Glutation S-transferaza (GST)	6
1.5. Cilj istraživanja	8
2. MATERIJALI I METODE	9
2.1. Eksperimentalni organizam.....	9
2.1.1. Sistematska pripadnost eksperimentalnog organizma.....	9
2.1.2. Biologija i ekologija eksperimentalnog organizma.....	9
2.2. Ispitivana tvar	10
2.3. Reprodukcijski test enhitreida	11
2.3.1. Priprema supstrata za izlaganje <i>E. albidus</i> nanočesticama	12
2.3.2. Izlaganje <i>E. albidus</i> nanočesticama srebra.....	12
2.3.3. Uklanjanje odraslih jedinki	13
2.3.4. Prebrojavanje juvenilnih jedinki	14
2.4. Mjerenje biokemijskih markera.....	14
2.4.1. Acetilkin esteraza (AChE)	15
2.4.2. Katalaza (CAT)	15
2.4.3. Glutation S-transferaza (GST)	15

2.5. Statistička obrada podataka	16
3. REZULTATI.....	17
3.1. Reprodukcijski test	17
3.1.1. Usporedba utjecaja veličine nanočestica	22
3.2. Biokemijski markeri	24
4. RASPRAVA.....	31
5. ZAKLJUČAK	35
6. LITERATURA.....	36

1. UVOD

1.1. Nanotehnologija

Nanotehnologija je nova interdisciplinarna grana znanosti koja uključuje manipulaciju atoma i molekula na nano skali te je jedno od vodećih područja istraživanja moderne znanosti (Ramakrishna i Rao 2011). Iako same nanočestice nisu novo otkriće, sustavno dizajnirani nanomaterijali pojavljuju se tek unazad nekoliko desetljeća (Gupta i Xie 2018). Pojam nanotehnologije prvi put spominje Richard P. Feynman 1959. godine u svom poznatom predavanju *“There’s Plenty of Room at the Bottom”* (Khan i sur. 2017). Od tada, nanotehnologija je doživjela revolucionarna ostvarenja na različitim znanstvenim područjima. Nove i jedinstvene kemijske, optičke, mehaničke, magnetske i biološke osobine nanomaterijala, čine ih poželjnima u industriji (Ramakrishna i Rao 2011).

Predznak nano (grč. *nanos* – patuljak) odnosi se na materijale koji veličinom variraju u rangu od 1 do 100 nanometara te kao takvi imaju nova i specifična fizikalna, kemijska i biološka svojstva. Dva su faktora koja uvjetuju nova različita svojstva od materijala ne-nano veličine: površinski efekt i kvantni efekt. Ovi faktori utječu na reaktivnost materijala kao i na njihova mehanička, optička, električna i magnetska svojstva. Udio atoma na površini kod nanočestica je povećan zbog čega, nasuprot materijalu ne-nano veličine, imaju veću površinu i broj čestica po jedinici mase. Atomi smješteni na površini imaju manje susjednih atoma nego materijali ne-nano veličine, što sa smanjenjem veličine čestice rezultira manjom energijom vezanja po atomu (Buzea i sur. 2007).

1.1.1. Nanočestice

Jedinstvena fizikalno-kemijska svojstva omogućavaju nanočesticama različitu aplikaciju, no ista ta svojstva dovode do jedinstvenog fiziološkog odgovora u biološkim sustavima. Zbog svoje veličine lako prolaze kroz fiziološke barijere nakon čega imaju mogućnost kretanja kroz organizam dolazeći do organa i tkiva gdje potencijalno mogu utjecati na stanične procese (Buzea i sur. 2007). Usprkos širokoj upotrebi nedovoljno je informacija o toksičnom utjecaju nanočestica na ljude i okoliš. I dok su pozitivni utjecaji nanotehnologije široko razvikani, potencijalna prijetnja i rizik za ljude i okoliš tek počinju biti interes istraživanja. Potrebne su detaljne studije dugoročnog utjecaja nanočestica da bi se reducirali mogući rizici (Ramakrishna i Rao 2011).

1.2. Nanočestice srebra

Snazna antibakterijska svojstva samog metala ali i srebrovih soli odavno su poznata. U formi koloida srebro se koristi više od 100 godina, no tek nedavni napredak tehnologije otvorio je vrata novim načinima primjene srebra u njegovom nano obliku. Nanočestice srebra (engl. *AgNP – Ag nanoparticles*) imaju jedinstvene kemijske, termalne, električne i optičke karakteristike, a zbog velikog odnosa površine nasuprot volumena imaju bolja antimikrobna svojstva od ne-nano materijala. Mnoge studije usmjerene su na njihova antimikrobna svojstva od kojih veliku korist imaju tekstilna industrija i zdravstvo pa danas možemo naći proizvode poput odjeće, katetera, zavoja i antiseptičkih sprejeva s nanočesticama srebra. Međutim, isti mehanizmi koji stoje iza antimikrobnih svojstava ovih nanočestica povezani su i s njihovim citotoksičnim i genotoksičnim svojstvima. Iako mehanizmi toksičnosti nisu još u potpunosti razjašnjeni, istraživanja pokazuju da AgNP induciraju oksidativni stres, mutacije, kromosomske aberacije, prekide na DNA zavojnici i mnoga druga oštećenja staničnih struktura (Souza i sur. 2016).

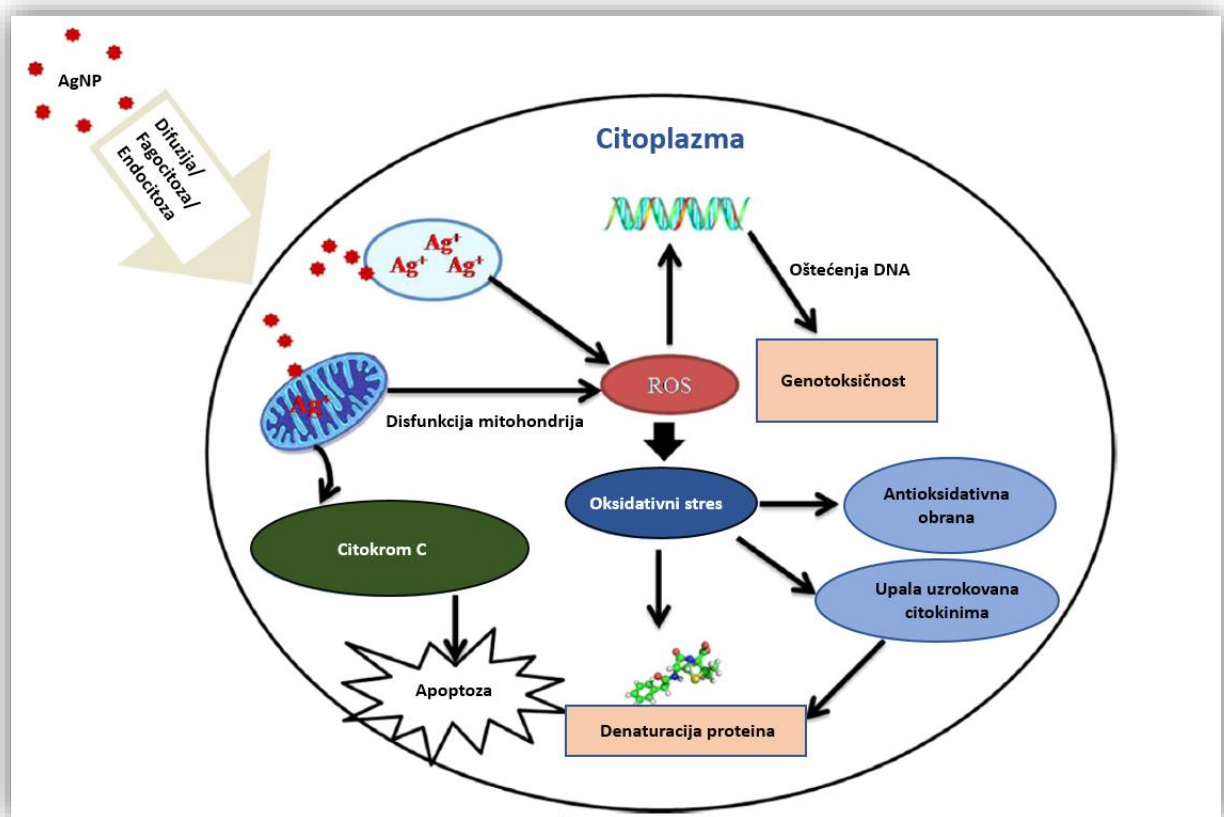
1.2.1. Mehanizam unosa nanočestica u stanice

Način unosa AgNP može se razlikovati od stanice do stanice. Difuzija, fagocitoza i endocitoza samo su neki od potencijalnih načina (Slika 1). Unos nanočestice, njezina lokacija u stanici i sposobnost kataliziranja oksidativnih produkata ovisi o obliku i veličini same čestice (Ramakrishna i Rao 2011). Veće AgNP ili one koje su agregirale u mediju u stanicu ulaze fagocitozom, dok manje nanočestice mogu ući alternativnim putevima kao što su direktna penetracija kroz ionske kanale, aktivni ili pasivni transport (Akter i sur. 2018). Mehanizam kojim nanočestica ulazi u stanicu bez specifičnih receptora na njihovoj površini smatra se pasivnim ulaskom ili adhezivnom interakcijom. Ovakav ulazak može biti iniciran van der Waalsovima silama, elektrostatskim nabojem, steričnim interakcijama ili efektom međufazne napetosti te ne rezultira stvaranjem vezikula. Nakon ovakvog ulaska u stanicu nanočestica nije u fagosomu (koji bi pružio određenu zaštitu od kemijskih reakcija s organelima), nego ima direktan pristup staničnim proteinima i organelima (Ramakrishna i Rao 2011).

1.2.2. Mehanizam nanotoksičnosti

Postoji veliki broj publikacija koje opisuju *in vitro* i *in vivo* eksperimente s nanočesticama srebra. Rezultati ukazuju da citotoksičnost i genotoksičnost ovisni o koncentraciji, veličini, obliku, trajanju izlaganja i okolišnim uvjetima. Također, oblagujući agensi koji su nekovalentno vezani za nanočestice da bi smanjili njihovu toksičnost mogu se otpuštati u okoliš ili biološki medij sa i bez interakcija s biološkim makromolekulama ili anorganskim i organskim ionima čineći nanočestice u mediju nestabilnima. Aglomeracija čestica, površinska oksidacija i oksidacija nastalog srebrovog oksida uzrokuje otpuštanje Ag^+ i Ag^0 što u konačnici rezultira akumulacijom iona srebra u okolišnom ili biološkom mediju i unutar stanice kroz difuziju ili endocitozu uzrokujući disfunkciju mitohondrija.

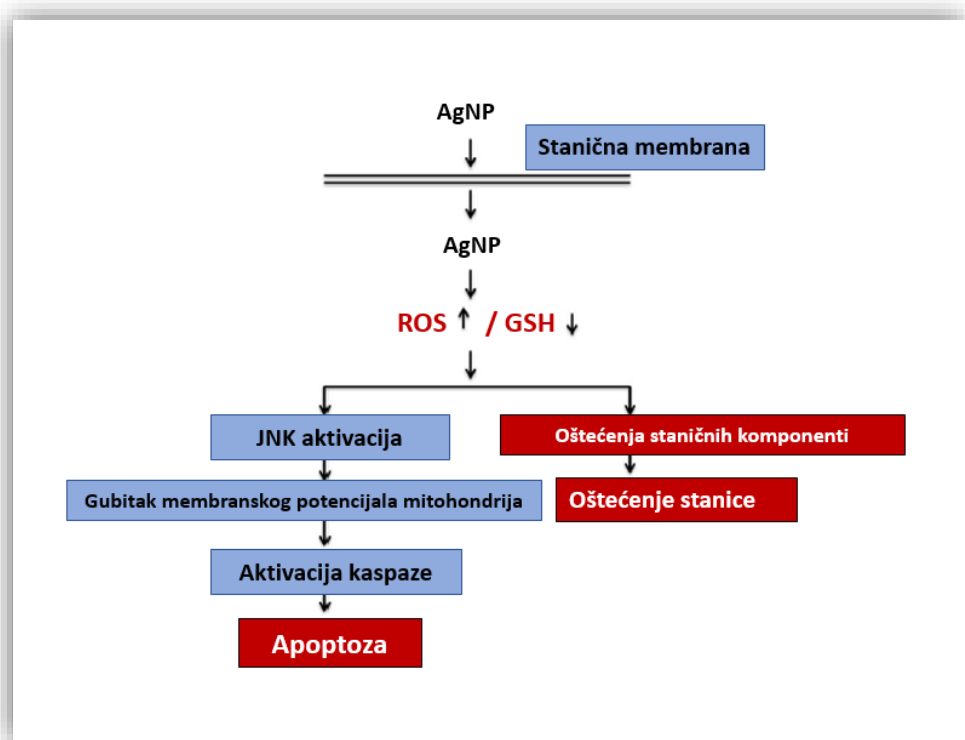
AgNP može ući u interakciju sa proteinima stanične membrane i aktivirati signalne puteve koji dovode do generacije ROS-a, koja zatim dovodi do oštećenja proteina i nukleinskih kiselina. Također snažni afinitet srebra za sumpornim ostacima dovodi do inhibicije stanične proliferacije i apoptoze (Slika 1) (Akter i sur. 2018).



Slika 1. Načini unosa nanočestica srebra u stanicu i potencijalni mehanizmi toksičnosti uzrokovane istima (preuzeto i modificirano prema Akter i sur. 2018).

Mnoge studije sugeriraju da je toksičnost AgNP uzrokovana upravo oksidativnim stresom. Ulazak AgNP, mehanizmom takozvanog „Trojanskog konja“, može uzrokovati povećanu produkciju ROS-a otpuštanjem iona sa nanočestice što za posljedicu ima aktivaciju puteva stanične smrti kao što su p53, AKT i MAPK. Povećana produkcija ROS-a uzrokuje regulaciju ukupnog AKT, koji uzrokuje povećanje kinaze p38. U isto vrijeme smanjenje ekspresije polimeraze poli-ADP-riboze rezultira značajnim povećanjem ekspresije kaspaze-3. H2X, p-p53 i ukupnog p53.

Mitochondrij je bitan centar za signal apoptoze. AgNP može utjecati na permeabilnost membrane uzrokujući narušavanje njezina integriteta što može dovesti do apoptoze regulirane JNK (Jun amino-terminalna kinaza) (Slika 2). Gubitak membranskog potencijala regulira Bcl-2, BAX i otpuštanje citokroma C u citosol. JNK je član MAPK obitelji i participira u apoptozi putem fosforilacije Bcl-2. Otpuštanje citokroma C u citosol inicira kaskadu koja dovodi do inicijacije kaspaze 3 (Akter i sur. 2018).



Slika 2. Indukcija apoptoze stanice izazvana povećanom količinom ROS-a u stanici (preuzeto i modificirano prema Akter i sur. 2018).

1.3. Nanotoksikologija

S obzirom da se javila potreba za spoznajom toksičnih učinaka novonastalih materijala razvila se i nova grana toksikologije koja se bavi toksikologijom nanočestica. Nanočestice pokazuju toksična svojstva koja nisu viđena kod većih čestica. Što je čestica manja, veći je omjer površine i volumena zbog čega je veća kemijska reaktivnost i biološka aktivnost. Zbog velike se površine nanočestice trenutno adsorbiraju na tkiva i fluide makromolekula s kojima se susreću. Ovakve interakcije mogu utjecati na regulatorne mehanizme enzima i drugih proteina (Ramakrishna i Rao 2011). U zadnje vrijeme raste zabrinutost zbog toksičnosti i utjecaja AgNP na okoliš. Povećana pozornost koja im se pridaje uzrokovana je upravo povećanom proizvodnjom i sve širom upotrebom (Batchelor-McAuley i sur. 2014).

Dio utjecaja nanočestica na okoliš možemo proučavati u sklopu terestričke ekotoksikologije, znanosti o okolišnim polutantima, koji utječu na organizme ovisne o tlu i njihov okoliš. Organizmi tla mogu biti izloženi nanočesticama putem kože, oralno, inhalacijom ili kroz hranidbeni lanac. Dva važna procesa upravljaju kretanjem polutanata kroz hranidbenu mrežu: bioakumulacija i biomagnifikacija. Razumijevanje ovih procesa, kao i različitih načina izlaganja polutantima, bitno je za shvaćanje potencijalnog toksičnih efekata. Toksični odgovori procjenjuju se standardnim laboratorijskim protokolima (Fairbrother and Hope 2005).

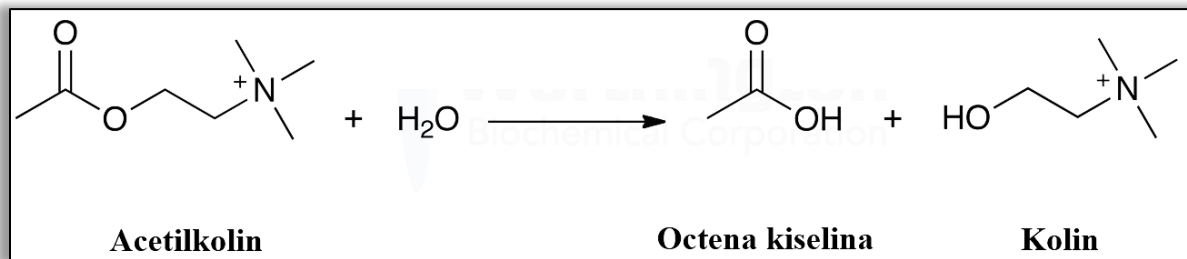
1.4. Biokemijski markeri kao indikatori stresa

Biokemijski markeri biološki su parametri koje se objektivno mjere i procjenjuju kao indikatori normalnih bioloških procesa, patogenih procesa, farmakoloških ili toksikoloških odgovora. Imaju veliku vrijednost u procjenama sigurnosti prilikom *in vitro* studija u kulturama tkiva ali i *in vivo* studijama s animalnim modelima. (Atkinson i sur. 2001). Među enzimima koji se najčešće koriste kao biokemijski markeri su acetilkolin-esteraza, katalaza i glutation S-transferaza.

1.4.1. Acetilkolinesteraza (AChE)

Acetilkolinesteraza uz acetikolin (ACh) i njegove receptore sudjeluje u prijenosu akcijskog potencijala između sinapsi živaca ili neuromuskularnih sinapsi. AChE je vezan za vanjsku membranu živčanih stanice koja je okrenuta prema sinapsi i stupa u akciju kada je ACh, potaknut akcijskim potencijalom, otpušten iz presinaptičkog živca. ACh difundira kroz

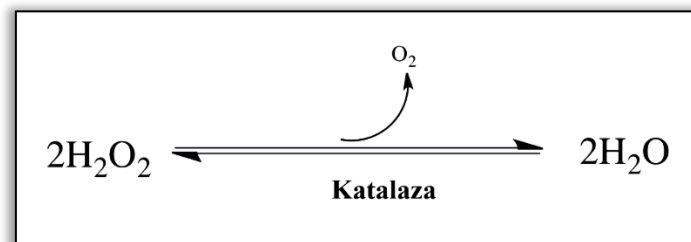
sinaptičku pukotinu i veže se za ACh receptore koji između ostalog otvaraju ionske kanale za ulazak K^+ u postsinaptički živac ili mišićnu stanicu. Fiziološka funkcija ovog enzima je hidroliziranje razgradnje acetilkolina čime prekida prijenos živčanog impulsa (Quinn 1987) (Slika 3).



Slika 3. Hidroliza acetilkolina (preuzeto i prilagođeno prema Web 1).

1.4.2. Katalaza (CAT)

Katalaze ili hidroperoksidaze jedni su od najistraživijih enzima. Sveprisutnost ovog enzima, lakoća testiranja i jeftini supstrat H_2O_2 čine ga atraktivnim za biokemijska i molekularna istraživanja. Reakcija koju katalizira je razgradnja dvije molekule vodikovog peroksida na dvije molekule vode i kisik (Slika 4).



Slika 4. Razgradnja vodikovog peroksida pomoću katalaze (preuzeto i prilagođeno prema Web 2).

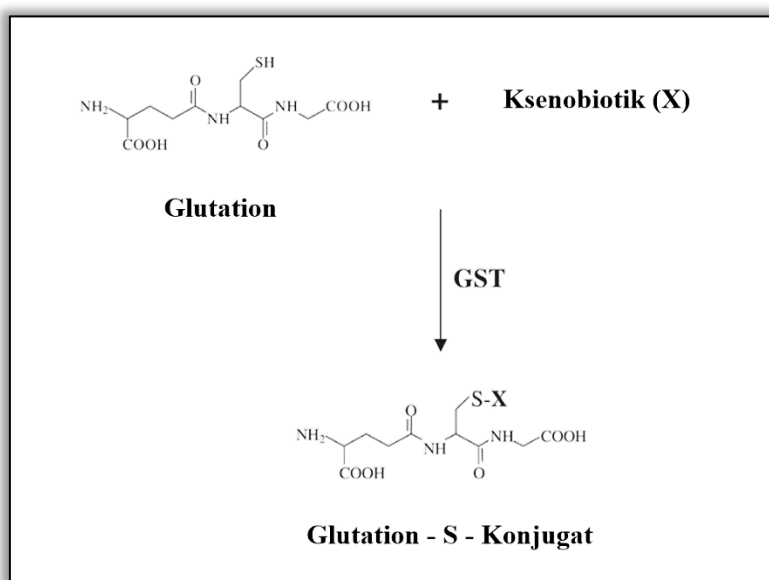
Njena fiziološka uloga je uklanjanje H_2O_2 , reaktivne kisikove jedinice (ROS), prije nego naštetiti samoj stanici (Chelikani i sur. 2004).

1.4.3. Glutation S-transferaza (GST)

Enzimski detoksifikacija ksenobiotika klasificira se u tri razdvojene faze. Faza I i II uključuju konverziju lipofilnih, nepolarnih ksenobiotika u vodotopive molekule koje su manje

toksične i lakše ih je eliminirati iz stanice. Fazi I uglavnom pripadaju mikrosomalni proteini citokrom P450 sistema, koji su odgovorni za mnoge reakcije od kojih je najvažnija oksidacija. Enzimi druge faze kataliziraju konjugaciju aktiviranih ksenobiotika na endogene vodotopive supstrate kao što su glicin, UDP-glukoronična kiselina i reducirani glutation (GSH). Treća faza odnosi se na transport i eliminaciju konjugata (Sheehan i sur. 2001).

Glutation S-transferaza bitan je enzim druge faze detoksifikacije koji se većinom nalazi u citosolu. Ovaj enzim katalizira konjugaciju aktiviranih ksenobiotika na reducirani glutation (GSH). GST može katalizirati nukleofilne aromatske supstitucije, Michael-ove adicije na alfa i beta- nezasićene aromatske ketone i epoksi reakcije, koje sve rezultiraju formacijom GSH konjugata (Slika 5).



Slika 5. Konjugacija ksenobiotika na reducirani glutation pomoću Glutation S-transferaze (preuzeto i prilagođeno prema Web 3).

GSH-ksenobiotski konjugat previše je hidrofilan da bi slobodno difundirao iz stanice pa se transportira van pomoću nekoliko različitih mehanizama, nakon čega se prevodi u merkapturičnu kiselinu i izlučuje (Sheehan i sur. 2001).

1.5. Cilj istraživanja

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi kako različite veličine nanočestica srebra (35, 50-60 i 150 nm) utječu na reprodukciju vrste *Enchytraeus albidus* te kakav utjecaj veličina nanočestica ima na aktivnost biokemijskih markera acetilkolinesteraze (AChE), katalaze (CAT) i glutation S-transferaze (GST) kod navedene vrste.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Eksperimentalni organizam

Organizmi iz porodice Enchytraeidae, osobita roda *Enchytraeus*, ekološki su relevantne vrste često korištene za ekotoksikološka istraživanja. Često ih se može pronaći i u tlima u kojima nema gujavica. Koriste se za laboratorijska istraživanja kao i za istraživanja izvan njega. Mnoge vrste enhitreja lake su za uzgoj i rukovanje, a test reprodukcije traje samo šest tjedana (OECD, 2015).

2.1.1. Sistematska pripadnost eksperimentalnog organizma

Sistematska pripadnost vrste *Enchytraeus albidus* (Henle, 1837) prikazana je u Tablici 1.

Tablica 1. Sistematska pripadnost vrste
Enchytraeus albidus (Henle, 1837)

Carstvo	Animalia
Koljeno	Annelidae
Razred	Clitellata
Red	Enchytraeida
Porodica	Enchytraeidae
Rod	<i>Enchytraeus</i>
Vrsta	<i>Enchytraeus albidus</i> (Henle, 1837)

2.1.2. Biologija i ekologija eksperimentalnog organizma

E. albidus (Henle, 1837) jedna je od prvih opisanih vrsta iz ove porodice. Smatra se oportunističkim, litoralnim organizmom koji se lako može pronaći u raspadnutim algama i travama na morskim obalama ili u vrtnim kompostima. Lako se uzgaja u kulturama i u današnje vrijeme ima velik ekonomski značaj kao popularna hrana za ribe te kao modelni organizam u znanstvenoj zajednici. Koristi se u mnogim biološkim istraživanjima diljem svijeta te se može

pronaći široki spektar publikacija koji se bave ekologijom, fiziologijom, genetikom i toksikologijom vrste.

E. albidus (Slika 6) bijele je do žućkaste boje, dužine 20-35 mm s 2-5 ravnih ili lagano savijenih četina u snopu. Klitelum se nalazi na XII-XIII kolutiću. Tri para ždrijelnih žlijezda i dorzalne žile nalaze se od XIV-XVIII kolutića. Velike sjemene vrećice protežu se prema IX kolutiću. Sjemenovodi su 5-8 puta duži nego široki te se protežu do XXI kolutića (Erséus i sur. 2019).

Jedinke korištene za ovo istraživanje uzgojene su u laboratorijskoj kulturi na Odjelu za biologiju.



Slika 6. Vrsta *Enchytraeus albidus* (Henle, 1837) (izvor: Web 4).

2.2. Ispitivana tvar

Spolno zrele jedinke *E. albidus* izlagane su nanočesticama srebra veličine 35, 50-60 i 150 nm te srebrovom nitratu (AgNO_3) koji je služio kao pozitivna kontrola utjecaja iona srebra.

Fizikalno-kemijska svojstva korištenih nanočestica srebra prikazana su u Tablici 2.

Tablica 2. Fizikalno-kemijska svojstva korištenih nanočestica

Prosječna veličina čestice	35 nm (TEM)	50 – 60 nm	~150 nm (SEM)
Molekularna težina	107.87 amu	107.87 amu	107.87 amu
Čistoća	99.5 %	99.9 %	99.95 %
Raspon veličina čestica	0-100 nm (TEM)	/	/
Specifična veličina površine	30-50 m ² /g (BET)	~12 m ² /g (BET)	/
Boja	siva	crna	tamno siva
Morfologija čestice	sferičan oblik	sferičan oblik	približno sferično
Gustoća	10.5 g/cm ³	10.5 g/cm ³	10.49 g/cm ³
Točka taljenja	1535°C		1535°C

2.3. Reprodukcijski test enhitreida

Test reprodukcije s enhitridama provodi se prema standardiziranom OECD protokolu (OECD, 2015). Protokol je dizajniran s ciljem procjene utjecaja testne supstance na reprodukciju enhitreja, *E. albidus*, u tlu.

Odrasle enhitreje izložene su određenom rasponu koncentracija nanočestica srebra (Tablica 3.), koji je bio određen na temelju informacija iz prijašnjih radova (Gomes i sur. 2013; Gomes i sur. 2015; Topuz i Gestel 2015; Ribeiro i sur. 2015; Bicho i sur. 2016; Gomes i sur. 2017; Topuz i Gestel 2017; Maria i sur. 2018; Lobe i sur. 2018; Nyoka i sur. 2018). Trajanje testa je šest tjedana. Nakon prva tri tjedna uklanjaju se odrasle jedinke na kojima će se mjeriti biokemijski markeri. Nakon sljedeća tri tjedna, prebrojavaju se juvenilne jedinke koje su se izlegle iz kokona. Broj juvenilnih jedinki koje su se izlegle u tretiranim uzorcima uspoređuje se sa kontrolom u svrhu utvrđivanja učinka testne supstance (OECD, 2015).

Tablica 3. Koncentracije korištene u eksperimentu

	AgNO₃	35, 50-60, 150 nm
	mg/kg	mg/kg
K	0	0
C1	15	150
C2	30	300
C3	45	600
C4	60	900
C5	90	1000

2.3.1. Priprema supstrata za izlaganje *E. albidus* nanočesticama

Sastav umjetnog tla, u kojem su se nalazili organizmi, jest sljedeći:

- 10 % treseta,
- 20 % gline (udio kalonita veći od 30 %),
- 1 % CaCO₃,
- 69 % pijeska,
- pH 6.0 ± 0.5 i
- vlažnost 60% od maksimalnog retencijskog kapaciteta tla (engl. *WHC* – *water holding capacity*).

Medij za izlaganje pripremao se suhim miješanjem umjetnog tla i određene količine AgNP u PVC vrećicama tijekom 10 minuta kako bi se postigla homogenost. Sadržaj vrećice se miješao u rukama sve dok vrećica nije postala topla (tada se smatra da je supstrat homogen).

Za svaku koncentraciju napravljeno je pet replika, te se u svaku testnu posudu dodalo 20 g pripremljene mješavine. Postupak je ponovljen za sve koncentracije. U kontrolne testne posude dodan je samo supstrat (umjetno tlo).

U sve testne posude dodano je 0,05 g usitnjene zobi kao hrana organizmima tijekom trajanja eksperimenta, te 6 mL vode kako bi se dobila vlažnost od 60% maksimalnog retencijskog kapaciteta. Tlo je zatim promiješano nakon čega su testne posude zatvorene plastičnim poklopcima s probušenim rupicama koje omogućavaju razmjenu plinova između uzoraka i atmosfere. Pripremljene testne posude su stavljene u klimatizirani prostor (20 °C) na 24 sata prije dodavanja organizama.

2.3.2. Izlaganje *E. albidus* nanočesticama srebra

Iz uzgojnih posuda u vađene su odrasle jedinke vrste *E. albidus*. Sve izdvojene jedinke su pregledavane pod lupom gdje se tražila naznaka odraslosti u obliku kliteluma. U svaku testnu posudu pripremljenu prethodnog dana stavljano je po 10 jedinki (ukupno 300 jedinki u 30 posuda). Posude su zatim pojedinačno izvagane, te nasumično poslagane u klimatizirani prostor na temperaturu od 20 ± 2 °C. Jednom tjedno tijekom ukupno tri tjedna im je nadoknađivana voda izgubljena evaporacijom te dodavano 0,05 g usitnjene zobi nakon čega je mijenjan raspored posuda (Slika 7).



Slika 7. Testne posude unutar kojih se nalazi tlo s organizmima
(fotografija: Tea Galinović).

2.3.3. Uklanjanje odraslih jedinki

Nakon tri tjedna iz testnih posuda, pomoću histološke iglice sa zakrivljenim vrhom, vadile su se odrasle jedinke (Slika 8). Izvađene jedinke stavljane su u mikroepuvete. Nakon što je supstrat dobro pregledan vraćen je u posudu. Mikroepuvete s organizmima zatim su izvagane i stavljene na led. Postupak se ponavljao za svaku posudu posebno.



Slika 8. Odrasle jedinke u testnim posudama (fotografija: Tea Galinović).

2.3.4. Prebrojavanje juvenilnih jedinki

Nakon ukupno šest tjedana prebrojavaju se juvenilne jedinke i kokoni. Prethodnog dana organizmi u posudama fiksiraju se etanolom (5 mL po replici) te se dodaje 2 cm vode i nekoliko kapi Bengal red boje (1 % otopina u etanolu) nakon čega se komponente pažljivo promiješaju. Sljedećeg dana jedinke su obojane u intenzivno ružičastu boju zbog čega su lako uočljive (Slika 9). Sadržaj posuda se pomoću sita ispire vodom nakon čega se uzorci prebacuju u Petrijeve zdjelice koje se zatim pregledavaju pod lupom.



Slika 9. Juvenilna jedinka pod lupom nakon fiksacije i bojanja (fotografija :Tea Galinović).

2.4. Mjerenje biokemijskih markera

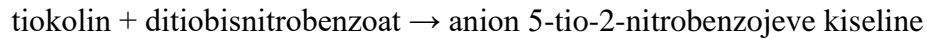
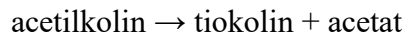
Od odraslih jedinki izvađenih nakon tri tjedna izlaganja pripravljena je postmitohondrijska frakcija (S9) za spektrofotometrijsko mjerenje aktivnost:

- Katalaze (CAT)
- Glutation S-transferaze (GST)
- Acetilkolin esteraze (AChE)

Jedinke *E. albidus* izvagane su te homogenizirane u kalij-fosfatnom puferu (pH 7,2) u omjeru 1 : 20 (masa tkiva : volumen pufera). Homogenat je prenesen u označenu rashlađenu mikroeprevetu koja je centrifugirana na 9000 x g pri temperaturi od +4 °C. Nakon centrifuge supernatant (S9 frakcija) je prenesen u ohlađene krio mikroeprevete. Ovako pripremljen uzorak pohranjuje se u hladnjak na -80°C do mjerenja.

2.4.1. Acetilholin esteraza (AChE)

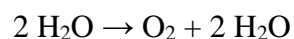
Aktivnost acetilholin esteraze mjerena je metodom prema Ellman i sur. (1961). Acetilholin (ACh) se enzimatski hidrolizira pri čemu nastaje acetat i holin. Nastali holin reagira sa Ellmanovim reagensom 5,5'-Ditio-bis-(2-nitrobenzojevim) anionom (DTNB), a kao produkt nastaje žuto obojeni anion 5-tio-2-nitrobenzojeve kiseline (TNB).



Apsorbancija je mjerena na 412 nm u staklenoj kiveti tijekom 30 sekundi. Brzina porasta apsorbancije proporcionalna je aktivnosti AChE u uzorku.

2.4.2. Katalaza (CAT)

Aktivnost katalaze mjerena je metodom prema Claiborne i sur. (1985). Katalaza je enzim koji je uključen u detoksifikaciju vodikovog peroksida H_2O_2 , reaktivnih kisikovih jedinki (ROS) koje su toksični produkti normalnog aerobnog metabolizma, kao i patogene produkcije ROS-a. Enzim katalaza (CAT) katalizira razgradnju dviju molekula H_2O_2 na dvije molekule vode.



Razgradnja vodikovog peroksida prati se na 240 nm tijekom 30 sekundi, a razlika u apsorbanci po jedinici vremena mjera je aktivnosti enzima.

2.4.3. Glutation S-transferaza (GST)

Aktivnost glutacion-S-transferaze mjerena je metodom prema Habig i sur. (1974). Glutation S-transferaza katalizira konjugaciju L-glutaciona sa CDNB (1-kloro-2,4-dinitrobenzenom) kroz tiolnu skupinu L-glutaciona:



Produkt reakcije GS-DNB konjugat apsorbira pri 340 nm. Brzina porasta apsorbancije direktno je proporcionalna aktivnosti GST u uzorku.

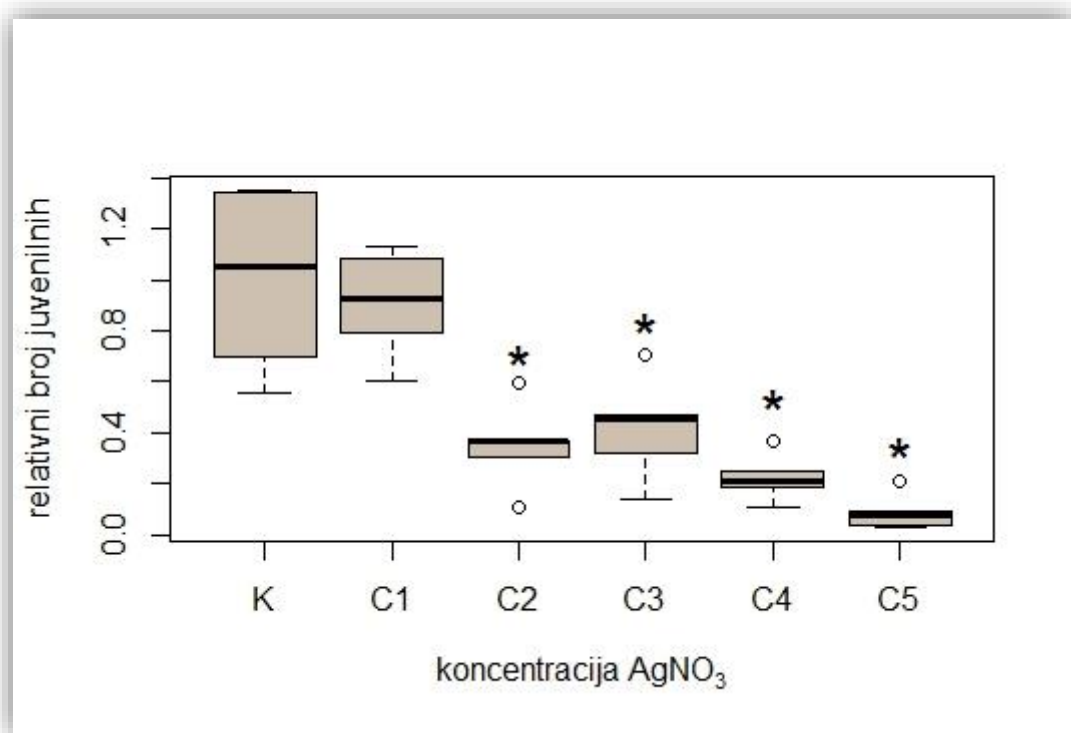
2.5. Statistička obrada podataka

Svi dobiveni podaci obrađeni su u R softveru za statističku obradu podataka (R core Team, 2019). Za testiranje podataka na normalnu distribuciju korišten je Shapiro-Wilks test. Kako su testiranjem utvrđena statistički značajna odstupanja od normalne distribucije za testiranje razlika između pojedinih eksperimentalnih skupina korišten je Kruskal-Wallis test. U slučaju dobivanja značajnosti, za testiranje razlika u odgovoru biokemijskih markera u odnosu na kontrolu korišten je test višestruke usporedbe Gao (Gao i sur., 2008) (engl. *Nonparametric multiple test procedure for many-to-one comparisons*) dostupan unutar R paketa nparcomp (Konietschke i sur., 2015). Za testiranje razlika u odgovoru biokemijskih markera između pojedinih veličina nanaočestica korišten je test višestruke usporedbe Gao_cs (Gao i sur., 2008) (engl. *Nonparametric multiple test procedure for all-pairs comparisons*). Statistička analiza provedena je na razini značajnosti $p=0.05$.

3. REZULTATI

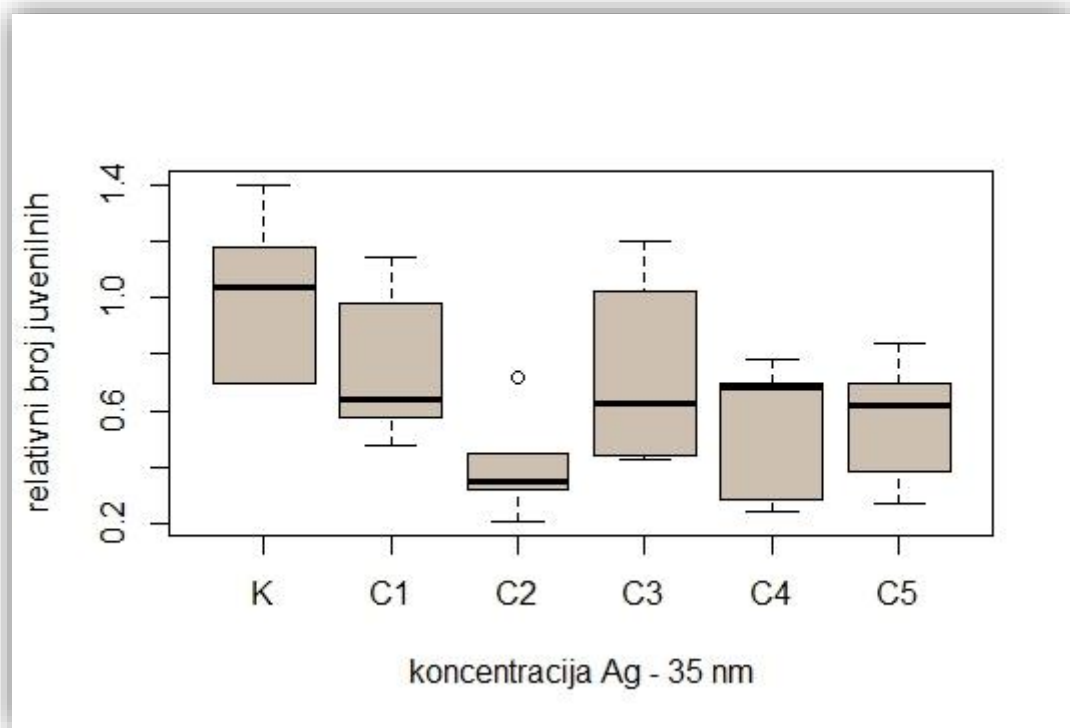
3.1. Reprodukcijski test

Nakon obrade podataka statistički značajna razlika u odnosu na kontrolu, odnosno inhibicija reprodukcije u testu s AgNO_3 pokazala se već pri koncentraciji od 30 mg/kg (C2) te pri koncentraciji od 45 mg/kg (C3), 60 mg/kg (C4) i 90 mg/kg (C5) mg/kg (Slika 10).

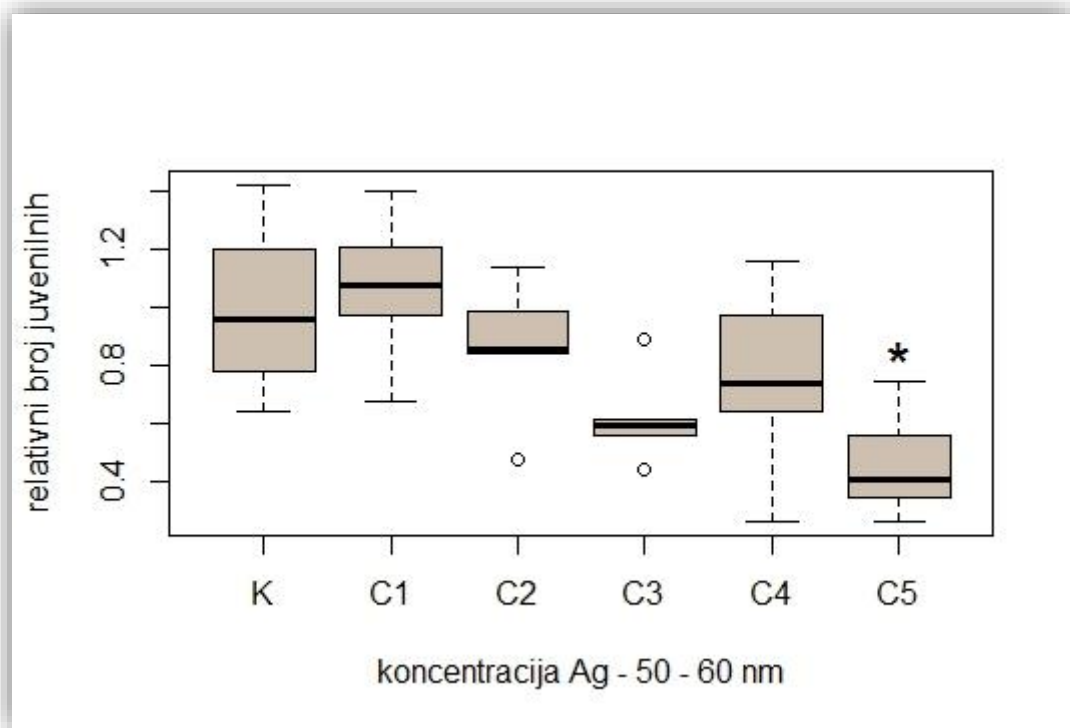


Slika 10. Utjecaj AgNO_3 na relativni broj juvenilnih jedinki *E. albidus* pri različitim koncentracijama. Zvezdicom (*) je označena statistički značajna razlika ($p=0.05$).

AgNP veličine 35 nm nisu statistički značajno utjecale na reprodukciju (Slika 11), dok je kod AgNP veličine 50-60 nm došlo do značajne inhibicije samo pri koncentraciji od 1000 mg/kg (C5) (Slika 12).

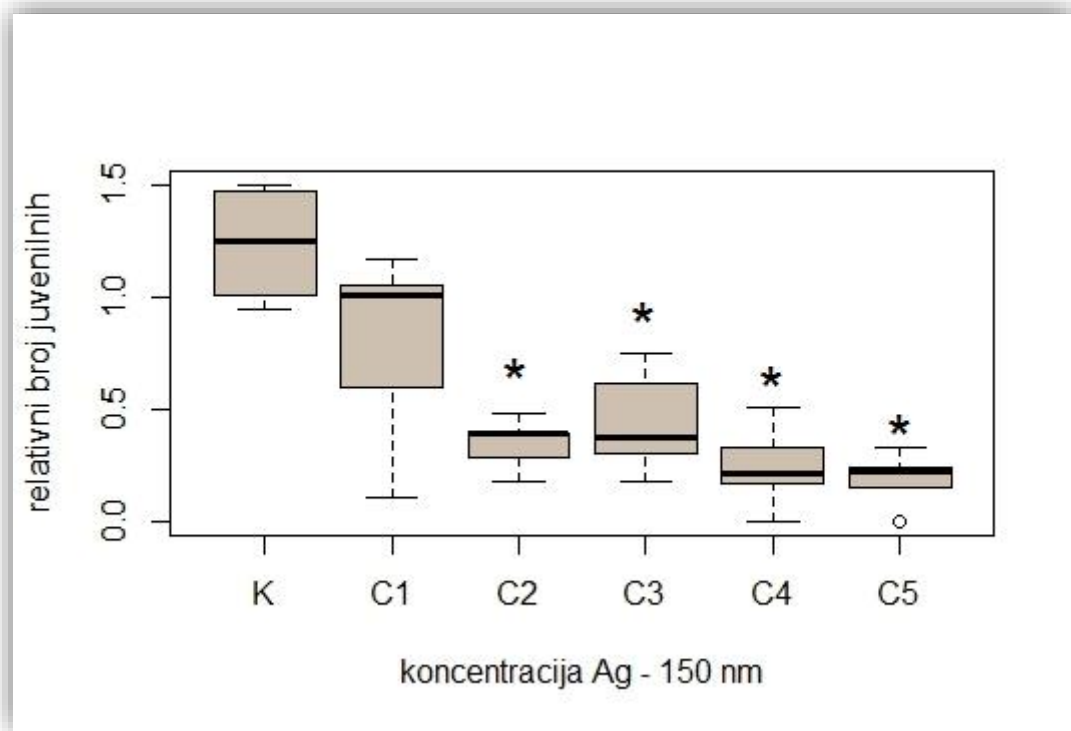


Slika 11. Utjecaj AgNP veličine 35 nm na relativni broj juvenilnih jedinki *E. albidus* pri različitim koncentracijama.



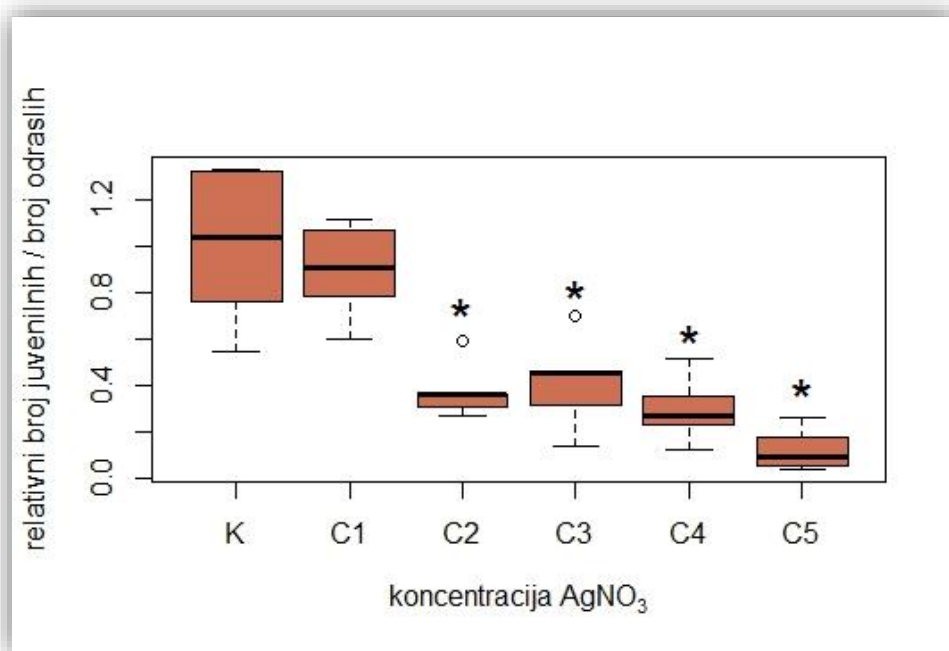
Slika 12. Utjecaj AgNP veličine 50-60 nm na relativni broj juvenilnih jedinki *E. albidus* pri različitim koncentracijama. Zvezdicom (*) je označena statistički značajna razlika ($p=0.05$).

Kod Ag čestica veličine 150 nm reprodukcija je statistički značajno inhibirana pri koncentraciji od 300 mg/kg (C2), 600 mg/kg (C3), 900 mg/kg (C4) i 1000 mg/kg (C5) (Slika 13).

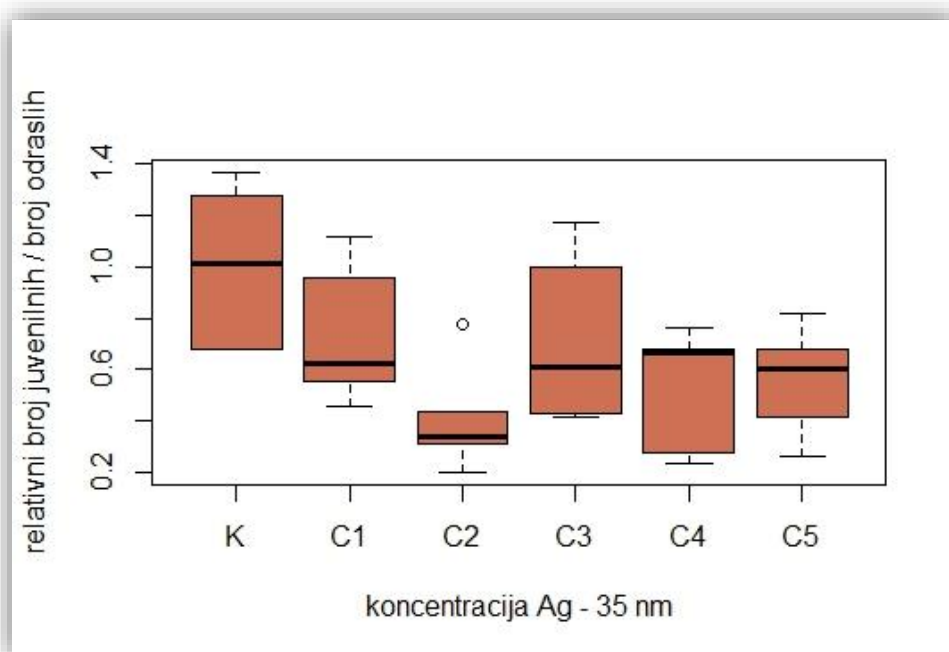


Slika 13. Utjecaj Ag čestica veličine 150 nm na relativni broj juvenilnih jedinki *E. albidus* pri različitim koncentracijama. Zvezdicom (*) je označena statistički značajna razlika ($p=0.05$).

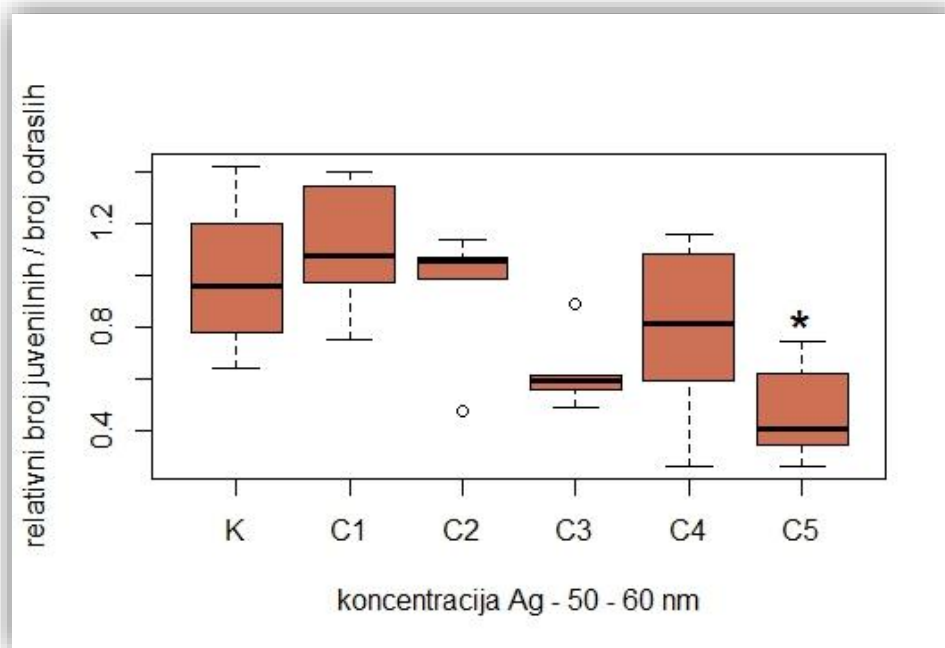
Standardiziranjem relativnog broja juvenilnih jedinki u odnosu na odrasle rezultati se ne mijenjaju (Slika 14, Slika 15, Slika 16, Slika 17).



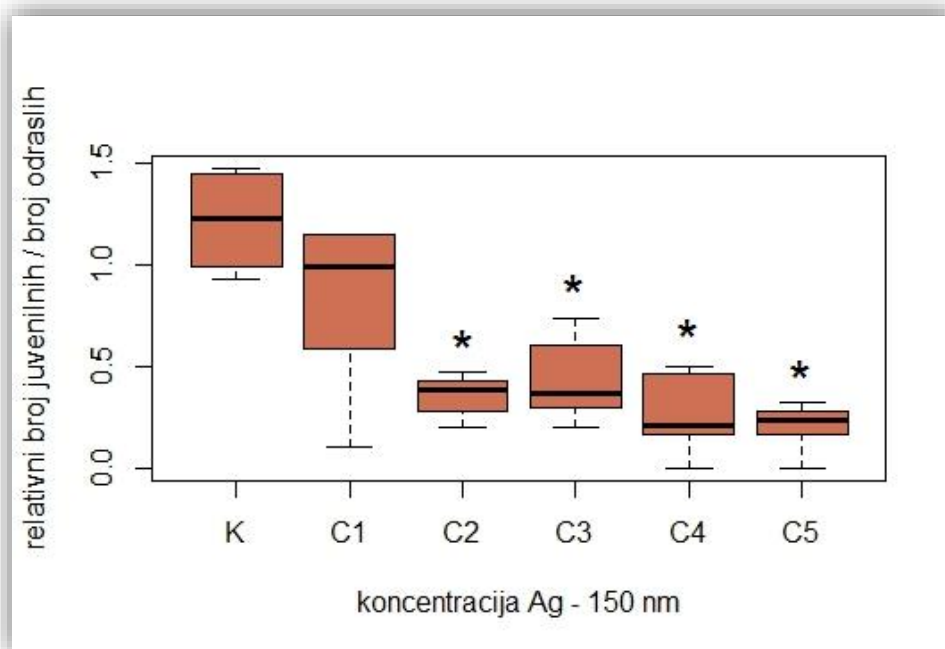
Slika 14. Utjecaj AgNO₃ na relativni broj juvenilnih jedinki u odnosu na relativni broj odraslih jedinki *E. albidus* pri različitim koncentracijama. Zvezdicom (*) je označena statistički značajna razlika ($p=0.05$).



Slika 15. Utjecaj AgNP veličine 35 nm na relativni broj juvenilnih jedinki u odnosu na relativni broj odraslih jedinki *E. albidus* pri različitim koncentracijama.



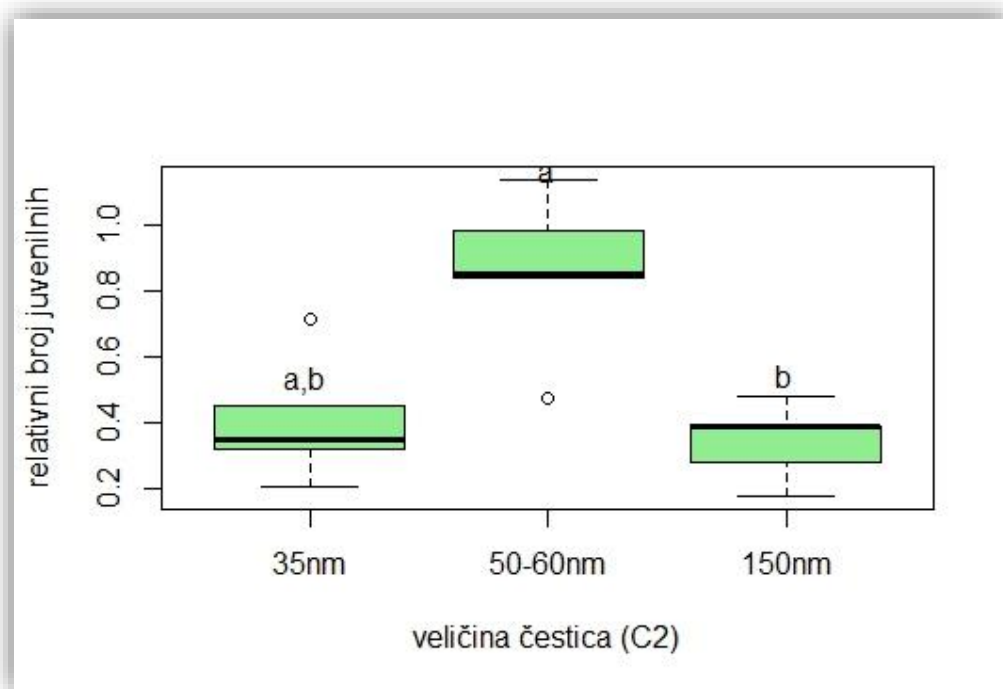
Slika 16. Utjecaj AgNP veličine 50-60 nm na relativni broj juvenilnih jedinki u odnosu na relativni broj odraslih jedinki *E. albidus* pri različitim koncentracijama. Zvezdicom (*) je označena statistički značajna razlika ($p=0.05$).



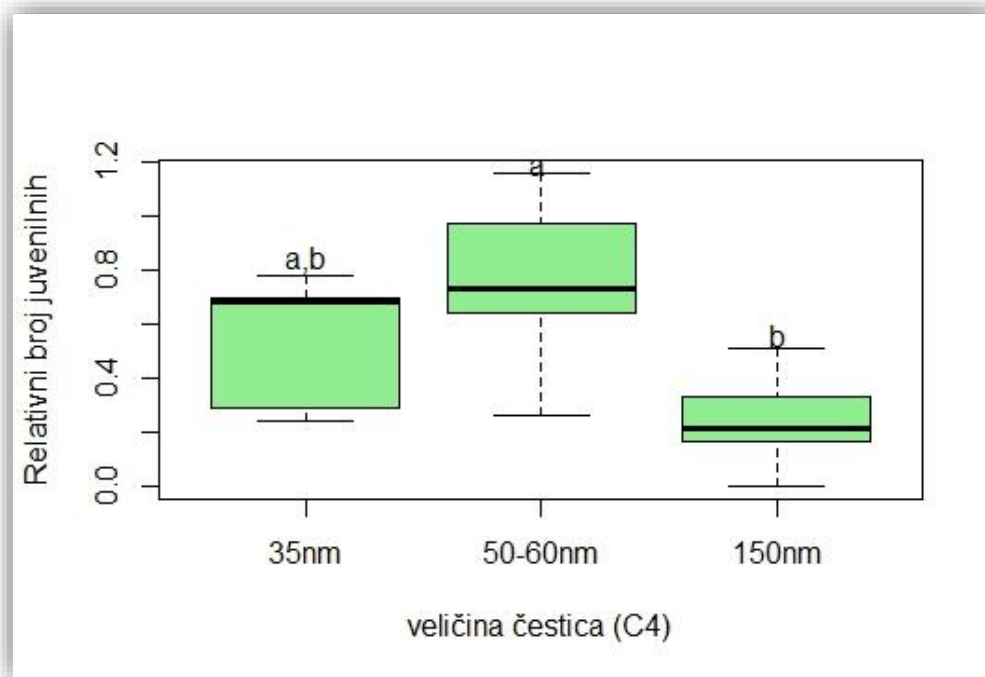
Slika 17. Utjecaj AgNP veličine 150 nm na relativni broj juvenilnih jedinki u odnosu na relativni broj odraslih jedinki *E. albidus* pri različitim koncentracijama. Zvezdicom (*) je označena statistički značajna razlika ($p=0.05$).

3.1.1. Usporedba utjecaja veličine nanočestica

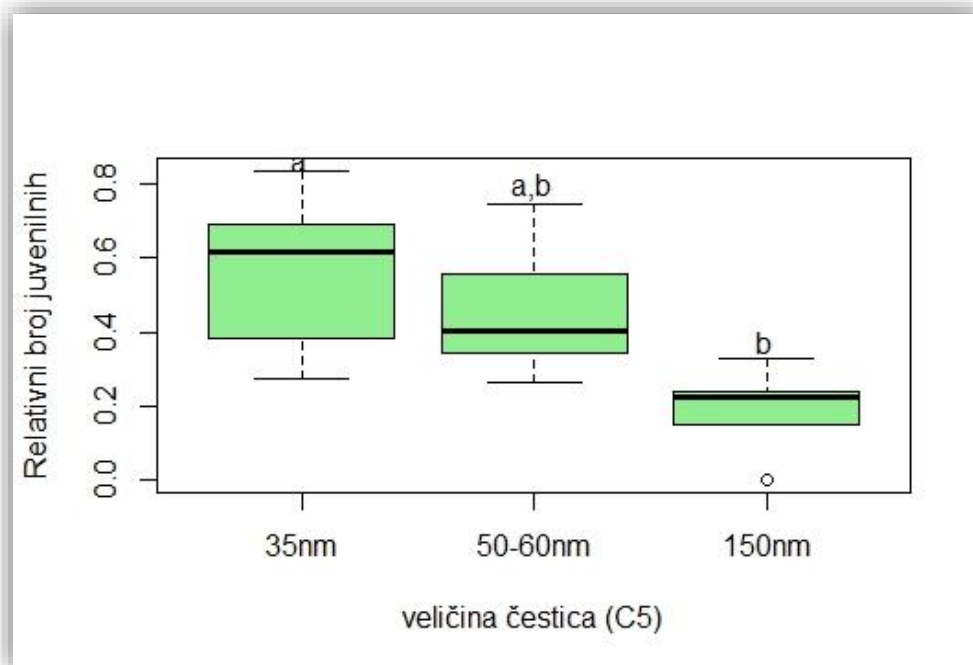
Utjecaj AgNP veličine 50-60 i 150 nm na reprodukciju se razlikuje pri koncentracijama od 300 mg/kg (C2) (Slika 18) i 900 mg/kg (C4) (Slika 19), dok se pri koncentraciji od 1000 mg/kg (C5) (Slika 20) razlikuje utjecaj AgNP veličine 35 i 150 nm.



Slika 18. Utjecaja različitih veličina Ag čestica pri koncentraciji 300 mg/kg na relativni broj juvenilnih jedinki *E. albidus*. Statistički značajne razlike označene su različitim slovima ($p=0.05$).



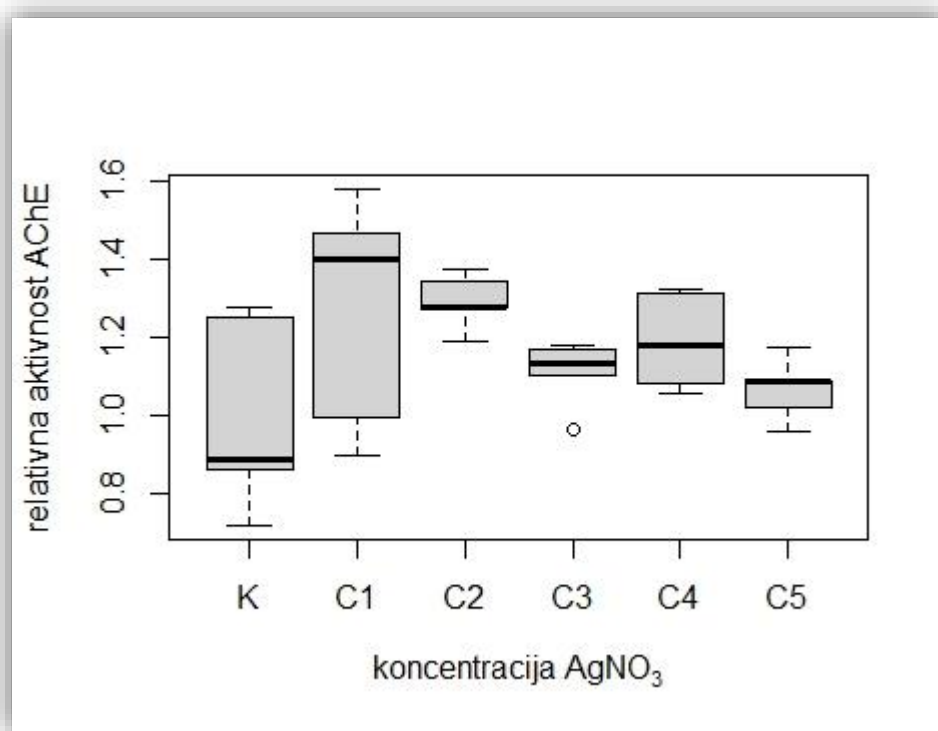
Slika 19. Utjecaj različitih veličina Ag čestica pri koncentraciji 900 mg/kg na relativni broj juvenilnih jedinki *E. albidus*. Statistički značajne razlike označene su različitim slovima ($p=0.05$).



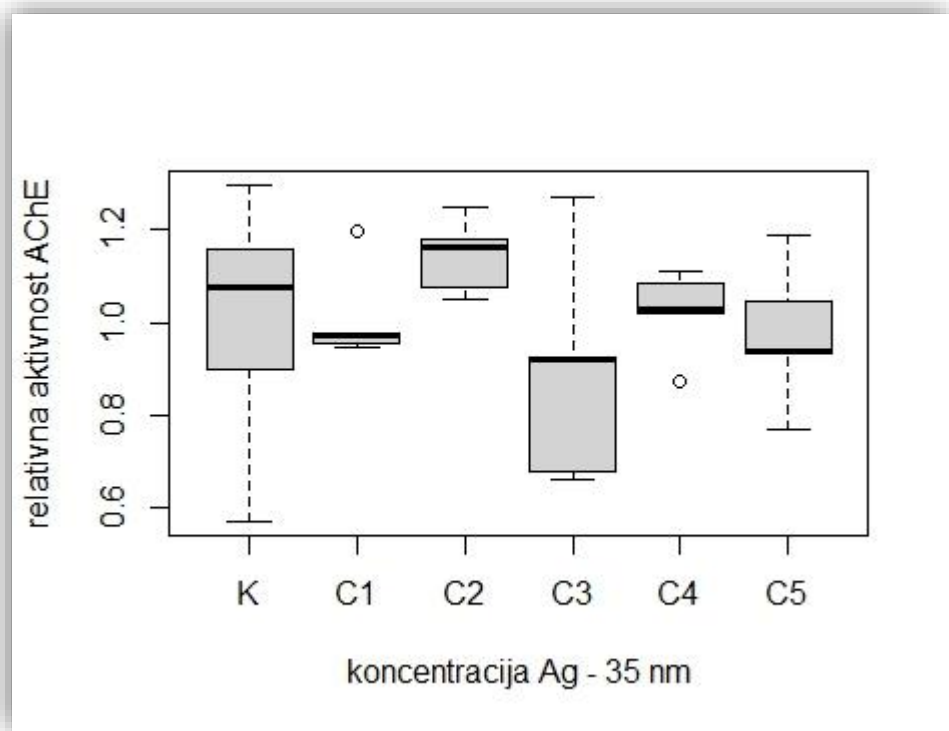
Slika 20. Utjecaj različitih veličina Ag čestica pri koncentraciji 1000 mg/kg na relativni broj juvenilnih jedinki *E. albidus*. Statistički značajne razlike označene su različitim slovima ($p=0.05$).

3.2. Biokemijski markeri

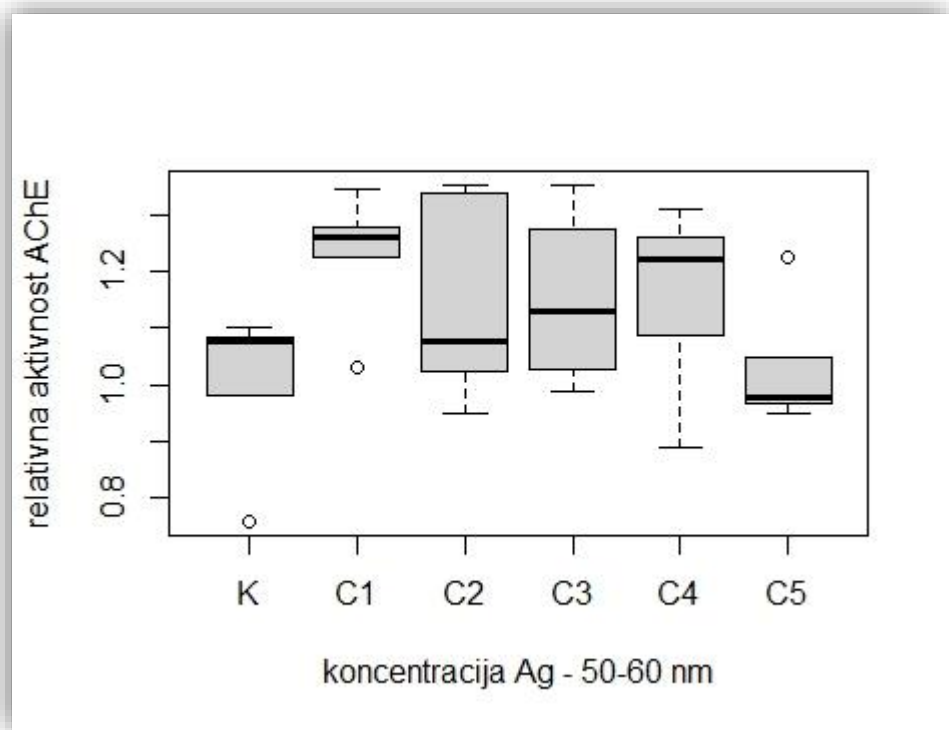
Korištene koncentracije AgNO_3 ali i svih veličina AgNP nisu značajno utjecale na aktivnost acetilkolinesteraze (Slika 21, Slika 22, Slika 23, Slika 24) i katalaze (Slika 25, Slika 26, Slika 27, Slika 28). Usporedba aktivnosti enzima kod različitih veličina AgNP također nije dala značajnu razliku.



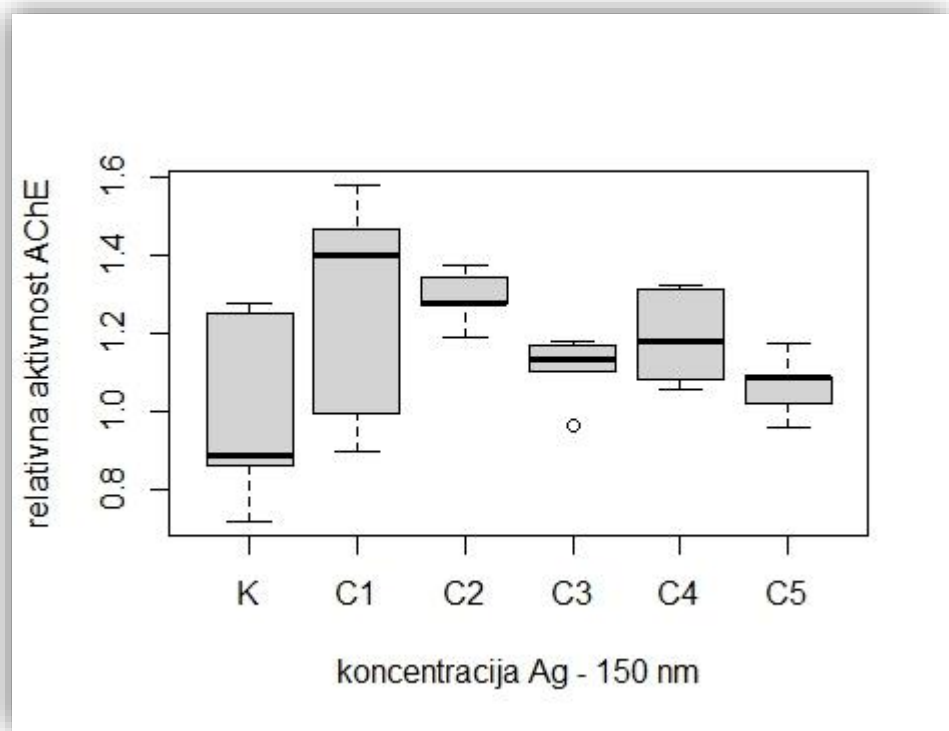
Slika 21. Aktivnost AChE nakon 21 dan izlaganja različitim koncentracijama AgNO_3 . Vrijednosti su izražene kao relativne u odnosu na kontrolu.



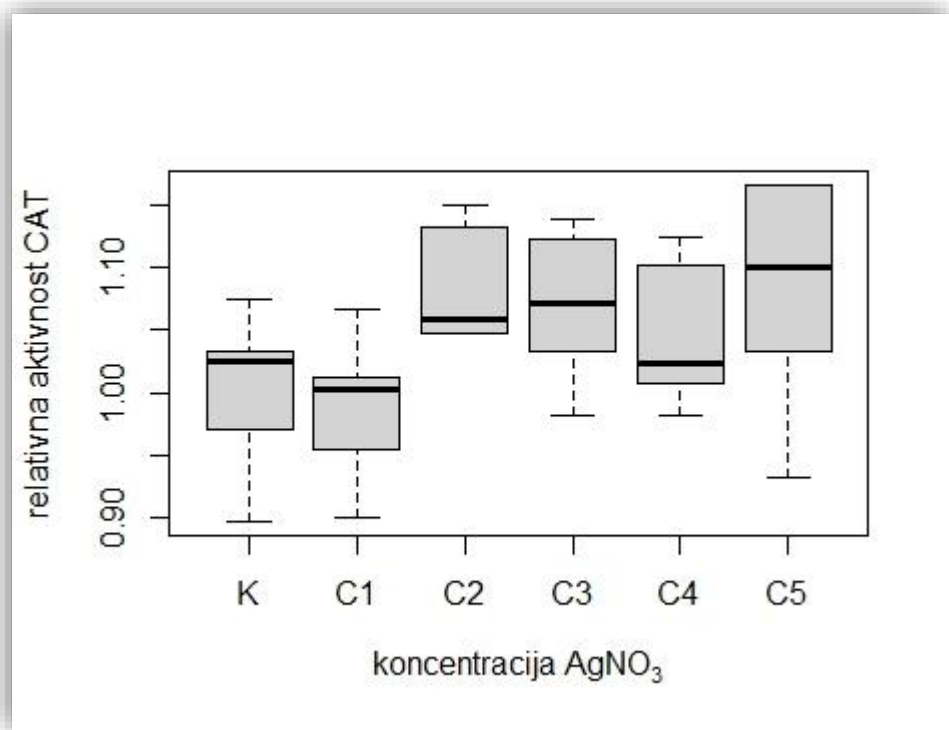
Slika 22. Aktivnost AChE nakon 21 dan izlaganja različitim koncentracijama AgNP veličine 35 nm. Vrijednosti su izražene kao relativne u odnosu na kontrolu.



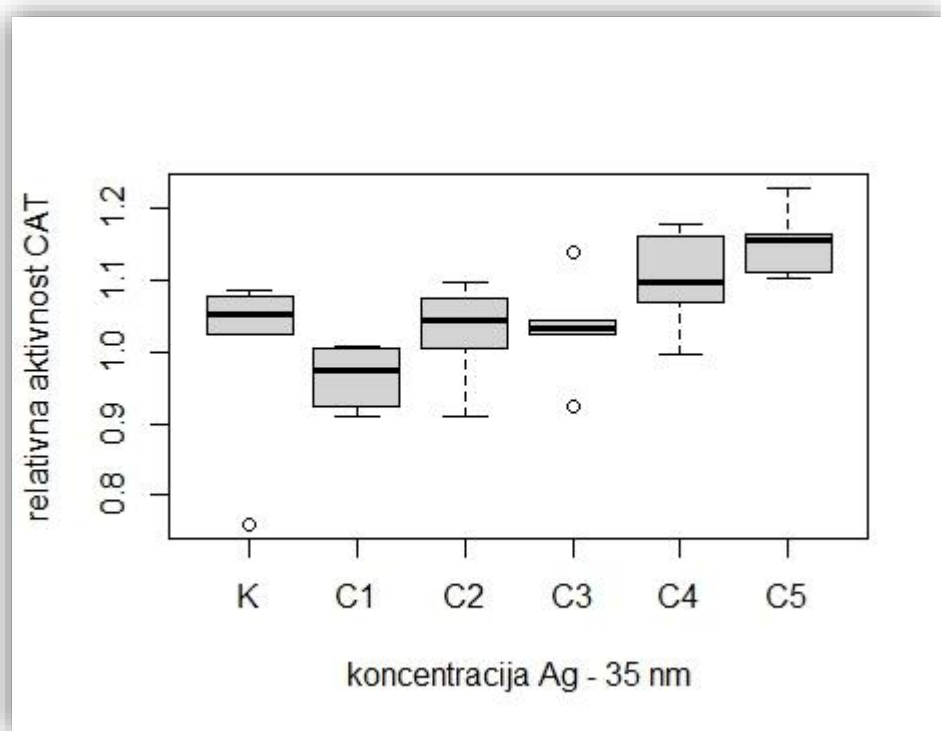
Slika 23. Aktivnost AChE nakon 21 dan izlaganja različitim koncentracijama AgNP veličine 50-60 nm. Vrijednosti su izražene kao relativne u odnosu na kontrolu.



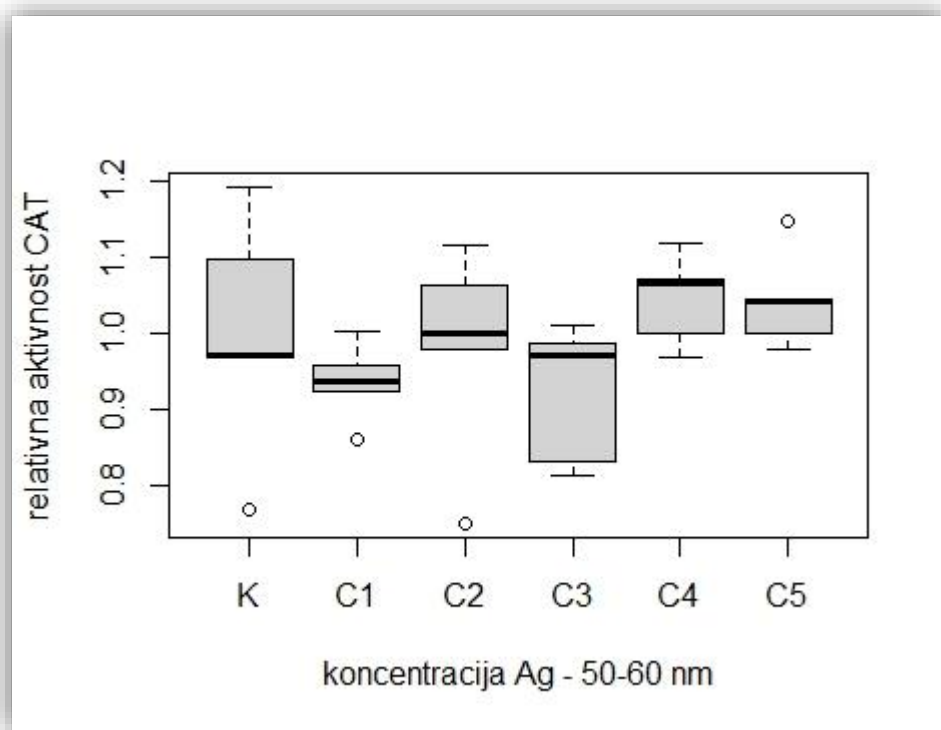
Slika 24. Aktivnost AChE nakon 21 dan izlaganja različitim koncentracijama Ag čestica veličine 150 nm. Vrijednosti su izražene kao relativne u odnosu na kontrolu.



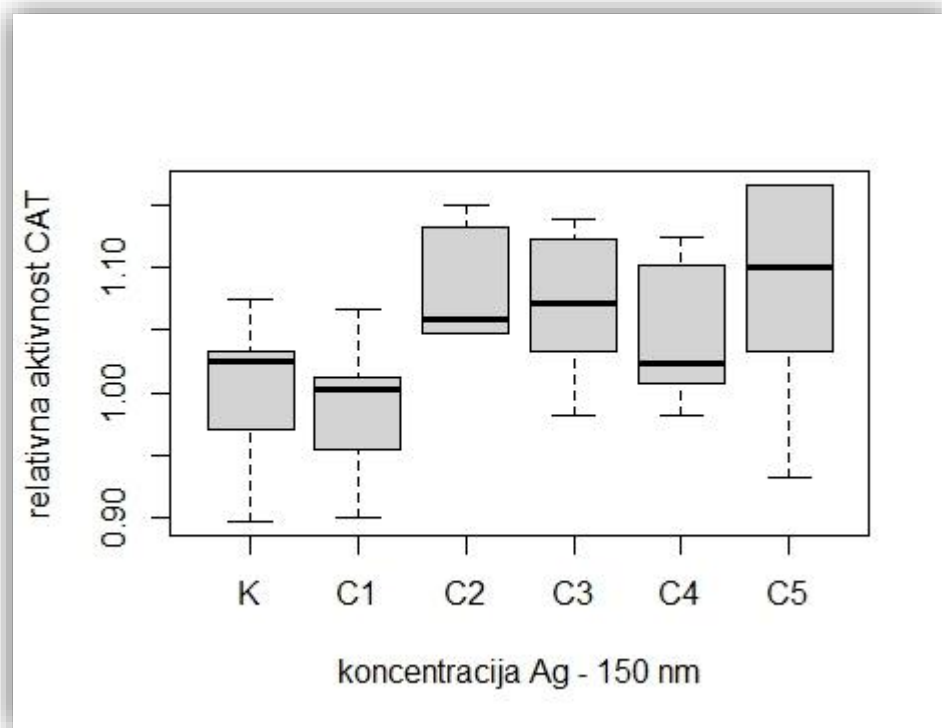
Slika 25. Aktivnost CAT nakon 21 dan izlaganja različitim koncentracijama AgNO₃. Vrijednosti su izražene kao relativne u odnosu na kontrolu.



Slika 26. Aktivnost CAT nakon 21 dan izlaganja različitim koncentracijama AgNP veličine 35 nm. Vrijednosti su izražene kao relativne u odnosu na kontrolu.

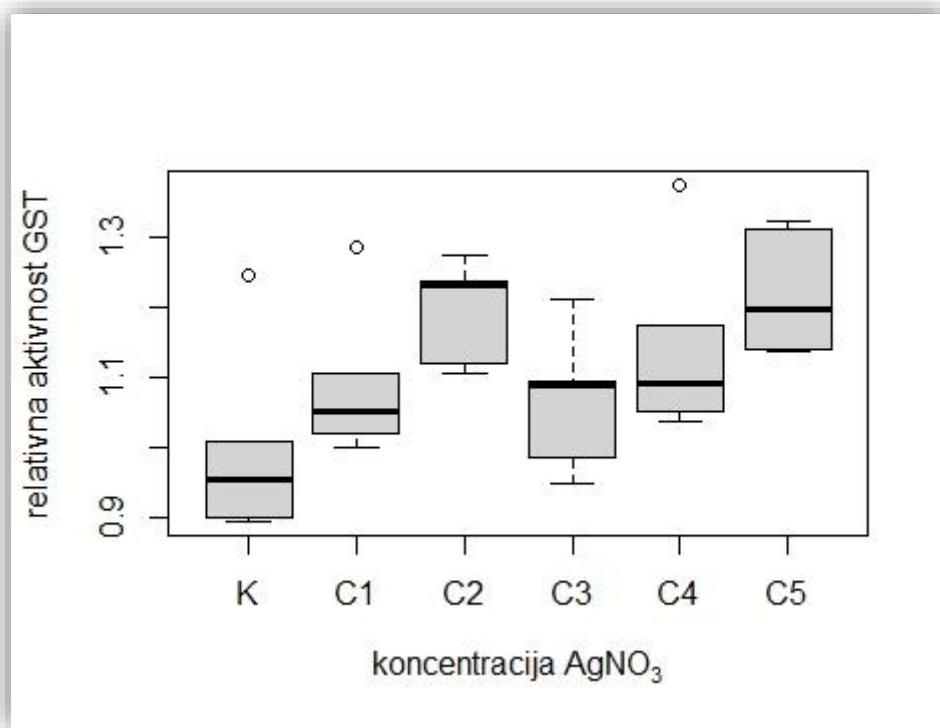


Slika 27. Aktivnost CAT nakon 21 dan izlaganja različitim koncentracijama AgNP veličine 50-60 nm. Vrijednosti su izražene kao relativne u odnosu na kontrolu.

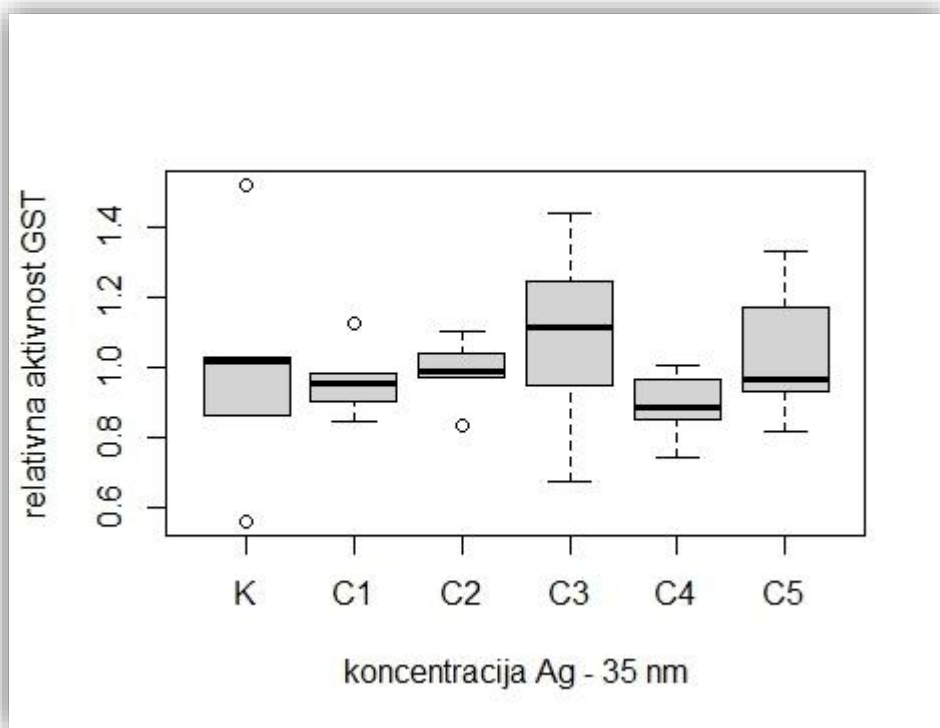


Slika 28. Aktivnost CAT nakon 21 dan izlaganja različitim koncentracijama Ag čestica veličine 150 nm. Vrijednosti su izražene kao relativne u odnosu na kontrolu.

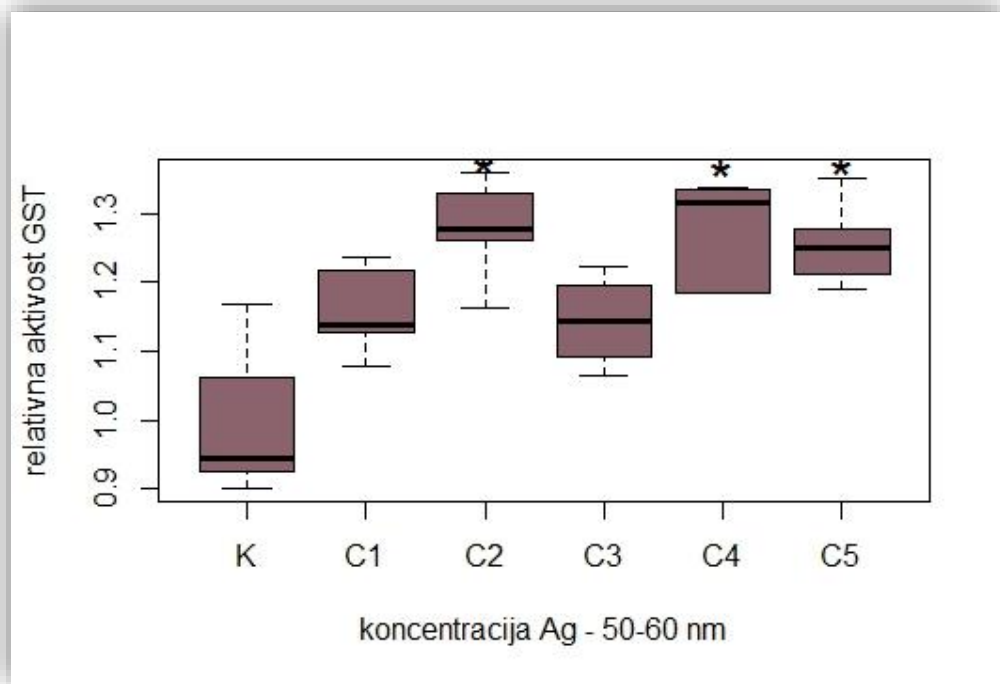
Aktivnost glutathion S-transferaze se statistički značajno promijenila samo nakon izlaganja AgNP veličine 50-60 nm pri koncentracijama 300 mg/kg (C2) , 900 mg/kg (C4) i 1000 mg/kg (C5) (Slika 31). Nakon izlaganja AgNO₃ (Slika 28), AgNP 35 nm (Slika 30) i AgNP 150 nm (Slika 32), aktivnost GST se nije statistički značajno promijenila.



Slika 29. Aktivnost GST nakon 21 dan izlaganja različitim koncentracijama AgNO₃.
Vrijednosti su izražene kao relativne u odnosu na kontrolu.

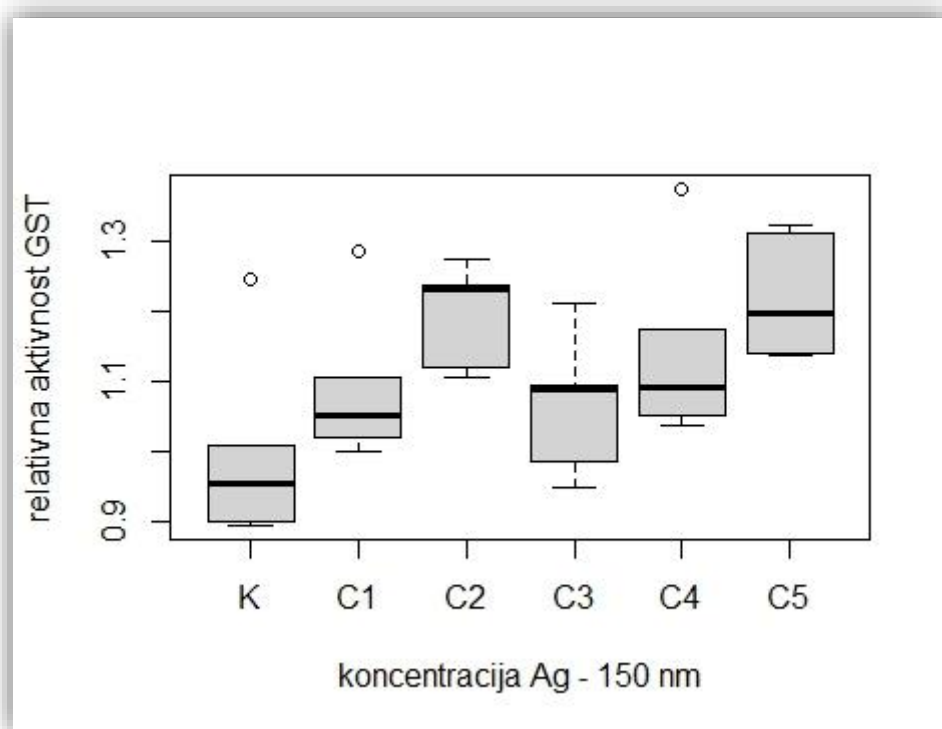


Slika 30. Aktivnost GST nakon 21 dan izlaganja različitim koncentracijama AgNP veličine 35 nm. Vrijednosti su izražene kao relativne u odnosu na kontrolu.



Slika 31. Utjecaj AgNP veličine 50-60 nm na aktivnost enzima GST kod jedinki *E. albidus*.

Zvjezdicom (*) je označena statistički značajna razlika ($p=0.05$).



Slika 32. Aktivnost GST nakon 21 dan izlaganja različitim koncentracijama Ag čestica veličine 150 nm. Vrijednosti su izražene kao relativne u odnosu na kontrolu.

4. RASPRAVA

Snažna antimikrobna svojstva srebra i njegovih soli poznata su od davnina. Početkom devedesetih godina 20.stoljeća srebro se u koloidnoj formi počinje koristiti za tretiranje otvorenih rana što otvara tržište za mnoge medicinske proizvode kao što su kateteri, zavoji i antiseptički sprejevi sa nanočesticama srebra (Arora i sur. 2008). Danas znamo da srebro djeluje inhibirajuće na preko 650 mikroorganizama (Ahmed i sur. 2016), no iako je toksičnost na ljude značajno slabija u odnosu na mikrobe (Arora i sur. 2008), isti mehanizmi koji im omogućavaju antimikrobnu djelatnost su oni koji mogu uzrokovati citotoksičnost i kod drugih organizama (Souza i sur. 2016). Povećana proizvodnja proizvoda koji sadrže nanočestice uzrokuje i povećani depozit nanočestica u okolišu. Sve veća količina nanočestica u okolišu može imati negativan utjecaj na organizme u njemu, zbog čega je njihova toksičnost postala važno pitanje današnjice.

Nanočestice su pokazale više puta bolja katalitička svojstva i elektromagnetske sposobnosti, što ih čini reaktivnijim od ne-nano materijala. Sintetizirane AgNP mogu varirati u veličini, obliku i ostalim karakteristikama. Pokazalo se da veličina ima ključnu ulogu u aktivnosti nanočestica. Raspon koncentracija također je važan faktor koji utječu na indukciju toksičnosti (Akter i sur. 2018).

U ovom radu kao eksperimentalni organizam korištena je *E. albidus*, jedna od najvećih vrsta enhitreja koja može narasti do 35 mm u duljinu. *E. albidus* je kozmopolitska vrsta koja se može pronaći u morskim, slatkovodnim i terestričkim staništima, većinom u dekompostirajućoj organskoj tvari. Komercijalno je dostupna kao hrana za ribe (OECD, 2015). Zbog svoje dostupnosti i lakog rukovanja idealna je za istraživanja o polutantima u tlu.

Smanjenje reproduktivne sposobnosti parametar je koji nam može ukazati na stanje organizma. U provedenom istraživanju izlaganje nanočesticama srebra pokazalo je negativni utjecaj na reproduktivni uspjeh vrste *E. albidus*. Pri čemu se pokazalo da je reproduktivni uspjeh ovisan o koncentraciji određene veličine kao i o samoj veličini nanočestica.

Iako su upotrebljavane koncentracije AgNO₃ bile znatno manje od koncentracija AgNP te s obzirom da je AgNO₃ pokazao statistički značajnu inhibiciju reprodukcije u odnosu na kontrolu već pri koncentraciji C2 (30 mg/kg) možemo zaključiti da srebro u obliku nitrata ima toksičnije djelovanje nego u obliku nanočestica. Ovaj zaključak potvrđuju i prijašnja istraživanja (Gomes i sur. 2013; Topuz i Gestel 2015; Ribeiro i sur. 2015).

Osim potencijalnog utjecaja na odrasle jedinke, inhibiciju reprodukcije pomoću nanočestica i iona srebra mogla su prouzrokovati i oštećenja na membrani kokona sa smrtnom

posljedicom za embrio. Prelazak membrane kokona i oštećenje embrionskog tkiva otpuštanjem Ag^+ iona također je moguća opcija. Neke studije predlažu da nanočestice u embriju mogu utjecati na ekspresiju gena što za posljedicu može imati abnormalan razvoj i u konačnici smrt. Također moguće je da su juvenilne jedinke imale slabiju stopu preživljavanja nakon izlijevanja koja može biti uzrok odgođenog djelovanja većih nanočestica (Bicho i sur. 2016).

Korištene koncentracije nanočestica veličine 35 nm nisu značajno utjecale na reprodukciju u odnosu na kontrolu iako različite studije ukazuju na to da manje čestice uzrokuju veću toksičnost. U prilog tome ide studija Carlson i sur. (2008) gdje su korištene hidrokarbonom obložene nanočestice veličine 15 i 55 nm, koja je pokazala da su manje čestice izazvale više ROS- u staničnoj liniji makrofaga. U istraživanju Wang i sur. (2014) AgNP, obložene citratom, veličine 20 nm pokazale su veću toksičnost od onih veličine 110 nm na način da su generirale akutnu neutrofilnu upalu u plućima miša.

No istraživanju Kaba i sur. (2015) pokazalo je da veličina ne igra ulogu kada su u pitanju tumorske stanice (HeLa i U937) što bi moglo biti pripisano činjenici da interakcije AgNP variraju i ovisno o tipu organizma. Istraživanja praga toksičnosti različitih veličina nanočestica pokazalo je da je toksičnost ovisna o veličini kod specifičnih staničnih linija ali i da ta vrijednost nije uvijek ovisna samo o veličini. Stoga hipoteza da manje nanočestice pokazuju veću biološku aktivnost u odnosu na veće zahtjeva više dobro utvrđenih dokaza da bi bila prihvaćena (Aker i sur. 2018). Ovakvi rezultati idu u prilog rezultatima dobivenim u ovom istraživanju gdje nanočestice veličine 50-60 nm, u odnosu na kontrolu, inhibiraju reprodukciju pri najvećoj korištenoj koncentraciji (1000 mg/kg). A čestice srebra veličine 150 nm inhibiraju reprodukciju već pri koncentraciji od 300 mg/kg što ukazuje na to da se toksičnost povećava s veličinom čestice.

Velike NP lakše ulaze endocitozom nego male NP. Po ulasku NP se redistribuiraju ovisno o nasljednom uzorku vezikula tijekom mitoze stanice. Pretpostavlja se da je nasljeđivanje organela stohastično sa nasumičnom distribucijom NP između stanica kćeri. Postoji konsenzus o sposobnosti NP da ostanu u stanici nekoliko generacija zbog čega, nakon mitoze, samo dio stanica posjeduje NP. Postojanje NP u unutarstaničnom okolišu nekoliko generacija ugrožava održivost te linije, dok dio populacije stanica bez NP prolazi kroz normalnu mitozu i omogućava ponovno uspostavljanje normalne populacije stanica. Velike nanočestice imaju manje atoma na površini zbog čega je teže odvojiti površinske ione od same strukture. Nasuprot njima male čestice otpuštaju više Ag^+ . Stoga nakon nekoliko generacija stanice koje sadrže veliki broj malih, više reaktivnih NP ulaze u apoptozu, dopuštajući stanicama bez AgNP da obnove populaciju stanica. U slučaju velikih NP stanice ne podliježu apoptozi u toj količini,

zbog čega stanične linije s AgNP imaju veću stopu preživljavanja ali s potencijalnim kromosomskim mutacijama i genotoksičnim oštećenjima (Souza i sur. 2016).

Toksičnost AgNP pod utjecajem je varijacije veličine čestica što se očituje u ovom radu, no isto tako razlike u toksičnosti ovisne su o koncentraciji pojedine veličine čestica. Pa tako pri koncentraciji od 300 mg/kg postoji razlika u utjecaju na reprodukciju kod veličina 50-60 i 150 nm. Pri koncentraciji od 900 mg/kg postoji razlika između nanočestica veličine 50-60 i 150 nm, dok pri koncentraciji od 1000 mg/kg postoji razlika u utjecaju na reprodukciju između veličina 35 i 150 nm.

Korištenjem molekularnih markera također se dobiva uvid u biološki učinak i toksičnost analizirane tvari. Rezultati mjerenja razine GST pokazuju pojačanu aktivnost kod nanočestica veličine 50-60 nm pri koncentraciji C2, C4 i C5 ali ne i C3.

Poznato je da izlaganje nanočesticama srebra inducira proizvodnju ROS-a. Također je poznato da AgNP imaju sposobnost oksidirati do Ag^+ , no nije poznato u kojoj mjeri sama nanočestica izaziva ROS, a koliko su za to zaslužni Ag^+ ioni. Većina organizama ima razvijen mehanizam antioksidativne obrane s ciljem balansiranja prirodno nastalog ROS-a. Taj mehanizam uključuje enzime kao što je katalaza, koja je direktno uključena u uklanjanje ROS-a, i glutation S-transferazu (GST), koja sudjeluje u antioksidativnoj aktivnosti glutaciona kroz konjugaciju ksenobiotika (Gomes i sur. 2015).

Do oksidativnog stresa u stanici dolazi kada generacija ROS-a premašuje stanične antioksidativne kapacitete. Osim oštećenja staničnih proteina, lipida i DNA povećana količina ROS-a može biti okidač koji dovodi do programirane stanične smrti, odnosno apoptoze (Park i sur. 2011). GSH je jedan od ključnih endogenih antioksidativnih čistača koji ima sposobnost reducirati ROS. Stoga se GSH antioksidativni sustav smatra kritičnom obranom u preživljavanju stanice. AgNP mogu povećati količinu unutarstaničnog ROS-a redukcijom razine GSH kroz inhibiciju enzima koji sintetiziraju GSH. S obzirom da je poznato da GSH ulazi u interakciju s ionima te da ima visok afinitet za Ag, moguće je da je se vezao direktno za Ag^+ ione kao odgovor na oksidativni stres. Do povećane aktivnosti GST došlo je radi potrebe za konverzijom GSH u GSSG.

Statistički neznačajne promjene zamijećene u odgovoru katalaze u odnosu na kontrolu sugeriraju na manje izražen odgovor ove stanične obrane u usporedbi s GST. No, duži period izlaganja AgNP (u slučaju ovog istraživanja, 3 tjedna) može uzrokovati visoku razinu stresa ili oštećenja uzrokovanu korištenim koncentracijama, što može dovesti do kolapsa ili poremećaja mehanizma antioksidativne obrane i posljedično promjene katalaze koja nije statistički

značajna u odnosu na kontrolu. Moguće je da bi se povećana aktivnost katalaze mogla zabilježiti u kraćim testovima (Gomes i sur. 2015).

Acetilkinesteraza (AChE) uz acetikolin (ACh) i njegove receptore sudjeluje u prijenosu akcijskog potencijala između sinapsi živaca ili neuromuskularnih sinapsi. Fiziološka funkcija ovog enzima je da hidrolizira razgradnju acetilkolina s čime prekida prijenos živčanog impulsa. Vežanjem inhibitora na aktivno mjesto enzima neke tvari onemogućuju njegovu katalitičku ulogu, što dovodi do nakupljanja acetilkolina u sinapsama ili neuromuskularnim pukotinama (Quinn 1987). S obzirom da ni jedna veličina nanočestica kao ni AgNO_3 nisu pokazali statistički značajne promjene aktivnosti AChE u odnosu na kontrolu možemo zaključiti da ovaj enzim nije ciljna struktura AgNP.

5. ZAKLJUČAK

Razlika utjecaja veličine nanočestica srebra utvrđena je pomoću reproduktivnog testa te mjerenjem sljedećih biokemijskih markera: acetilkolin-esteraza (AChE), katalaza (CAT), glutation S – transferaza (GST). Nakon provedenih testova utvrđeni su sljedeći zaključci:

- Izlaganje nanočesticama srebra pokazalo je negativni utjecaj na reproduktivni uspjeh enhitreja vrste *E. albidus*, pri čemu se pokazalo da je reproduktivni uspjeh ovisan o koncentraciji kao i o samoj veličini nanočestica.
- Korištene koncentracije nanočestica veličine 35 nm nisu značajno utjecale na reprodukciju u odnosu na kontrolu.
- Nanočestice veličine 50-60 nm, u odnosu na kontrolu, inhibiraju reprodukciju samo pri najvećoj korištenoj koncentraciji (1000 mg/kg).
- Čestice srebra veličine 150 nm, u odnosu na kontrolu inhibiraju reprodukciju već pri koncentraciji od 300 mg/kg.
- Pri koncentraciji od 300 mg/kg postoji razlika u utjecaju na reprodukciju kod veličina 50-60 i 150 nm.
- Pri koncentraciji od 1000 mg/kg postoji razlika u utjecaju na reprodukciju između veličina 35 i 150 nm.
- Pri koncentraciji od 900 mg/kg postoji razlika između nanočestica veličine 50-60 i 150 nm.
- Korištene koncentracije svih veličina nanočestica nisu značajno utjecale na aktivnost enzima AChE i CAT.
- Pojačanu aktivnost enzima GST uzrokovale su samo nanočestice veličine 50-60 nm pri koncentracijama 300, 900 i 1000 mg/kg.
- Usporedba aktivnosti enzima kod različitih veličina nanočestica nije dala značajnu razliku.

6. LITERATURA

Ahmed, S., Ahmad, M., Lal Swami, B., Ikram, S. (2016) A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: A green expertise. *Journal of Advanced Research* 7:17-28.

Akter, M., Sikder, M.T., Rahman, M.M., Atique Ullah, A.K.M., Hossain, K.F.B., Banik, S., Hosokawa, T., Saito, T., Kurasaki, M. (2018) A systematic review on silver nanoparticles-induced cytotoxicity: Physicochemical properties and perspectives. *Journal of Advanced Research* 9:1–16.

Arora, S., Jain, J., Rajwade, J.M., Paknikar, K.M. (2008) Cellular responses induced by silver nanoparticles: In vitro studies. *Toxicology Letters*, 179:93-100.

Atkinson, A. J., Magnuson, W.G., Colburn, W.A., DeGruttola, V.G, DeMets, D.L., Downing, G.J., Hoth, D.F., Oates, J.A., Peck, C.C, Schooley, R.T., Spilker, B.A, Woodcock, J., Zeger, S.L. (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 69:89-95.

Buzea, C., Pacheco, I. I., Robbie, K. (2007) Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4):1934-8630.

Bicho, R.C., Ribeiro, T., Rodrigues, N.P., Scott-Fordsmand, J.J. Amorim, M.J.B. (2016) Effects of Ag nanomaterials (NM300K) and Ag salt (AgNO₃) can be discriminated in a full life cycle long term test with *Enchytraeus crypticus*. *Journal of Hazardous Materials*, 318:608-614.

Carlson, C., Hussain, S.M., Schrand, A.M., Braydich-Stolle, L.K., Hess, K.L., Jones, R.L. (2008) Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *The Journal of Physical Chemistry B*, 112(43):13608-19.

Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C. (2004) Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61: 192–208.

Claiborne A. (1985) Catalase activity. In : R. A. Greenwald (ed.), CRC Handbook of methods of oxygen radical research, 283-284.

Ellman G.L., Courtney K.D., Andreas V., Featherstone R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7:88-95.

Erséus, C., Klinth, M.J., Rota, E., De Wit, P., Gustafsson, D.R., Martinsson, S. (2019) The popular model annelid *Enchytraeus albidus* is only one species in a complex of seashore white worms (Clitellata, Enchytraeidae). *Organisms Diversity & Evolution*, 19(2):105-133.

Fairbrother, A., Hope, B. Terrestrial ecotoxicology. 2nd Chapter NA, Wexler, P. (ed.), *Encyclopedia of Toxicology*. Elsevier Ireland Limited, 138-142.

Gao, X. et al. (2008). Nonparametric Multiple Comparison Procedures for Unbalanced One-Way Factorial Designs. *Journal of Statistical Planning and Inference*, 138:2574 - 2591.

Gomes, S.I.L. Hansen, D. Scott-Fordsmand, J.J., Amorim, M.J.B. (2015) Effects of silver nanoparticles to soil invertebrates: Oxidative stress biomarkers in *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*. 199:49-55.

Gomes, S.I.L., Soares, A.M.V.M., Scott-Fordsmand, J.J., Amorim, M.J.B. (2013) Mechanisms of response to silver nanoparticles on *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta): Survival, reproduction and gene expression profile. *Journal of Hazardous Materials*, 254– 255, 336– 344.

Gomes, S.I.L. Roca, C.P. Scott-Fordsmand, J.J., Amorim, M.J.B. (2017) High-throughput transcriptomics reveals uniquely affected pathways: AgNPs, 2 PVP-coated AgNPs and Ag NM300K case studies. *Environmental Science: Nano*, 4:929-937.

Habig W.H., Pabst M.J., Jakobi W. (1974) Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The journal of biological chemistry* 249:22.

Kaba, S.I., Egorova, E.M. (2015) In vitro studies of the toxic effects of silver nanoparticles on HeLa and U937 cells. *Nanotechnology, Science, Applications*, 8:19–29.

Khan, I., Saeed, K., Khan, I. (2017) Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*, 1878-5352.

Konietschke, F., Placzek, M., Schaarschmidt, S., Hothorn, L.A. (2014) nparcomp: An R Software Package for Nonparametric Multiple Comparisons and Simultaneous Confidence Intervals. *Journal of Statistical Software*, 61(10):1-17.

Lobe, P. D. D., Filser, J., Otomo, P.V. (2018) Avoidance behaviour of *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta) after exposure to AgNPs and AgNO₃ at constant and fluctuating temperature. *European Journal of Soil Biology*, 87:40–45.

Maria, V.L., Ribeiro, M.J., Guilherme, S., Soares, A.M.V.M., Scott-Fordsmand, J.J., Amorima, M.J.B. (2018) Silver (nano)materials Cause Genotoxicity In *Enchytraeus crypticus*, As Determined By the Comet Assay. *Environmental Toxicology*, 37(1):184-191.

Nyoka, N.W.K., Kanyile, S.N., Bredenhand, E., Prinsloo, G.J., Otomo, P.V. (2018) Biochar alleviates the toxicity of imidacloprid and silver nanoparticles (AgNPs) to *Enchytraeus albidus* (Oligochaeta). *Environmental Science and Pollution Research*, 11:10937-10945.

OECD (2015), Guidelines For The Testing Of Chemicals; Enchytraeid Reproduction Test.

Park, M.V.D.Z., Neigh, A.M., Vermeulen, J.P., de la Fonteyne, L.J.J., Verharen, H.W., Briedé, J.J., van Loveren, H., de Jong, W.H. (2011) The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials*, 32:9810-9817.

Quinn, D. M. (1987) Acetylcholinesterase: Enzyme Structure, Reaction Dynamics, and Virtual Transition States. *Chemical Reviews*, 955-979.

R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>

Ramakrishna, D., Pragna, R. (2011) Nanoparticles: Is Toxicity a Concern? The Journal Of The International Of Clinical Chemistry And Laboratory Medicine 22(4): 92–101.

Ribeiro, M.J., Maria, V.L., Scott-Fordsmand, J.J., Amorim, M.J.B. (2015) Oxidative Stress Mechanisms Caused by Ag Nanoparticles (NM300K) are Different from Those of AgNO₃: Effects in the Soil Invertebrate *Enchytraeus crypticus*. The International Journal of Environmental Research and Public Health, 12:9589-9602.

Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A. (2001) Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. Biochemical Journal, 360:1-16.

Souza, T.A.J., Franchi, L.P., Rosa, L.R., de Veiga, M.A.M.S., Takahashi, C.S. (2016) Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles of different sizes in CHO-K1 and CHO-XRS5 cell lines. Mutation Research, 795:70–83.

Topuz, E. van Gestel, C.A.M. (2015) Toxicokinetics And Toxicodynamics Of Differently Coated Silver Nanoparticles And Silver Nitrate In *Enchytraeus Crypticus* Upon Aqueous Exposure In An Inert Sand Medium. Environmental Toxicology and Chemistry, 42(12):2816–2823.

Topuz, E. van Gestel, C.A.M. (2017) The effect of soil properties on the toxicity and bioaccumulation of Ag nanoparticles and Ag ions in *Enchytraeus crypticus*. Ecotoxicology and Environmental Safety. 144:330-337.

Wang X., Ji Z., Chang C.H., Zhang H., Wang M., Liao Y.P. (2014) Use of coated silver nanoparticles to understand the relationship of particle dissolution and bioavailability to cell and lung toxicological potential. Small, 10:385–98.

Web izvori:

Web1:

<http://worthington-biochem.com/ECH/default.html>

Web 2:

<http://www.worthington-biochem.com/CTL/>

Web 3:

<https://www.semanticscholar.org/paper/The-role-of-glutathione-S-transferase-in-drug-Townsend-Tew/ab30694af2d523730bb36c7289c143150a7c2dc8>

Web 4:

<https://www.eurekalert.org/multimedia/pub/79653.php>