Utjecaj koizloženosti srebrnih nanočestica i indometacina na embrije ježinca Arbacia lixula

Lončarić, Nora

Undergraduate thesis / Završni rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Pula / Sveučilište Jurja Dobrile u Puli**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:137:613755

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Image not found or type unknown

Repository / Repozitorij:

Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula

zir.nsk.hr

Image not found or type unknown

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

NORA LONČARIĆ

UTJECAJ KOIZLOŽENOSTI SREBRNIH NANOČESTICA I INDOMETACINA NA EMBRIJE JEŽINCA ARBACIA LIXULA

Završni rad

Pula, srpanj, 2020.

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

NORA LONČARIĆ

UTJECAJ KOIZLOŽENOSTI SREBRNIH NANOČESTICA I INDOMETACINA NA EMBRIJE JEŽINCA ARBACIA LIXULA

Završni rad

JMBAG : 0303061031, redovna studentica

Studijski smjer: Preddiplomski sveučilišni studij, Znanost o moru

Predmet: Nanotehnologija u istraživanju mora

Mentor: prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

Pula, srpanj, 2020.

IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI (završni rad)

Ja, dolje potpisana Nora Lončarić,kandidatkinja za prvostupnika (baccalaureus) znanosti o moru ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mojega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Završnog rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da i koji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da nijedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

Studentica: Nora Lončarić

_____

U Puli, 3. srpnja, 2020. godine

IZJAVA
o korištenju autorskog djela
(završni rad)

Ja, Nora Lončarić dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom Utjecaj koizloženosti srebrnih nanočestica i indometacina na embrije ježinca *Arbacia lixula* koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu s Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama.

Za korištenje autorskog djela na gore navedeni način ne potražujem naknadu.

U Puli, 3. srpnja, 2020.

Potpis

_____

Ovaj je završni rad izrađen u Laboratoriju za morsku nanotehnologiju i biotehnologiju Centra za istraživanje mora, Institut Ruđer Bošković, pod vodstvom prof. dr. sc. Daniela Marka Lyonsa, u sklopu Sveučilišnog preddiplomskog studija Znanosti o moru na Odjelu za prirodne i zdravstvene studije, Sveučilište Jurja Dobrile u Puli. Rad je vezan uz projekt Hrvatske zaklade za znanost IP-2018-01-5351 pod naslovom "Određivanje fizikalno-kemijskih svojstava i toksičnosti nanočestica srebra, bakra i plastike kao potencijalno štetnih novih materijala u obalnim vodama".

Mentor: prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

Rad je predan na ocjenu povjerenstvu za ocjenjivanje i obranu u sastavu:

Predsjednik: izv. prof. dr. sc. Mauro Štifanić
Sveučilište Jurja Dobrile u Puli
Članica: doc. dr. sc. Ines Kovačić
Sveučilište Jurja Dobrile u Puli
Mentor: prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons
Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, Rovinj

Radi stjecanja zvanja Prvostupnice (Baccalaureus) znanosti o moru

Datum i mjesto obrane završnog rada: 3. srpnja, 2020.; Sveučilište Jurja Dobrile u Puli.

Sadržaj

1. UVOD 1
1.1. Nanotehnologija i nanočestice 1
1.1.1. Podjela nanočestica 2
1.1.2. Proizvodnja nanočestica 5
1.2. Nanočestice srebra 7
1.2.1. Uporaba AgNP 8
1.2.2. Fizikalno- kemijska svojstva koja mogu utjecati na toksičnost nanočestica srebra 10
1.2.3. Utjecaj na okoliš 11
1.2.4. Izvori AgNP 12
1.2.5. Sudbina i transport AgNP 13
1.2.6. Utjecaj AgNP 13
1.3. Indometacin 14
1.4. Echinodermata (bodljikaši) 15
1.4.1. Ježinci 16
1.4.2. Reprodukcijski ciklus ježinaca 17
1.4.3. Arbacia lixula 19
2. CILJ ISTRAŽIVANJA 20
3. MATERIJALI I METODE 21
3.1. Kemikalije 21
3.2. Određivanje učinka indometacina i nanočestica srebra pomoću testa embrionalnog razvoja ježinca *Arbacia lixula* 21
3.2.1. Sakupljanje ježinca 21
3.2.2. Izdvajanje gameta i oplodnja 21
3.2.3. Tretiranje zigota ježinca sa indometacinom i AgNP 22
3.3. Oksidacijski stres 23
4. REZULTATI 24
4.1. Uspješnost razvoja embrija *Arbacia lixula* nakon tretiranja zigota sa indometacinom 24
4.2. Uspješnost razvoja ježinca *Arbacia lixula* tretiranih sa nanočesticama srebra koncentracije 5 μg L^{-1} i 50 μg L^{-1} 26
4.3. Postotak uspješnosti razvoja embrija *Arbacia lixula* tretiranih sa kombinacijama indometacina i nanočesticama srebra 26
4.4. Određivanje razine oksidativnog stresa 28
5. RASPRAVA 29
6. ZAKLJUČAK 32

7. LITERATURA..... 33
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA 35
BASIC DOCUMENTATION CARD 37

1. UVOD

Farmaceutska industrija svake godine sve više raste kako bi se poboljšalo zdravlje ljudi, međutim većina nije svjesna kako proizvodnja lijekova utječe na okoliš u kojem živimo. Mnoge farmaceutske industrije nepravilno skladište otpadne tvari (Vrček i sur). Međutim, za zdrav život potreban je i zdrav okoliš te se počinje sve više i više istraživati negativan utjecaj štetnih supstanci iz farmaceutske industrije na okoliš. Broj takvih istraživanja potrebno je povećati te ih, ukoliko je moguće, dovesti do nacionalnih mjera.

Štetne tvari mogu dospjeti u morski ekosustav putem otpadnih voda iz naseljenih područja ili brodova, ali i preko otpadnih voda iz farmaceutske industrije. Ostali načini kojima supstance lijekova dospijevaju u more su akvakultura, stočarstvo i vrtlarstvo gdje se koriste lijekovi za liječenje životinja ili zaštitu biljaka. Nepravilno odlaganje farmaceutskog otpada predstavlja prijetnju i opasnost morskim sustavima zbog mogućnosti prelijevanja otpada u more sa obalnih odlagališta otpada.

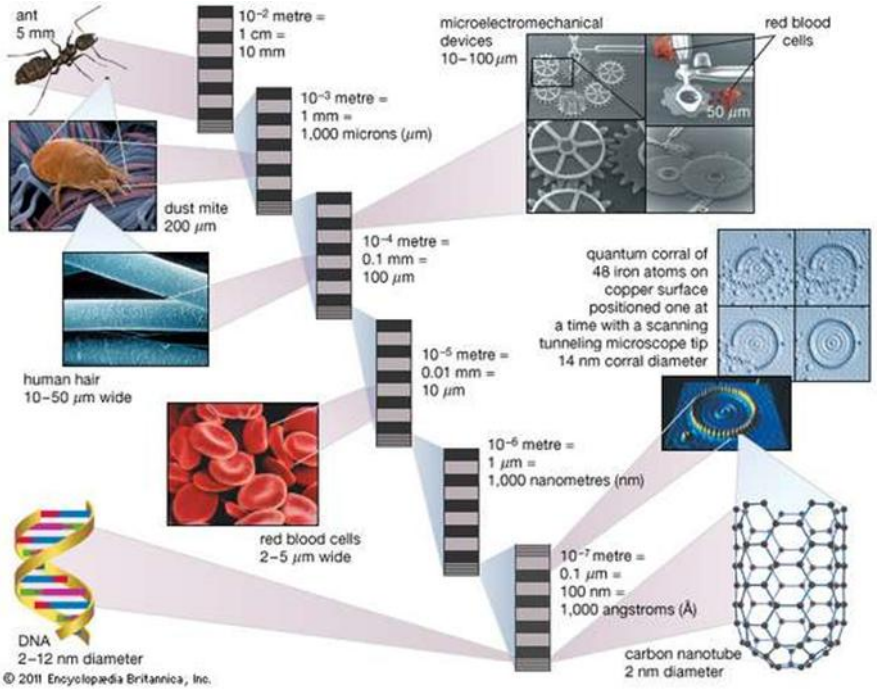
Veliki napredak u farmaceutskoj industriji je otkriće nanočestica. Nanočestice služe za prijenos lijeka ili neke druge supstance do specifične stanice, a posebno se koriste kod liječenja raka. Osim u farmaceutskoj industriji, nanočestice imaju širu uporabu. Koriste se i u tekstilnoj industriji, kozmetici, posebno u kremama za sunčanje i sl.

1.1. Nanotehnologija i nanočestice

Jedan od prvih začetnika nanotehnologije je Richard P. Feynman, dobitnik Nobelove nagrade za fiziku. Njegovo najpoznatije predavanje bilo je 1959. pod imenom „There's Plenty of Room at the Bottom" (Feynman, 1960). Nanotehnologija obuhvaća materijale veličine manje od 100nm (Laurent i sur., 2010). U metarskom sustavu prefiks „nano" podrazumijeva veličinu od 10^{-9}.

1.1.1. Podjela nanočestica

Nanočestice se mogu podijeliti u razne grupe na osnovu veličine, oblika ili materijala. ISO standard definira podjelu na dvo dimenzionalne nano objekte (nanodiskovi) i jednodimenziomalne nano objekte (nanožice i nanocijevi).



Slika 1: Usporedba veličina nanočestica i tvari u prirodi (Jarvie, 2020.)

Godine 2011, komisija Europske Unije je ponudila definiciju nanomaterijala:

Prema dimenzijama nanomaterijali se dijele na:

- nanomaterijale kod kojih su sve tri dimenzije manje od 100 nm (nanočestice, kvantne točke, nanoljuske, nanoprstenovi, nanokapsule);
- nanomaterijale čije su barem dvije dimenzije manje od 100 nm (nanocijevi, nanovlakna, nanonožice);
- nanomaterijale kod kojih je barem jedna dimenzija manja od 100 nm (tanki filmovi, slojevi i presvlake).

Prema autoru Ghasemzadeh i sur. (2013.) predložena je sljedeća podjela:

- materijali bazirani na ugljiku
- materijali bazirani na metalima
- dendrimeri
- kompozitni nanomaterijali

Podjela na temelju fizikalnih i kemijskih karakteristika

Na temelju fizikalnih i kemijskih karakteristika, nanomaterijali se dijele na nanomaterijale od ugljika, nanočestice metala, keramike, poluvodiča, polimera i nanočestice temeljene na tekućem stanju.

Osnovna podjela nanomaterijala koji sadrže ugljik je na fulerene i ugljikove nanočestice. Nanomaterijal fulerena u obliku je okruglog šupljeg kaveza koji se sastoji od peteročlanih i šesteročlanih prstena ugljika (Slika 2). Zbog električne vodljivosti, visoke čvrstoće, strukture, afiniteta elektrona i svestranost (Astefanei i sur., 2015), privukao je veliki komercijalni interes.

Ugljikove nanocijevi su izdužene, cjevaste strukture, promjera 1–2 nm (Ibrahim, 2013). Mogu biti metali ili poluvodiči ovisno o njihovom promjeru. Strukturno su slične zarolanim listovima grafita. Zarolani listovi mogu biti jednostruki, dvostruki ili višeslojni, pa ih se nazivaju jednostrukim (engl. *single-walled carbon nanotubes*, SWNT), dvozidnim (engl. *double-walled carbon nanotubes*, DWNT) ili višezidnim ugljikovim nanocijevima (engl. *multi-walled carbon nanotubes*, MWNT). Sintetizirani su taloženjem prekursora ugljika, posebno atoma ugljika, laserskim isparavanjem iz grafita ili djelovanjem električnim lukom na metalne čestice. Tehnika koja se koristi u posljednje vrijeme je taloženje čestica kemijskim parom (Elliott i sur. 2013). Ove čestice se ne koriste samo u njihovom osnovnom obliku već i u obliku nanokompozita namijenjene za brojne komercijalne primjene kao što su punila (Saeed i Khan, 2014; 2016), učinkoviti adsorbensi plina za sanaciju okoliša (Ngoy i sur., 2014) i kao potporni medij za različite anorganske i organske katalizatore (Mabena i sur., 2011).

Nanočestice metala se dobivaju od nanočestica raznih metala. Posjeduju dobra optoelektrična svojstva zbog dobro poznatih svojstava lokalizirane površinske plazmonske rezonance. Nanočestice alkalijskih i plemenitih metala, tj. Cu, Ag i Au imaju široku apsorpcijsku dužinu u vidljivoj zoni elektromagnetskog spektra sunca.

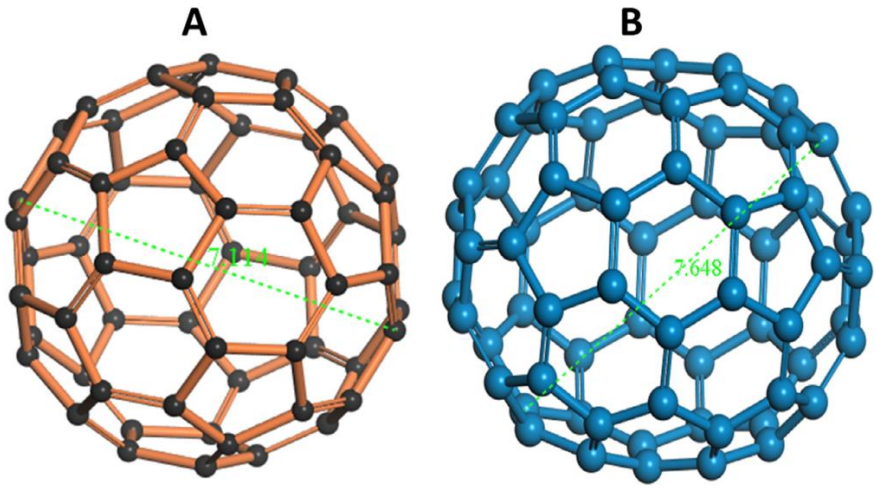
Nanočestice zlata koriste se kod skenirajućeg elektronskog mikroskopa jer poboljšavaju tok elektrona čime se postiže kvalitetnija slika.

Nanočestice keramike su anorganske krute tvari. Sintetiziraju se toplinom i sukcesivnim hlađenjem. Nalaze se u amorfnim, polikristalnim, gustim, poroznim ili šupljim oblicima (Sigmund i sur., 2006). Procesi u kojima se koriste su katalizacija, fotokataliza, fotodegradacija boja i kod obrade slika. (Thomas i sur., 2015).

Poluvodići imaju svojstva metala i nemetala. Zbog širokog energetskog razmaka mogu se prilagoditi i na taj način izmjenjivati svoja svojstva. Vrlo su važni materijali u fotokatalizi, foto-optičkim i elektroničkim uređajima (Sun, 2000.) radi svojih svojstva. Svojstvo prilagođavanja energetskih razmaka postalo je korisno i kod procesa razdvajanja vode na kisik i vodik (Hisatomi i sur., 2014).

Nanočestice polimera su obične organske nanočestice. Najčešće su oblika nanosfere i nanokapsula (Mansha i sur., 2017). Kod nanosfere ukupna masa čestica matriksa je u krutom stanju, a kod nanokapsula molekule se apsorbiraju na vanjskoj granici površine sfere. Naknadno se kruta masa potpuno inkapsulira unutar čestice (Rao i Geckeler, 2011).

Nanočestice temeljene na tekućem stanju sadrže dijelove sastavljene od lipida i uspješno se primjenjuju u biomedicini. Lipidne nanočestice su sfernog oblika s promjerom od 10 do 1000 nm. Posjeduju čvrstu jezgru načinjenu od lipida, dok matrica sadrži topljive lipofilne molekule. Vanjsku jezgru im stabiliziraju surfaktanti ili emulgatori (Rawat i sur., 2011). Postoji posebna grana koja se naziva nanotehnologija lipida (Mashaghi i sur., 2013) koja je usredotočeno na dizajniranje i sintezu lipidnih nanočestica za različite primjene kao što su nosači lijekova (Puri i sur., 2009), primjerice oslobađanje RNA u ciljanim stanicama za vrijeme terapije raka (Gujrati i sur., 2014).

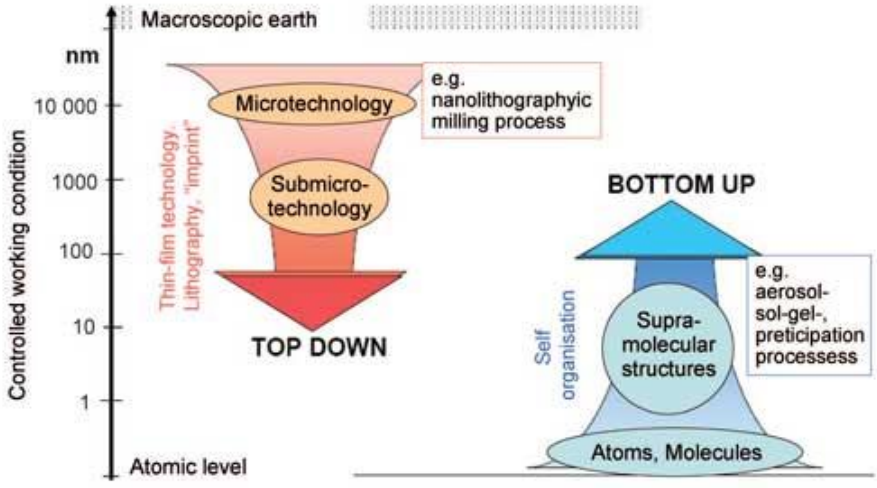


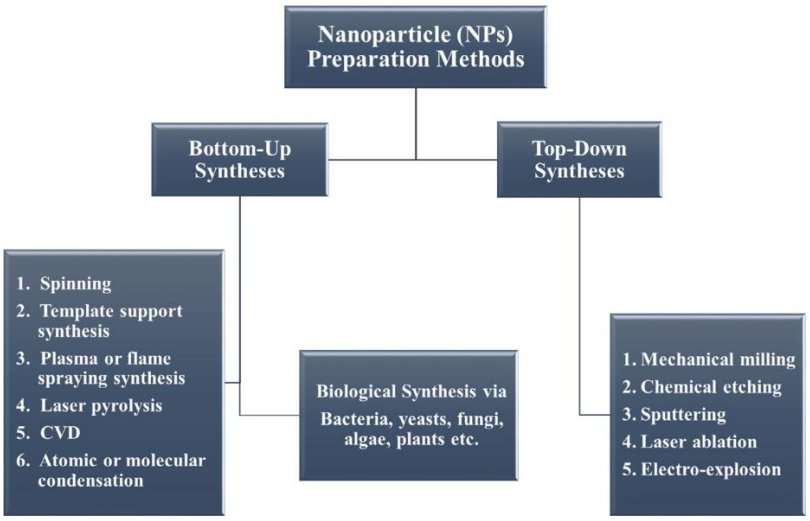
Slika 2. Različiti oblici fulerena („bucky-balls“); A) C_{60}, B) C_{70} (Khan i sur., 2017.)

1.1.2. Proizvodnja nanočestica

Veličina čestica, kemijski sastav, kristalizacija i oblik ovise o parametrima tijekom proizvodnje kao što su temperatura, pH vrijednost, koncentracija, kemijski sastav, modifikacija površine i kontrola procesa.

Dvije osnovne strategije koje se koriste u proizvodnji nanočestica su: „odozdo prema gore" (engl. *Bottom-Up*) i „odozgo prema dolje“ (engl. *Top-Down*). Kod „Top-Down“ pristupa dolazi do mehaničkog drobljenja izvornog materijala primjenom postupka mljevenja. Od većeg materijala se dobivaju sitnije čestice. Kod strategije „Bottom Up“ strukture su izgrađene kemijskim procesima. Ovisno o kemijskom sastavu i željenim svojstvima nanočestica, odabire se odgovarajuća strategija.





Slika 3A i B. „Top-down“ i „Bottom-up“ metode proivodnje nanočestica (https://www.nanowerk.com/how_nanoparticles_are_made.php; Khan i sur., 2017.)

Metoda „Top-Down" odnosi se na mehaničko-fizičke procese proizvodnje čestica. Koristi se destruktivni pristup. Polazeći od veće molekule, koja se razgrađuje u manje jedinice, a zatim se te jedinice pretvaraju u nanočestice. Nanomaterijali se mogu stvoriti mehaničko-sintetičkom metodom mljevenjem pomoću kuglica. To je oblik mehaničkog oštećenja pri čemu se kinetička energija iz medija za mljevenje prenosi na materijal koji prolazi kroz redukciju. Industrijski procesi proizvodnje su kompakcija i konsolidacija u kojima se nanomaterijali spajaju da bi se poboljšala svojstva spoja. Na taj se način dobivaju metalne legure. Postoje i toplinske metode koje ispuštaju toplinu tijekom procesa. Jedna takva metoda je *elektrospinin*g koji oblikuje trajne materijale. Kod visokoenergetskih metoda potreban je veliki unos energije u obliku topline, solarne energije ili električne energije. Kod takvih metoda dolazi do visokog (naprednog) potencijala što može predstavljati problem, osim kod metoda sunčevog toka jer je sunčeva svjetlost dostupna. Top Down metode su jednostavne za nadogradnju i široko su rasprostranjene. Litografskim metodama se mogu proizvesti svojstva mikro veličine no te su metode energetski intenzivne i zahtijevaju skupu opremu i uređaje. Vrsta litografije koja nije prema uobičajenim standardima je nanoimprint litografija. To je poput sinteze predložaka. Prvo se izrađuje materijal obrasca, a zatim se utiskuje u mekani polimerni materijal da bi se stvorio uzorak.

Nanosferna litografija koristi sfere lateksa koje tvore predložene matrice. Ove metode možemo nazvati šablonskim postupkom.

„Bottom-up“ metodom sinteze nanočestice se formiraju od manjih čestica zbog čega se naziva i metoda gradnje. Taloženje isparavanjem kemikalija (Chemical vapor deposition) je proces u plinskoj fazi u kojem reaktivni sastojci reagiraju preko katalizatora ili unaprijed zamišljene površine i tvore materijale nanostrukture. Ekonomična sinteza nanocjevčica ugljika radi pomoću CVD. Prekursori u obliku metana ili acetilena ili u obliku drugih plinova koji služe kao izvor ugljika, prolaze preko katalizatora Co, Fe ili Ni. Nanocjevčice nastaju katalizom čestica nakon razgradnje u ugljik. Taloženje atomskog sloja je industrijski postupak kojim se može jednoslojnim slojem ili sa više slojeva tankog filma prekrivati bilo koji materijal, bez obzira na veličinu. Ostale metode koje se smatraju „Bootom Up“ metodama su Epitaksija molekularnih zraka i MOCVD. Metode koje pripadaju tekućim fazama su mnogobrojne. Tijekom tekuće faze dolazi do spontanog sastavljanja i sinteze. Takve metode ne iziskuju visoke troškove i mogu se nadograditi. Vrlo jednostavni načini za izradu nanomaterijala su elektrodepozicija i taloženje bez elektrode (točkice, grozdovi, koloidi, šipke, žice, tanki slojevi). Nanomaterijal se može napraviti anodiziranjem aluminija za dobivanje strukture poroznog oksida. Porozna struktura je isto nanomaterijal, a porozne membrane mogu se koristiti kao nosaći za druge nanočestice.

Znanstvenici kontinuirano rade na novim „Boottom Up“ metodama. Mnoge nove metode nisu skupe. Međutim ima nedostataka koji podrazumijevaju uspostavljanje dugoročnog reda. Nove metode uključuju nanolithografiju (metoda olovke za olovku) i litografiju nanosfere.

1.2. Nanočestice srebra

Jedne od najpoznatijih nanočestica su nanočestice srebra. Upotrebljavaju se u raznim industrijama kao što su farmaceutska industrija i mikroelektronika.

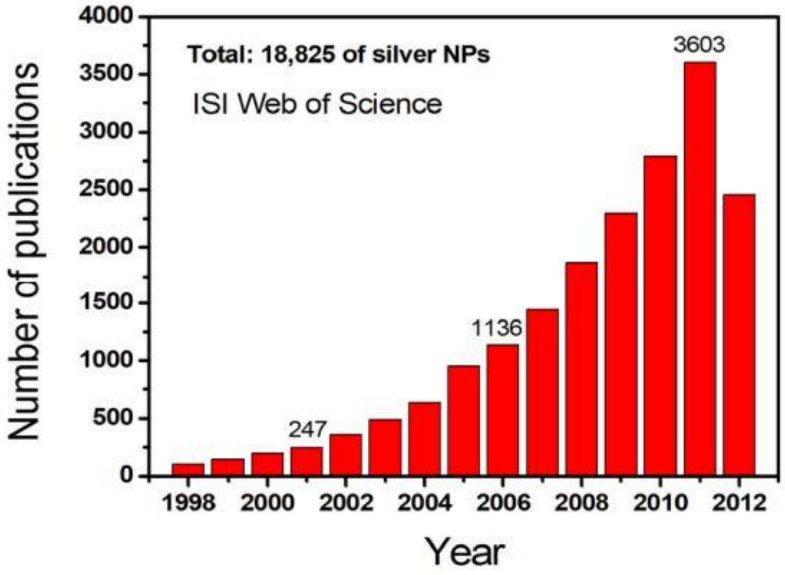
1.2.1. Uporaba AgNP

Nanočestice imaju drukčije karakteristike od spoja u krutim tvarima, te se primjenjuju u raznim granama kao što su medicina, kozmetika, kod obnovljivih izvora energije, u sanaciji okoliša i u biomedicini. Uporaba nanočestica prisutna je od davnih vremena. Koristile su se posude od srebra za održavanje čistoće vode i vina. Ljekovita svojstva srebra također su poznata od davnina. Srebrov nitrit se u 17. i 18. st. primjenjivao za liječenje čira i ulkusa želudca. Međutim, predugo izlaganje srebru, može prouzročiti akumulaciju srebra u tijelu te dovesti do promjene boje kože ili očiju. Zbog takvih posljedica, te razvijanja antibiotika, uporaba AgNP je prestala u razdoblju drugog svjetskog rata. Srebro nije dugo bilo izvan uporabe zbog toga jer su bakterije razvile otpornost tijekom duge uporabe antibiotika te spoznaje da nanočestice srebra imaju antibakterijsko djelovanje i mnoga druga svojstva. Privukle su posebnu pozornost zbog izuzetnih fizikalno-kemijskih svojstva. Neka od tih svojstva su visoka električna i toplinska vodljivost, pojačana površinska ramanska rezonancija, kemijska stabilnost, katalitička aktivnost i ne linearno optičko ponašanje. Zbog svog sitnog oblika, imaju veliku površinu te visoku površinsku energiju i više reaktivnih mjesta. Takva svojstva čine ih pogodnima za uporabu u tintama, mikroelektronici i kod medicinskih snimanja. Nanočestice srebra također se upotrebljavaju u proizvodima široke potrošnje kao što su plastika, sapuni, paste, hrana i tekstil jer pokazuju široki spektar bakterijske i fungicidne aktivnosti. Također se mogu koristit u tekućem stanju, u obliku koloida te se stavljaju u premaze i sprejeve ili šampone. U krutom stanju se koriste u matičnoj masi polimera ili su suspendirane u sapunici. U tekstilnoj industriji se ugrađuju u vlakna, a kod sustava za pročišćavanje vode se nalaze u filtracijskim membranama.

Prema projektu "Nanotehnologijama u nastajanju" (PEN, (http://www.nanotechproject.org) više od 1300 identificiranih nanotehnoloških proizvoda ušlo je na komercijalno tržište širom svijeta. Među njima je 313 proizvoda sa AgNP (24% nabrojanih proizvoda), čime su AgNP postale najveća i najbrže rastuća klasa nanočestica u potrošačkim proizvodima. Znanstvena zajednica i industrija posvetili su pažnju istraživanju nanočestica srebra zbog njezine široke primjene. Baze podataka su prikupljale podatke do 30. rujna 2012. sa „ISI Web of Science“ koristeći ključnu riječ „nanočestice srebra“. Utvrđeno je da postoji ukupno 18825 zapisa. Tijekom 10 godina, od 2001. do 2011. godine, broj objavljenih radova

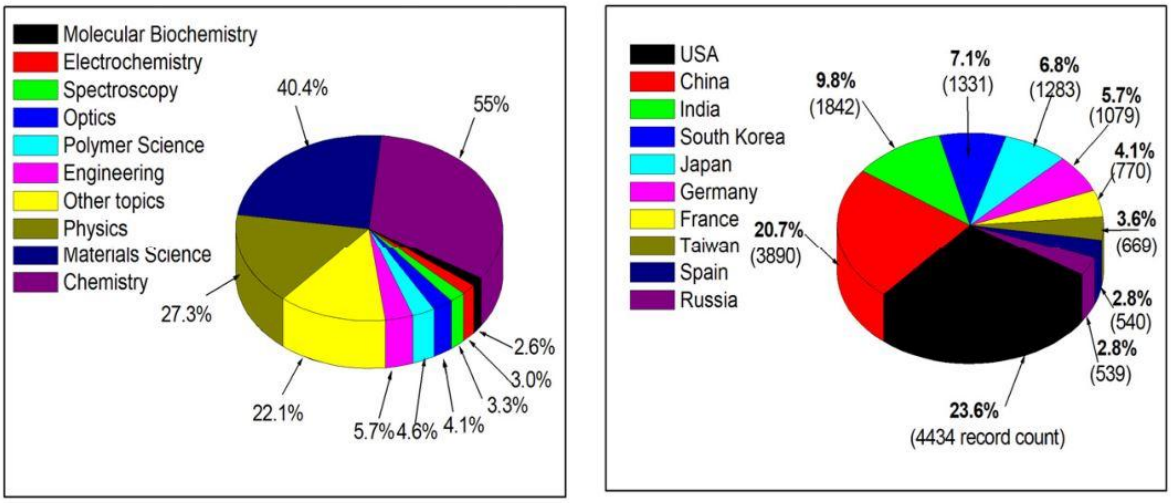
porastao je za gotovo 93% (sa 247 članaka 2001. do 3603 članaka do 2011.) (Slika 4).

Istraživano je zatim koje znanosti najviše istražuju nanočestice. Rezultati koji su dobiveni su: kemija (55%), znanost o materijalima (40.4%), fizika (27.3%), inžinjerstvo (5.7%), znanost o polimerima (4.6%), optika(4.1%), spektroskopija (3.6%), elektrokemija (3.0%), molekularna biokemija (2.6%) i drugi oblici (22.1%). Najveća područja istraživanja nanočestica srebra su kemija i znanost o materijalima. (slika 5A)



Slika 4. Statistička analize podataka o trendu objavljenih istraživačkih radova o nanočesticama (Tran i sur., 2012.)

Slijedeće istraživanje koje je napravljeno je podjela članaka po zemljama. Rezultati ukazuju da Kina ima najviše objavljenih članaka na temu nanočestica srebra sa ukupno 4434 (23,6%), a slijede SAD 3809 (20,7%), Indija 1842 (9,8%), Južna Koreja 1331 (7,1%), Japan 1283 (6,8%), Njemačka 1079 (5,7%), Francuska 770 (4,1%), Tajvan 669 (3,6%), Španjolska 540 (2,8%), Rusija 539 (2,8%) i te ostale zemlje. Zemlje koje objavljuju najviše radova vezanih za nanočestice srebra su Kina i SAD te zbog toga imaju i jednu od najvećih uporaba nanočestica srebra. (slika 5 B)



SLIKA 5.A i 5B Na slici A je prikazan postotak područja znanosti koje istražuju nanočestice, a na slici B postotak istraživanja na temu nanočestica po zemljama (Tran i sur., 2012.)

1.2.2. Fizikalno- kemijska svojstva koja mogu utjecati na toksičnost nanočestica srebra

Istraživanjem toksikologije nanočestica srebra je dokazano da su fizikalno-kemijska svojstva povezana sa toksičnošću jer mogu utjecati na interakciju nanočestica srebra s organizmom.

Najvažnija fizikalno-kemijska svojstva su: veličina, uključujući površinu, aglomeraciju i agregacijsko stanje; kemija površine, uključujući površinski naboj; oblik; i kemijski sastav.

Fizička svojstva ovise drastično o veličini, posebno kod nanočestica koje su manje od 100nm. Za tako male čestice vrijede pravila kvantne fizike što rezultira novim kemijskim, mehaničkim, električnim, optičkim i superparamagnetnim karakteristikama čestice. Sadrže karakteristike koje utječu na toksičnost, a to su: visoki omjer površine prema volumenu, visoka površinska reaktivnost, adsorpcija spojeva, sposobnost križanja staničnih membrana i snažne međustanične sile. Studije koje su proučavale toksičnost nanočestica ovisno o veličini dokazali su da su manje čestice više

citotoksične od većih primjeraka. Uzrok veće toksičnosti može biti da manje čestice imaju veću specifičnu površinu što dovodi do veće reaktivnosti ili pojačanog oslobađanja toksičnih iona srebra. Također treba napomenuti da je lakše predvidjeti kako će se ponašati manje čestice nego veće.

Nanočestice su omotane prevlakama od različitih tvari na svojoj površini koja posjeduju različita kemijska svojstva. Premazivanje nanomaterijala ima nekoliko svrha: izbjegavanje aglomeracije/agregacije, promjenu površinskog naboja, prijenos nanomaterijala do specifične stanice ili promjenu bioraspoloživosti i razgradnje čestica. Nanočestice srebra koje su imale prevlaku od polisaharida mogle su prodrijeti u organele stanica dok oni koji nisu imali takvu prevlaku nego su na površini imali ugljikovodični sloj agregirali su se te nisu probili u stanične organele. Nanočestice srebra obložene polisaharidom pokazale su najveću toksičnost. Razlika u toksičnosti može biti uzrokovana većim stupnjem aglomeracije nanočestica srebra koje nisu imale sloj od polisaharida te u razlikama u njihovom unosu i otapanju. Obje čestice su imale negativan naboj usprkos različitom kemijskom svojstvu površine (Foldbjerg i sur (2014)). Drugo istraživanje Foldbjerg i sur je pokazalo da su nanočestice srebra s površinskim slojem ugljikovodika bile toksičnije od onih obloženih polisaharidom što znači da drugi faktori poput vrste stanice, medija i vezanja serumskih proteina mogu utjecati na toksičnost. Također su istraživali toksičnost nanočestica srebra sa drukčijim premazima pozitivnog ili negativnog naboja. Rezultati su pokazali da su pozitivne čestice najviše toksične.

1.2.3. Utjecaj na okoliš

Zbog sve veće uporabe nanočestica srebra dolazi do opasnosti da dospiju u okoliš i naruše zdravlje živih organizma i ljudi. Mogu dospjeti u okoliš za vrijeme proizvodnje čestica, transporta, erozijom i tijekom pranja ili odlaganja proizvoda koji sadrže nanočestice srebra. Postoje brojni radovi koji su proučavali načine na koje nanočestice srebra dospjevaju u okoliš i njihovo ponašanje u okolišu. Benn i sur. (29), otkrili su da AgNP i Ag + mogu lako dospjeti u vodu pranjem čarapa koje sadrže AgNP. Neke marke čarapa izgubile su gotovo 100% ukupnog sadržaja srebra u četiri uzastopna pranja. Otkriveno je da odjeća koja zbog antibakterijskih svojstva sadrži AgNP, tijekom pranja u perilici rublja ispuštaja 11 mg L^{-1}. S.Yu, Y. Yin,J.Liu (2013) su

proučavali ponašanje AgNP u umjetno napravljenom sustavu estuarija. Otkriveno je da se AgNP optuštaju cijelo vrijeme tijekom eksperimenta od 60 dana. Te čestice mogu ući u okoliš estuarija, mogu biti adsorirane u pijesku, talogu ili u biofilmu. Počelo se više pažnje pridavati mogućem negativnom utjecaju AgNP zbog nakupljanja u organizmima kao što su školjke, škampi, puževi i neke biljke. Potrebno je dobro istražiti utjecaj prije nego se počne koristiti u sve većoj mjeri.

1.2.4. Izvori AgNP

Postoje razni izvori nanočestica. Prirodni izvori su dokaz da ljudi nisu jedini izvor nanosrebra. Nanosrebro je pronađeno na području iskopavanja srebra u Meksiku, također i u vodama esturija u Teksasu prije nego su ga ljudi počeli proizvodit. U istraživanju je dokazano da otopljene organske tvari u vodi mogu pomoću sunčeve svjetlosti fotokemijski reducirati ionsko srebro do nanočestica. Taj proces traje nekoliko sati i može se potvrditi analizom pomoću TEM-a, elektronskom difrakcijom odabranog područja (SAED), EDS-om i rentgenskom difrakcijom (XRD).Međutim, zbog prisutnosti anorganskih kationa poput Ca^{2+} i Mg^{2+} u vodama okoliša, takve nanočestice nisu bile stabilne i lako su se koegzicirale.Druga istraživanja su pokazala da nanosrebro može nastati oksidacijom i redukcijom iz objekta od srebra koji dospiju u okoliš. Poznato je i da biljke mogu apsorbirati ione metala i unijeti ih u organizam te dovesti do nanočestica.

Iako nanosrebro ima prirodne izvore, jedan od najvećeg izvora je ipak umjetna proizvodnja nanosrebra, odnosno antropogeni izvori. U okoliš može dospijeti preko otpadnih voda tvornica gdje su za sintezu nanosrebra potrebni procesi kao što su miješanje, filtracija i centrifuga za pročišćavanje nastalog nanosrebra. Nanosrebro je prisutno u obliku praha u zraku u tvornicama te može na različiti način dospjeti u okoliš. Kod uništavanja pakiranja koje sadrži nanočestice srebra postoji opasnost da čestice dospiju u okoliš.

1.2.5. Sudbina i transport AgNP

AgNP u okolišu prolaze kroz razne procese tijekom transporta. Mogu kao zasebne čestice u suspenziji ostati duže vrijeme u vodenim matricama te se na taj način transportirati daleko. Pri visokoj koncentraciji iona agregiraju se ili u prisustvu s kisikom i drugim oksidacijskim tvarima nastaje otopina Ag^+. U prisutstvu u sulfida, klorida ili drugih organskih prirodnih tvari, nanosrebro može reagirati pri čemu se mijenja kemijski identitet. Način na koji će AgNP reagirati ovisi najviše o površinskim svojstvima nanočestica i okruženja u kojem se nalazi te svojstvima kao što su sastav elektrolita, ionska snaga otopine, pH i prisutnost prirodne organske tvari (NOM).

AgNP dospijeva u vodeni ekosustav iz proizvoda koji sadrže nanosrebro, taloženjem na vodenim površinama iz zraka ili otjecanjem otpadnih voda koje sadrže naosrebro u vodene površine. Kada nanočestice absorbiraju NOM on može djelovati kao stabilizator što povećava pokretljivosti AgNP u vodenim sustavima. Stabilnost AgNP ovisi o vrsti i izvoru NOM-a, molekularnoj težini, koncentraciji i funkcionalnoj skupini spoja. Također, u vodi su prisutni dvovalentni kationi koji mogu inducirati agregaciju AgNP. AgNP u obliku koloidnih klasteri (grupa) talože se u sedimentu i time smanjuju bioraspoloživost za vodene organizme i biljke. S obzirom da AgNP nisu stabilni i podložni oksidaciji, može doći do sporog otapanja Ag^+. U vodama u prirodi pozitivno nabijeni slobodni Ag^+ pojavljuje se samo u ekstremno niskim koncentracijama. Ag + se veže s negativno nabijenim ligandima(S^{2-} , SO_4^{2-} ,CO_3^{2-}). U morskoj vodi Ag^+ reagira sa Cl^- iz natrijevog klorida te nastaju $AgCl_2$, $AgCl_3$ i $AgCl_4$, čime srebro postaje pokretljivije u morskoj vodi.

1.2.6. Utjecaj AgNP

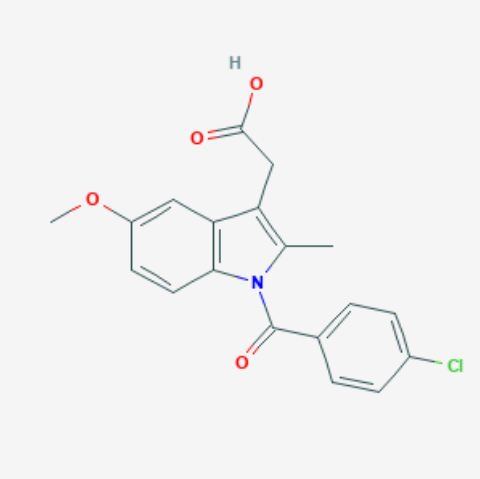
Jedan od najvažnijih utjecaja nano čestica srebra je stvaranje reaktivnih kisikovih spojeva (ROS). Reaktivni kisikovi spojevi nastaju u organizmu kao posljedica metabolizma kisika u stanicama i antioksidativni sustav stanice održava ravnotežu. No ukoliko dođe do prevelike proizvodnje ROS-ova, antioksidacijski sustav ne uspijeva neutralizirati sve ROS-ove te dolazi do oksidacijskog stresa. Slobodni radikali imaju štetan utjecaj jer mogu napasti stanične membrane, reagirati s lipidima, proteinima i nukleinskim kiselinama te poremetiti normalan stanični transportni

sustav. U istraživanju Lushchak i sur (2010) potvrđeno je da je toksičnost AgNP na HepG2 stanicu direktno povezana sa oksidativnim stresom. U istraživanju su uočeni lomovi DNA i proizvodnja oksidansa u stanicama HepG2 kada su izloženi AgNPs ili Ag^{+}. Kod stanica koje su prehodno tretirane antioksidansom N-acetilcisteinom, primjećeno je da nije došlo do oksidativnog stresa, kao ni do oštećenja DNA izazvanih AgNP. Time se dokazalo da toksičnost AgNP ovisi o proizvodnji ROS-a. U drugim istraživanjima uočeno je da je pri izlaganju bakterija AgNP došlo do uništavanja njihove membrane.

1.3. Indometacin

Indometacin je nestereoidni derivat indola. Ima protuupalna i kemopreventivna svojstva. Indometacin kao nesteroidni protuupalni lijek inhibira enzim ciklooksigenazu, sprečavajući tako nastajanje DNA adukta posredovanih ciklooksigenazom pomoću heterocikličkih aromatskih amina. Može također inhibirati ekspresiju proteina tipa 1 koji je zaslužan za otpornost na ljekove, što rezultira povećanom efikasnošću nekih antineoplastičnih sredstava u liječenju tumora koji su otporni na više lijekova. Pored toga, indometacin aktivira fosfataze koje inhibiraju migraciju i proliferaciju stanica karcinoma što može rezultirati apoptozom tumorskih stanica. (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Indomethacin)

U ekosustav ulazi vrlo jednostavno zbog antropogene aktivnosti. Gheorghe i sur u svom istraživanju su dokazali da su supstance lijekova, uključujući i indometacin u maloj mjeri prisutne u vodenom sustavu. Iako je prisutan u malim mjerama, također je opasan za žive organizme zbog toga jer može doći do bioakumulacije.



Slika 6. Strukturna formula indometacina (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Indomethacin)

1.4. Echinodermata (bodljikaši)

Riječ *echinoderm* dolazi od grčke riječi *ekhinos*, što znači jež ili morski jež, te riječ *derma*, što znači koža.

Bodljikaši su skupina morskih životinja u koju spadaju 7000 vrsta podijeljenih u 5 razreda: stapčari (*Crinoidea*), trpovi (*Holothuroidea*), ježinci (*Echinoidea*), zvjezdače (*Asteroidea*) i zmijače (*Ophiuroidea*). To su beskralježnjaci koji imaju peterozrakastu simetriju tijela, mezodermalni endoskeletni i vodeno-krvožilni sustav. Izrazito se sporo kreću. Vodeni krvožilni sustav služi za pokretanje i predatorstvo. Bodljikaši pumpaju vodu kroz sito ili ploču koja se naziva madreporit, a ta voda ispunjava njihove nožice pomoću kojih se kreću po podlozi, najčešće kamenitoj. Voda širi njihove nožice, a mišići unutar nožica služe da ih uvuku natrag. Takve nožice služe i za prijanjanje na stijene i druge podloge, također i za usisavanje plijena.

TABLE 1.1

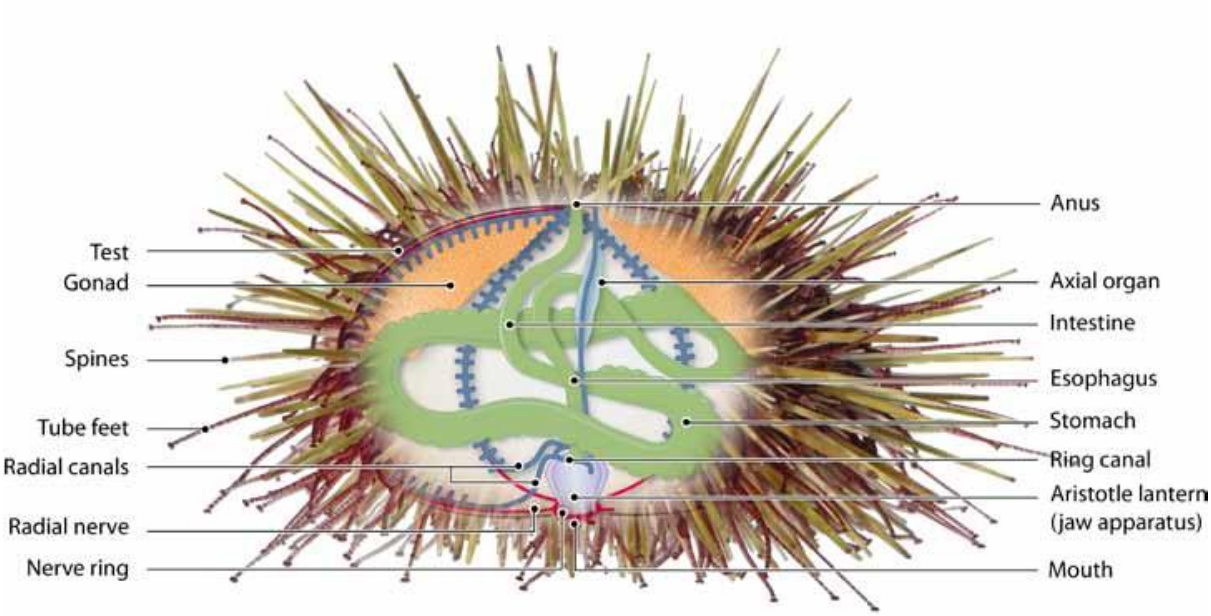
Structural diversity in echinoderms (collated from different sources)

Structure	Crinoidea	Holothuroidea	Echinoidea	Asteroidea	Ophiuroidea
Morphology	Stalked or stalkless cup-like body with branched or unbranched pinnated arms and mouth facing upwards	Elongated body on oral-anal axis; modified podia encircle the mouth	Globose, oval or discoid body moving on oral surface	Pentagonal oral-aborally flattened disk with ray-like arms; moving on oral surface	Central stellate, oral-aborally flattened disk with ray-like arms; moving on oral surface
Motility	Mostly sessile	Mostly sedentary	Slow motile by podia and/or spines	Motile by tube feet	Motile by tube feet
Anatomy	Water-vascular system lacks direct exterior opening. Anus opens aborally	Respiratory tree. Anus opens aborally	Mastigating Aristotle's lantern in sea urchins. Anus opens aborally	External digestion by everted cardiac stomach. Anus may be absent	Anus absent. Unlike in asteroids, ambulacral groove is closed
Reproduction	Discrete gonad is absent. Sexual only but autotomic	Median ovary/ovotestis open at the oral end. Asexual by transverse fission	> 70% of spacious coelom occupied by 5 or more lobulated gonads terminating in aboral sinus. Sexual only	Spacious coelom occupied by tubular lobulated/saccular gonad projecting into the arms. Asexual by fission and clonal autotomy, autotomic	Saccular gonad attached to coelomic bursae; through bursal slit, gametes released. Asexual by fission. Autotomic
Regeneration	Autotomized arms and pinmules are readily regenerated. Induced evisceration in *Antedon*	Regeneration of auto-eviscerated gut is common	Spines, pedicellariae and podia are readily regenerated	Autotomized arms and disks are readily regenerated	Autotomized arms and disks are readily regenerated

Slika 7. Strukturalne razlike između različitih podjela bodljikaša (Pandian, 2017.)

1.4.1. Ježinci

Ježinci su dosta jednostavno građeni organizmi. Nemaju specijalizirani dišni i krvožilni sustav (nemaju srce, krvne žile, molekule koje vežu kisik u njihovim tjelesnim tekućinama) i nemaju posebne organe za izlučivanje.



Slika 8 . Građa ježinca (James i Siikavuopio, 2012.)

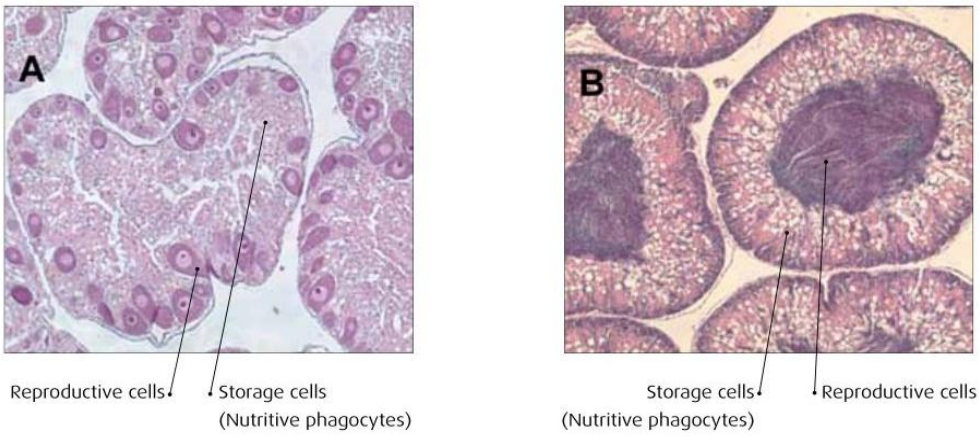
Sastoje se od usta, želudca u obliku cjevčica (probavni sustav), gonada i primitivnog živčanog sustava. Svi su organi zaštićeni tvrdom ljušturom. Na vanjskoj strani ljušture nalaze se bodlje i nožice u obliku cijevi (podia).

1.4.2. Reprodukcijski ciklus ježinaca

Oba spola odraslih ježinca se mrijeste barem jednom godišnje i ispuštaju svoje gamete u more. Rezultat kontakta između jajašca ženke i sperme mužjaka je oplođeno jajašce, a potom embrij. Mriješćenje se najčešće događa u travnju nakon čega dolazi do naglog smanjenja gonada. U kasno ljeto, gonade se polako povećavaju jer se stvaraju stanice za odlaganje koje se povećavaju veličinom i brojnošću. Od početka do sredine zime dolazi do gametogeneze (stvaranja reproduktivnih stanica), a broj skladištenih stanica u gonadi smanjuje se i zamjenjuju ih reproduktivne stanice. Broj reproduktivnih stanica unutar gonada se povećava tijekom zime sve dok opet ne dođe do mrijesta tijekom kasne zime/ rano proljeće. Prema saznanjima mrijest potiče temperatura i okolišni čimbenici, poput cvjetanja algi i oluja, iako nije potpuno potvrđeno.

Gonade kod ježinaca ne služe samo kao reprodukcijski organi, nego i za skladištenje nutrijenata jer crijeva kod ježinaca imaju ograničen kapacitet skladištenja. Gonade morskih ježinaca sastoje se od dvije vrste stanica: reproduktivne stanice i stanice za skladištenje (poznate kao nutritivni fagociti). Reproduktivne stanice kod ženki su jajšca (oocite, oogoniji), a kod mužjaka spermatozoidi (spermatogonium, spermatocit, spermatid i spermatozoon). Nutritivni fagociti su stanice koje pohranjuju hranjive sastojke, poput proteina, ugljikohidrata i lipida koji se koriste za razvoj gameta (poznat kao gametogeneza) ili za osnovnu metaboličku aktivnost kada je dostupnost hrane vrlo mala. Nakon mrijesta, nutritivni fagociti imaju sposobnost apsorpcije odnosno fagocitoze neiskorištenih reproduktivnih stanica. Postotak ovih dviju vrsta stanica prisutnih u gonadama varira tijekom reproduktivnog ciklusa i ima značajan utjecaj na veličinu i kvalitetu gonada. Na reproduktivni ciklus utječe dostupnost hrane i gustoća ježinaca. Kod ograničene količine hrane, veličina gonada se smanjuje, a kada hrane ima dovoljno gonade su velike. Također kod male dostupnosti hrane može doći do smanjenja veličine ikre te nemogućnosti proizvodnje reproduktivnih

stanica. Uvjeti u okolišu izrazito utječu na reproduktivni ciklus i rezultiraju varijacijama između populacije, pa čak i unutar populacije.



Slika 9. Dvije vrste stanica prisutnih u gonadama, reproduktivne stanice i nutritivni fagociti, A kod ženke i B kod mužjaka (James i Siikavuopio, 2012.)

Mnogi bodljikaši služe kao modelni organizmi jer se njima lako manipulira u istraživanjima, nisu skupi te ne izazivaju etičke dvojbe s obzirom da bodljikaši, za razliku od životinja s centralnim živčanim sustavom, ne osjećaju bol.

Za razvoj embrija i ličinka morskih životinja potrebna je morska voda koja sadrži kvalitete koje su pogodne životinji za razvoj. Oplodnja ježinaca u laboratoriju je jako korisna za istraživanja utjecaja određenih tvari u morskoj vodi na njihov razvoj. Međutim, uvjeti u laboratoriju se razlikuju od onih s kojima se ježinci susreću u moru. Ježinci se razvijaju u puno većoj gustoći u laboratoriju nego u moru, a također i u drukčijim uvjetima. U laboratoriju nema drugih planktona koji bi mogli utjecati na ličinke, drukčiji je sastav otopljene organske tvari i nema gibanja morskih struja.

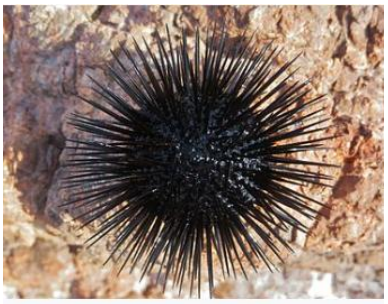
Ježinci su jedni od najvažnijih morskih organizama. Oni reguliraju rast morskih algi kojima se hrane, također su izvor hrane nekim grabežljivcima u moru.

1.4.3. Arbacia lixula

Arbacia lixula je vrsta morskog ježinca i pripada koljenu Enchinodermata. Tijelo *Arbacia lixula* hemisfernog je oblika sa snažnim bodljama približno jednakih duljina. Nema kraćih sekundarnih bodlji po čemu se lakše razlikuje od ostalih sličnih vrsta. Uglavnom je crne boje, dok su usta crno zelene boje. Anus se nalazi s gornje strane u sredini i omeđen je s četiri ploče. Maksimalan promjer *Arbacia lixula* je 10 cm, a duljina bodlji je do 3 cm.

Obitava u plitkom moru na stjenovitom dnu. Najveća dubina na kojoj se može pronaći je 30 m. Prisutan je na Makaronezijskim otocima, u koje spadaju Azori, Madeira, Kanarski otoci i Zelenortski otoci. Pronalazi se i u Sredozemnom moru, rijetko na zapadnoafričkoj i Brazilskoj obali.

Hrani se algama. Kada je mala gustoća jedinki, tijekom dana skrivaju se u rupama stijena no kada je velika gustoća jedinki, kao što je u Sredozemnom moru, može ih se vidjeti izložene i tijekom dana.



Arbacia lixula from the Mediterranean

Scientific classification	
Domain:	Eukarya
Kingdom:	Animalia
Phylum:	Echinodermata
Class:	Echinoidea
Order:	Arbacioida
Family:	Arbaciidae
Genus:	*Arbacia*
Species:	***A lixula***
Binomial name	
Arbacia lixula (Linnaeus, 1758)	

Slika 10. Taksonomija vrste *Arbacia lixula* (https://en.wikipedia.org/wiki /Arbacia_lixula)

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj istraživanja bio je istražiti imaju li indometacin i nanočestice srebra toksični učinak u prva dva dana embrionalnog razvoja ježinca *Arbacia lixula* te oslobađaju li se pri tom spojevi slobodnih kisika. Kako bi ostvarili cilj, istražuje se koliko je zigota dospijelo do normalnog stadija, koliko je zaostalo u razvoju, a koliko ih se nije razvilo pri različitim koncentracijama toksikanata. Za određivanje slobodnih radikala mjeri se koncentracije spojeva slobodnih kisika u pluteusu larvae 48 h nakon oplodnje.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Kemikalije

Za ovo istraživanje korištene su slijedeće kemikalije: kalijev klorid, kalijev krom (III) sulfat, diklorfluorescin diacetat, indometacin, disperzija nanočestice srebra (20 μg L^{-1}) dobivene od Sigma Aldrich-a, filter 25 μm, PBS pripremljen iz NaCl, KCl, KH_2PO_4, Na_2HPO_4 (soli dobivene od Sigme), dok je ultračista voda (18 MΩ cm) dobivena pomoću sustava za purifikaciju IKA, a morska voda za eksperiment dobivena filtriranjem morske vode (0.22 μm filtar).

3.2. Određivanje učinka indometacina i nanočestica srebra pomoću testa embrionalnog razvoja ježinca *Arbacia lixula*

3.2.1. Sakupljanje ježinca

Sakupljeno je 20 jedinka ježinca *Arbacia lixula* pomoću mrežice na plaži u Puli, Hrvatska. Jedinke su stavljene u prijenosnu hladnjaču s morskom vodom i prenesene u morske bazene instituta Ruđer Bošković u Rovinju.

3.2.2. Izdvajanje gameta i oplodnja

Jedinka je najprije protresena kako bi sama počela lučit gamete na aboralnoj strani, zatim je ubrizgano 1-2 ml otopine KCl (0.5 M) u peristomalnu membranu. Nakon toga, ježinci su protreseni i provjereno je ukoliko je došlo do izlučivanja gameta.

Ukoliko se uoči da ježinac na aboralnoj strani luči tekućinu crvenkaste boje, zaključeno je da je ježinac ženka te je okrenut na tu stranu i uronjen u filtriranu morsku vodu u čašici. Na taj su način, jajne stanice sakupljene na dnu čaše. Kako bi se sakupilo dovoljno jajnih stanica, postupak je ponavljan sa još dvije ženke. Kada su se jajne stanice sedimentirale na dnu čaše, većina tekućine je dekantirana, a ostatak tekućine je profiltriran u veću čašu od 500 ml kroz fitoplanktonsku mrežicu (200 μm pore). Zatim su jajne stanice izbrojane te je utvrđeno jesu li pravilnog oblika. Jajna

suspenzija je razrijeđena kako bi se dobila konačna koncentracija od cca 1000 mg L^{-1}.

Ukoliko se uoči da ježinac na aboralnoj strani luči gustu suspenziju bijele boje, znači da je jedinka mužjak i luči spermu. Sperma je sakupljana „na suho“ jer se u dodiru s morskom vodom aktivira. Sakupljena je pipetom sa ježinca te je pohranjena u Eppendorf tubici i skladištena na ledu.

Netom prije oplodnje, sperma je razrijeđena na način da je 10 mikrolitara sperme dodano u 10 ml morske vode te je tako razrijeđena 1000 puta.

Kako bi saznali koja je ženka ispustila najkvalitetnije jajne stanice i koji mužjak ima najkvalitetniju spermu, napravljena je proba oplodnje. Na ploču od šest jažica na koju je prethodno dodano 9 mL filtrirane morske vode dodan je 1 ml jajnih stanica od svake ženke u tri jažice. Sveukupno su izuzeta jajašca dvije ženke. Zatim je u prve 3 jažice dodano 100 mikrolitara sperme od jednog mužjaka, dok je u druge 3 dodana sperma drugog mužjaka. Nakon dva sata, pod mikroskopom je provjereno u kojoj jažici je oplodnja bila najuspješnija (postotak oplodnje određen na temelju aktivne diobe stanice) te su taj mužjak i ženka odabrani za oplodnju.

Za pripremu oplodnje dodano je 5 ml razrijeđene sperme u 500ml suspenzije jajnih stanica i filtrirane morske vode. Suspenzija je promiješana i ostavljena da odstoji. Nakon dva sata pod mikroskopom je provjereno je li došlo do diobe oplođenih jajnih stanica na stadij 2-4 stanice. Pripremljene su ploče i u svaku jažicu dodan je toksikant, filtrirana morska voda i oplođene stanice u određenoj količini.

3.2.3. Tretiranje zigota ježinca sa indometacinom i AgNP

U ploči za kontrolu dodano je u jažice 9 ml filtrirane morske vode i 1ml zigota, zatim u pločama s toksikantima dodano je 1 ml indometacin otopine, 100 µL disperzije srebrenih nanočestica, 8 ml filtrirane morske vode te 1 ml zigota. Konačna koncentracije indometicina bile su 0.001, 0.01, 0.1,1 i 10 mg L^{-1} dok su konačne koncentracije nanočestica bile 5 i 50 µg L^{-}. Tako pripremljene ploče, ostavljene su 48 h na 20 ºC. Nakon 48 h, dodano je 20 µl krom sulfata kako se bi se onemogućilo kretanje larva i olakšalo brojanje. Izbrojano je 50 jedinki po jažici (6 replikati za svaki

tretman) koje su svrstane u tri kategorije prema stupnju razvoja. Stadiji su označeni kao normalno razvijena larva s ručicama i nožicama te uredno razvijenim probavnim traktom, zaostala larva manje veličine ili s defektom u razvoju te nerazvijena larva što je značilo da je embrij blokiran u ranoj razvojnoj fazi.

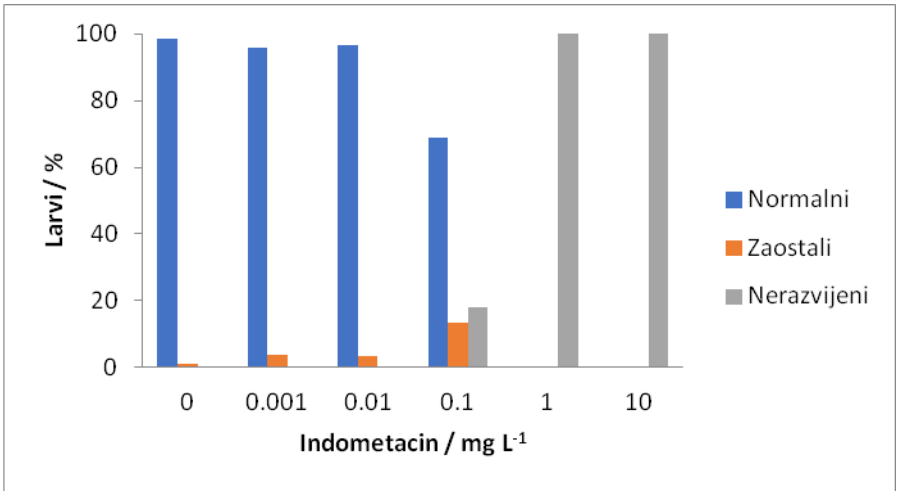
3.3. Oksidacijski stres

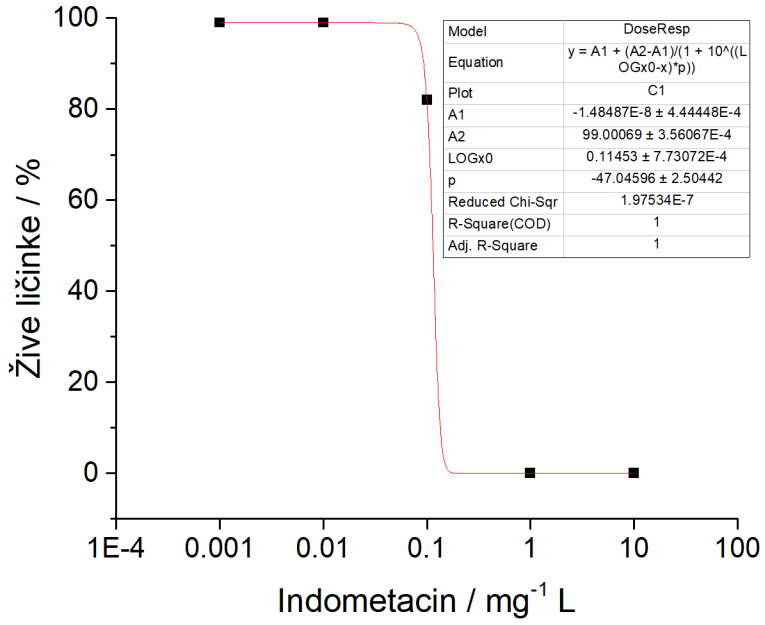
Određen je ukupni oksidacijski stres na embrije ježinaca koji su bili tretirani sa toksikantima i količina prisutnih proteina. Kontrola i tretirani embriji prebačeni su pomoću pipete sa ploča u epruvete. Od ukupnog sadržaja od 10 ml po jažici, 6,7 ml je prebačeno u jednu epruvetu za određivanje ukupnog sadržaja proteina, a 3,3 ml u drugu epruvetu i tako za sve jažice na svim pločama. U prvi set epruveta koje sadrže 3.3 ml naknadno je dodano 3.3µl supstrata diklorofluorescin diacetat (DCFH-DA) te je ostavljeno da odstoji sat vremena u mraku. U međuvremenu je eksperiment ponovljen s drugim setom epruveta. Epruvete bez supstrata stavljene su u centrifugu na 1800g na 10 minuta. Centrifugom je odvojena tekućina od taloga. U te epruvete dodano je 6,7 ml pufera PBS kako bi se talog očistio od nečistoća s ponavljanjem centrifuge u trajanju od 10 minuta. Centrifugom je odvojena tekućina od taloga te je dodano 400 µl TRIS-a. Sve su epruvete po redu stavljene na vortex jednu minutu nakon čega je sadržaj epruveta prebačen u Eppendorf tubice i stavljen u centrifugu na 13500 okretaja 10 min na 4 celzijeva stupnja. Nakon centrifuge, 200µl sadržaja je prebačeno na jednu ploču, a ostalih 200µl na drugu ploču i ploče su stavljene u uređaj za očitavanje fluorescencije. Nakon sat vremena, epruvete koje su ostavljene da odstoje sa supstratom uzete su te je ponovljen sličan postupak. Epruvete su prvo stavljene u centrifugu na 1800g 10 minuta. Nakon centrifuge odvojena je tekućina od taloga te je u epruvete dodano 3,3 ml PBS da bi se talog očistio od nečistoća. Centrifuga se nakon toga ponavljala u trajanju od 10 minuta. Nakon centrifuge, odvojena je tekućina od taloga, a zatim je dodano 200 µl TRIS-a . Sve su epruvete po redu stavljene na vortex jednu minutu. Nakon toga sadržaj iz epruveta prebačen je u Eppendorf tubice te stavljen u centrifugu na 13500 okretaja 10 min na 4 celzijevih stupnjeva. Nakon centrifuge 50 µl uzorka stavljeno je na ploče i dodano 200µl nanoquanta te je ploča premještena u fluorometar instrument za očitavanje fluorescencije kako bi se odredila koncentracija proteina.

4. REZULTATI

4.1. Uspješnost razvoja embrija *Arbacia lixula* nakon tretiranja zigota sa indometacinom

Postotak uspješnosti razvoja ježinca nakon tretiranja zigota s indometacinom koncentracija 0.001, 0.01. 0.1, 1 i 10 mg L^{-1} prikazan je na Slici 11. U kontroli je bilo 99% razvijenih, 1,3% zaostalih, dok nerazvijenih nije bilo. Pri koncentraciji 0.001 mg L^{-1} indometacina bilo je 96% normalnih embrija (3% manje u odnosu na kontrolu), 4% zaostalih (2.7% više u odnosu na kontrolu), dok nerazvijenih nije bilo. Pri koncentraciji 0.01 mg L^{-1} indometacina bilo je 96.7% normanih (2.3% manje u odnosu na kontrolu), 3.33% zaostalih (2% više nego u kontroli), dok nerazvijenih embrija nije bilo. Pri koncentraciji 0.1 mg L^{-1} indimetacina primijeti se veća statistička razlika u odnosu na kontrolu te je bilo 68,7% normalnih (30.3% manje nego u kontroli),13,3% zaostalih (12% više nego u kontroli), dok nerazvijenih je bilo 18% (18% više nego u kontroli). Pri koncentracijama od 1 mg L^{-1} i 10 mg L^{-1} broj normalnih i zaostalih embrija se drastično smanjio u donosu na kontrolu i ostale koncentracije, odnosno nisu bili prisutni te su svi embriji bili nerazvijeni.

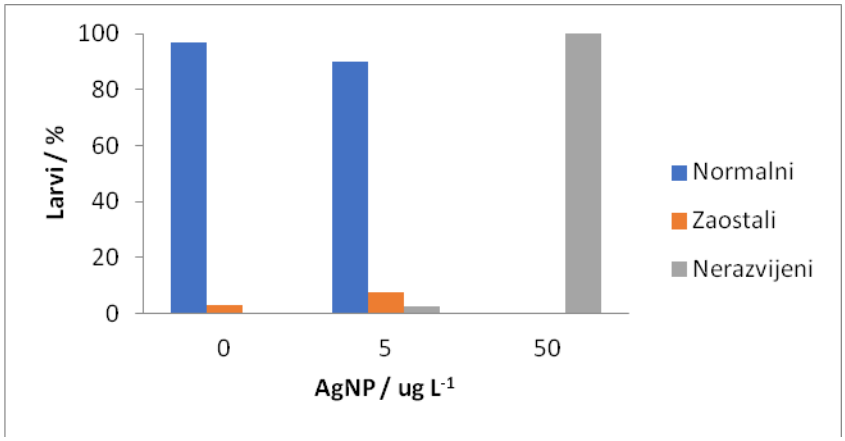




Slika 11. a) Grafički prikaz postotka normalnih, zaostalih i nerazvijenih embrija ježinca *Arbacia lixula* nakon tretiranja sa indometacinom različitih koncentracija. b) Krivulja doza-efekt (engl. '*dose-response*').

4.2. Uspješnost razvoja ježinca *Arbacia lixula* tretiranih sa nanočesticama srebra koncentracije 5 µg L^{-1} i 50 µg L^{-1}

Na Slici 12. prikazan je postotak uspješnosti razvoja ježinca *Arbacia lixula* tretiranih sa nanočesticama srebra koncentracije 5 µg L^{-1} i 50 µg L^{-1}. Pri višoj koncentraciji NP srebra koja je iznosila 50 µg L^{-1} primijećeno je da nema normalnih ni zaostalih embrija te da su svi nerazvijani, dok je pri manjoj koncentraciji od 5 µg L^{-1} primijećen porast razvijenih embrija. Postotak normalnih iznosio je 90% (6.8% manje nego u kontroli), zaostalih 7.6% (4.8 zaostalih) te nerazvijenih 2.4% (2% više nego u kontroli)



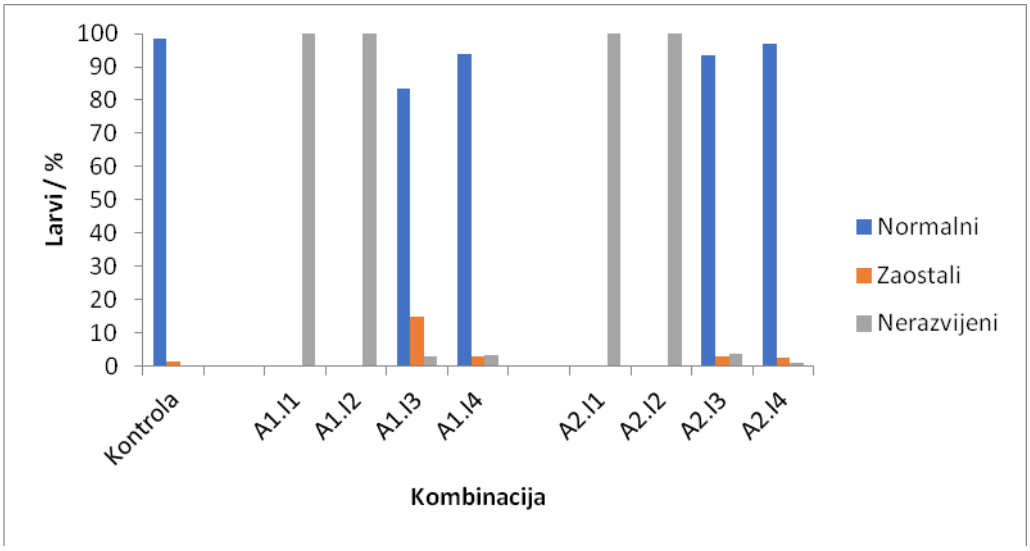
Slika 12. Grafički prikaz postotka uspješnosti razvoja ježinca *Arbacia lixula* tretiranih sa nanočesticama srebra različitih koncentracija.

4.3. Postotak uspješnosti razvoja embrija *Arbacia lixula* tretiranih sa kombinacijama indometacina i nanočesticama srebra

Na Slici 13. prikazan je postotak uspješnosti razvoja embrija *Arbacia lixula* treriranih sa kombinacijama koncentracija indometacina i NP srebra. U najvećoj koncentraciji su kombinirani indometacin i nanosrebro (A1I1) koje su iznosile za indometacin 0.1 mg L^{-1}, a za NP srebra 50 µg L^{-1} te pri tim koncentracijama nije bilo normalnih ni zaostalih embrija i svi su bili nerazvijeni. Pri najvišoj koncentraciji NP srebra i malo nižoj koncentraciji indometacina koja je iznosila 0.01 mg L^{-1} (A1I2) također nije bilo normalnih ni zaostalih embrija te su svi bili nerazvijeni. Pri nižoj koncentraciji indometacina od 0.001 mg L^{-1} (A1I3) primijećena je promjena te je bilo 83,6 %

normalnih (13.2% manje od kontrole), 14.8% zaostalih (12% više od kontrole) i 2.8% nerazvijenih (2,4% više od kontrole). Pri najnižoj koncentraciji indometacina koja je iznosila 0.0001 mg L^{-1} (A1I4) bilo je 94% normalnih (2.8% manje od kontrole), 2.8% zaostalih (jednako kao i u kontroli) i 3.2% nerazvijenih (2.8% više nego u kontroli).

U slijedećoj kombinaciji korištena je niža koncentracija NP srebra koja je iznosila 5 µg L^{-1} sa koncentracijama indometacina koje su iznosile 0.1,0.01,0.001i 0.0001. Kod prve kombinacije gdje je koncentracija indometacina bila najviša i iznosila 0.1 (A2I1) nije bilo normalnih ni zaostalih embrija te su svi bili nerazvijeni. Isti slučaj primijećen je i kod malo manje koncentracije indometacina koja je iznosila 0.01 (A2I2). Kod još manje koncentracije indometacina od 0.001 (A2I3) bilo je 93.6% razvijenih (3.2% manje nego u kontroli) , 2.8% zaostalih (isto kao u kontroli) i 3.6% nerazvijenih(3.2% više nego u kontroli).

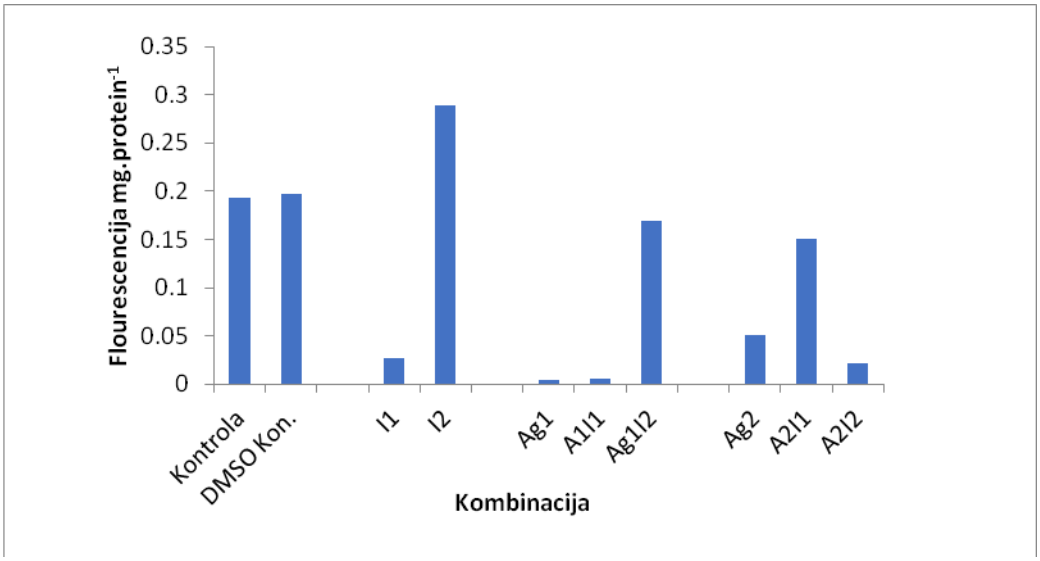


Slika 13. Grafički prikaz postotka uspješnosti razvoja embrija *Arbacia lixula* tretiranih sa kombinacijama indometacina i nanočestica srebra

4.4. Određivanje razine oksidativnog stresa

Oksidativni stres kod embrija tretiranih nanočesticama srebra i indometacina procijenjen je kao koncentracija proizvedenih reaktivnih kisikovih jedinki (ROS) (Slika 14). Netretirani kontrolni uzorak i kontrolni uzorak s otapalom (tretiran samo DMSO-om) pokazali su slične vrijednosti (0,19-0,2) što ukazuje da je DMSO korišten za otapanje indometacina na dovoljno niskoj razini da ne izazove višak stvaranja ROS-a. Niža koncentracija samog srebra ili u kombinaciji s nižom koncentracijom indometacina pokazala je slične vrijednosti kao kontrolni uzorci. Suprotno tome, veće koncentracije nanočestica srebra, sa ili bez indometacina, ukazivale su na samo nisku razinu stvaranja ROS-a

Nadalje, veće koncentracije indometacina ili srebrnih nanočestica pokazale su manje stvaranja ROS-a u usporedbi s nižim koncentracijama odgovarajućih materijala. Na primjer, koncentracija ROS-a za nisku koncentraciju indometacina koja je iznosila 0.01 mg L^{-1} bila je 0,29 mg $protein^{-1}$ dok odgovarajuća visoka koncentracija koja je iznosila 0.1 mg L^{-1} pokazuje samo razinu ROS od 0,03 mg $protein^{-1}$.



Slika 14. Prikaz količine prozvedenih ROS-ova kod embrija *Arbacia lixula* izloženih indometacinu, nanočesticama srebra i kombinacija istih.

5. RASPRAVA

Test razvoja embrija ježinca još uvijek je jedan od najviše korištenih testova u toksikologiji za istraživanje učinka proizvoda antropogenog podrijetla na razvoj embrija morskih beskralježnjaka. Test je veoma lako izvediv jer se može provesti u relativno kratkom vremenskom roku te se može koristiti za procjenu učinka toksičnih tvari na razini cijelog organizma. Nadalje, kako funkcioniranje imunološkog sustava morskog ježinca ima sličnosti s funkcioniranjem imunološkog sustava čovjeka, podaci iz testa razvoja ježinca mogu se usporediti s čovjekom.

Ovo istraživanje usredotočilo se na kombinaciju učinka srebrnih nanočestica i indometacina zbog malog broja takvih istraživanja. Navedeni toksikanti izabrani su jer predstavljaju dvije vrste supstanci koje istovremeno mogu biti prisutne u otpadnim vodama kao umjetno proizvedene nanočestice te u lijekovima. Kao temelj istraživanja učinka kombinacije ovih toksikanata, prvo se ispitivao učinak svakog toksikanta zasebno.

Iz postotka normalno razvijenih embrija može se uočiti da indometacin koncentracije od 0.01 mg L^{-1} nema značajan utjecaj na razvoj embrija tijekom 3 dana izlaganja. Međutim, kod koncentracije od 1 mg L^{-1} i više uočen je zastoj razvoja te su sve jedinke bile u stadiju zigote. Matematičkim modelingom ovih podataka dobiven je LD_{50} vrijednosti od 0.11 mg L^{-1} koji ukazuje na visoku osjetljivost embrija i relativno brzu smrtnost pri koncentraciji indometacina višoj od 0.01 mg L^{-1}.

Nakon tretmana s indometacinom, ispitan je učinak nanočestica srebra. Dvije korištene koncentracije ukazale su na različite rezultate. Niska koncentracija koja je iznosila 5 µg L^{-1} nije uzrokovala značajne utjecaje u odnosu na kontrolnu skupinu,dok je kod koncentracije od 50 µg L^{-1} smrtnost embrija iznosila 100%. Također i vrijednost LD_{50} je u ovom rasponu. Primijećeni su slični rezultati kod usporedbe s istraživanjem utjecaja na razvoj embrija ježinca *Paracentrotus lividus* Šiller i sur. (2013). Rezultati su pokazali da nakon 48h srebrne nanočestice koncentracije od 300 µg L^{-1} uzrokuju smrtnost svih embrija dok pri koncentraciji od 30 µg L^{-1} nije bilo značajnog utjecaja. Prema ovim rezultatima može se zaključiti da su embriji *A. lixula* osjetljiviji na utjecaj nanočestica srebra nego embriji ježinca *P. lividus* . Navedeno je potvrđeno u zaključku istraživanja Burić i sur. (2015) gdje je dokazano da su embriji vrste *A. lixula* osjetljiviji na učinak nanočestica srebra od embrija vrsta

Sphaerechinus granularis i *P. lividus*. U tom su istraživanju uočena značajna oštećenja tijekom razvoja embrija u odnosu na kontrolnu skupinu, pri koncentraciji koja je niža i iznosila je 10 μg L^{-1}. Ispitivanje kombinacija indometacina i srebrnih nanočestica navedenih raspona koncentracija obuhvaćalo je intervale tijekom kojih nije bilo kompletnog zastoja razvoja embrija (što je bio slučaj kod istraživanja toksikanata zasebno). Kod visoke koncentracije srebrnih nanočestica (A1) i kod najviših koncentracija indometacina (I1, I2) primijećena je kompletna smrtnost embrija iz čega se može zaključiti da imaju aditivni ili sinergistički efekt, dok kod kombinacije ovih toksikanata antagonizam nije prisutan. Sličan učinak je primijećen kod interakcije visoke koncentracije indometacina s niskom koncentracijom nanočestica iz čega se može zaključiti da visoka koncentracija jedne od ovih dviju supstanci uzrokuje kompletan zastoj razvoja embrija. Međutim, kod niske koncentracije indometacina (I3, I4) većina embrija je bila dovoljno razvijena iako je visoka koncentracija nanočestica srebra trebala biti pogubna za embrije. Takav rezultat može ukazivati na antagonistički efekt kod kojeg niske koncentracije indometacina smanjuju toksičnost nanočestica srebra. Pri niskim koncentracijama nanočestica srebra (A2) i niskim koncentracijama indometacina nije uočena razlika u odnosu na kontrolnu skupinu te su embriji bili normalno razvijeni.

Iako se može pretpostaviti da indometacin smanjuje toksičnost nanočestica, treba imati na umu da je samostalni učinak indometacina imao LD_{50} u vrijednosti od 0.11 mg L^{-1} dok je u kombinaciji s niskom koncentracijom nanočestica srebra uzrokovao smrtnost pri koncentraciji od 0.01 mg L^{-1}. Za razliku od indometacina koji može umanjiti toksičnost srebrnih nanočestica, srebrne nanočestice mogu sinergistički povećati toksičnost indometacina.

Srebrne nanočestice predstavljaju kompleksan sustav u kojem su prisutne samostalne čestice i metalni ioni (ispušteni iz nanočestica). U prijašnjim istraživanjima je dokazano da toksičnost srebrnih nanočestica nije uzrokovana samostalnim česticama nego srebrnim ionima koji su otpušteni tijekom oksidacijskog otapanja (Sukhanova i sur., 2018). Stoga se tijekom kontakta između indometacina i nanočestica srebra mora uzeti u obzir njihova moguća interakcija. Ako su ioni odgovorni za toksičnost nanočestica srebra i postoji antagonistički učinak zbog prisutnosti indometacina, uzima se u obzir da je interakcija s indometacinom u ovom slučaju ključna. Kako indometacin sadrži elektron donor skupine koje uključuju

amidnu i karboksilnu skupinu, moguće je vidjeti srebrne ione. U preliminarmon istraživanju nije bilo moguće utvrditi odvaja li indometacin ione iz vodenog matrixa te time smanjuje mogućnost negativnog djelovanja na razvoj embrija ili indometacin sprječava oksidacijsko otapanje na površini nanočestice na način da stvara sloj na njezinoj površini. Obzirom da je indometacin protuupalno sredstvo, niske koncentracije ovog lijeka mogle bi pomoći kod upalnih procesa koje izazivaju nanočestice srebra ili ioni srebra kod embrija.

Istražujući utjecaj reaktivnih kisikovih spojeva pri izlaganju embrija kombinacijama ovih toksikanata, u većini slučajeva embriji izloženi samo indometacinu ili u kombinaciji sa srebrnim nanočesticama pokazali su nisku koncentraciju reaktivnih kisikovih spojeva. Iz toga se može zaključiti da indometacin smanjuje oksidativni stres. Međutim, treba biti oprezan pri tumačenju ovih podataka jer je niska koncentracija srebrnih nanočestica također pokazala nisku koncentraciju reaktivnih kisikovih spojeva, dok je kod niske koncentracije indometacina bilo obratno. Zbog dobivenih rezultata, prije nego se izvedu točniji zaključci potrebna su daljnja istraživanja.

6. ZAKLJUČAK

U ovom radu analiziran je učinak nanočestica srebra i indometacina na embrionalni razvoj ježinca te je dokazano da imaju štetan učinak na embrionalne stadije ježinca *Arbacia lixula*. Embriji ježinca bili su nepravilne građe, slabije razvijeni ili su ostali nerazvijeni, odnosno došlo je do smrtnosti embrija. Također je dokazano da utjecaj posebno ovisi o koncentraciji te da povećanjem koncentracije indometacina i nanočestica srebra dolazi do smanjenja razvijenih, a povećanja zaostalih i nerazvijenih embrija. U niskim koncentracijama, indometacin može u velikoj mjeri smanjiti toksičnost nanočestica srebra, iako nanočestice srebra pomalo povećavaju toksičnost indometacina. Međutim, uloga iona srebra i ponašanje indometacina tijekom interakcije s ionima ili nanočesticama nije ispitano u ovom radu te bi buduće studije u ovom području mogle otkriti nešto više o mehanizmu antagonističkog učinka indometacina na toksičnost nanočestica srebra.

7. LITERATURA

Arole, V.M., Munde, S.V. (2014). Fabrication of nanomaterials by top-down and bottom-up aproaches- an overview. *Journal of Advances in Applied Sciences and Technologies*. 1. str.89-93.

Bašić, E., Jusić, S., Lozančić, Ž., Bašić, I. (2017.) Primjena nanotehnologije u vodi za piće. *11th International Scientific Conference on Production Engineering, Development and Modernization of Production*. str. 585-587.

Benn, T.M., Westerhoff, P. (2008.) Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environmental Science & Technology*. 42. str. 4133-4139.

Burić, P., Jakšić, Ž., Sikirić, M.D., Jurašin, D., Cascio, C., Calzolai, L., Lyons, D.M. (2015.) Effect of silver nanoparticles on Mediterranean sea urchin embryonal development is species specific and depends on moment of first exposure. *Marine Environmental Research.* 111. str. 50-59.

Foldbjerg, R., Jiang, X., Miclăuş, T., Chen, C., Autrup, H., Beer C. (2015.) Silver Nanoparticles – wolves in sheep's clothing? *Toxicology Research*. 4. str. 563-575.

Gaw, S., Thomas, K.V., Hutchinson T.H. (2013.) Sources, impacts and trends of pharmaceuticals in the marine and coastal environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 369: 20130572.

Horrock, B.R., Brummer, F., Medakovic, D. (2012.) Agglomeration of Silver Nanoparticles in Sea Urchin. *International Journal of Environmental Pollution and Remediation* 1. str. 44-50.

James, P., Siikavuopio, S. (2012.) A Guide to the Sea Urchin Reproductive Cycle and Staging Sea Urchin Gonad Samples. Nofima AS, Troms, Norway. 2. izd. str. 1-9.

Jarvie, H., King, S., Dobson, P. (2020.) Nanoparticle, in *Encyclopedia Britannica*.

Khan, I., Saeed, K., Khan, I. (2019.) Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. *Arabian Journal of Chemistry*. 12. str. 908-931.

Lushchak, V.I. (2011.) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*. 101. str. 13-30.

Pandian, T.S. (2018.) Reproduction and Development in Echinodermata and Prochordata, in Reproduction and Development in Aquatic Invertebrates. CRC Press, Boca Raton, FL. 1. izd. str. 76-93.

Pattel, D. (2015.) Impact of Pharmaceutical Industries on Enviroment, Health and Safety. *Journal of Critical Reviews*. 2. str. 25-29.

Siller, L., Lemloh, M.L., Piticharoenphun, S., Mendis, B.G., Horrocks, B.R., Brümmer, F., Medaković, D. (2013.) Silver nanoparticle toxicity in sea urchin Paracentrotus lividus. *Environmental Pollution*. 178. str. 498-502.

Sukhanova, A., Bozrova, S., Sokolov, P., Berestovoy, M., Karaulov, A., Nabiev, I. (2018.) Dependence of Nanoparticle Toxicity on Their Physical and Chemical Properties. *Nanoscale Research Letters*. 13:44.

Tran, Q.H., Nguyen, V.Q., Le, A. (2013.) Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*. 4:033001.

Yu, S., Yin, Y., Liu J. (2013.) Silver nanoparticles in the environment. *Environmental Science: Processes & Impacts*. 15. str. 78-92.

http://www.mesa.edu.au/echinoderms/

http://oceancrusaders.org/pharmaceutical-ocean/

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Indomethacin

https://www.diving-canary-islands.com/en/black-sea-urchin-arbacia-lixula/

https://www.nanowerk.com/how_nanoparticles_are_made.php

https://www.nanowerk.com/what_are_synthetic_nanoparticles.php

https://www.thoughtco.com/echinoderm-phylum-profile-2291838

https://www.understandingnano.com/medicine.html

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Jurja Dobrile u Puli Završni rad

Sveučilišni preddiplomski studij Znanost o moru

Utjecaj koizloženosti srebrnih nanočestica i indometacina na embrije ježinca *Arbacia lixula*

NORA LONČARIĆ

Institut Ruđer Bošković, Centar za istraživanje mora, G. Paliaga 5, 52210 Rovinj

SAŽETAK

U tokovima otpadnih voda uz nanočestice pronađene su i visoke koncentracije supstanci lijekova kao što je primjerice indometacin. Međutim, nedovoljno je podataka i istraživanja o interakciji nanočestica i lijekova te njihovom potencijalnom učinku na morske organizme. Zbog toga smo u ovom radu istraživali utjecaj srebrenih nanočestica koncentracija 5 i 50 μg L^{-} i indometacina koncentracija 0.001, 0.01, 0.1,1 i 10 mg L^{-1} posebno, a potom različitim kombinacijama na razvoj embrija morskog ježinca *Arbacia lixula* te stvaranje reaktivnih kisikovih vrsta u embrijima. Pri koncentracijama indometacina od 1 i 10 mg L^{-1}, broj normalno razvijenih embrija se smanjio. LD_{50} izračunat je na 0.11 mg L^{-1}. Kod testiranja s nanočesticama srebra, pri višoj koncetraciji koja je iznosila 50 μg L^{-1} izazvala je smrtnost svih embrija. U kombinaciji indometacina (0.001 – 0.01 mg L^{-1}) s 50 μg L^{-1} nanočestica srebra embriji su dostigli razvoj kao i u kontrolnoj skupini. Međutim, koncentracija od 5 μg L^{1} AgNP značajno povećava toksičnost indometacina te su svi embriji bili ne razvijeni pri koncentraciji indometacina od 0.01 mg L^{-1}. Uzrok takvim antagonističkim ili sinergističkim efektima može biti povezan s interakcijom indometacina sa ionima srebra ili površinom nanočestica, međutim potrebna su daljnja istraživanja kako bi se otkrila uloga ovih spojeva. Koncentracije reaktivnih kisikovih spojeva bile su niske za većinu kombinacija indometacina i nanočestica srebra, što ukazuje da indometacin može imati protuupalnu ulogu kod ublažavanja toksičnih učinaka iona srebra ili nanočestica.

Ključne riječi: nanočestice srebra, *Arbacia lixula*, embrionalni razvoj, indometacin

Mentor: prof. dr.sc. Daniel Mark Lyons

Ocjenjivači: izv. prof. dr. sc. Mauro Štifanić
doc. dr. sc. Ines Kovačić
prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

Datum obrane: 03.07. 2020

BASIC DOCUMENTATION CARD

Juraj Dobrila University of Pula Bachelor thesis
University Undergraduate Study Programme – Marine Sciences

Impact of co-exposure to silver nanoparticles and indomethacin on embryos of the sea urchin *Arbacia lixula*

NORA LONČARIĆ

Ruđer Bošković Institute, Center for Marine Research, G. Paliaga 5, 52210 Rovinj

ABSTRACT

In addition to nanoparticles, high concentrations of pharmaceuticals such as indomethacin have also been detected in wastewater streams. However, there is a lack of data on the potential interactions of nanoparticles and pharmaceuticals and their potential effects on aquatic organisms. Therefore, in this paper we investigated the influence of silver nanoparticles (5 and 50 μg L^{-1}) and indomethacin (0.001 – 10 mg L^{-1}), individually and as combinations, on embryo development of the sea urchin *Arbacia lixula* and if these influence reactive oxygen species generation in larvae. At indomethacin concentrations of 0.1, 1 and 10 mg L^{-1}, the number of normally developed embryos decreased. LD_{50} was calculated at 0.11 mg L^{-1}. At concentrations from 1 mg L^{-1} larval development was halted. For embryos treated with indomethacin (0.001 – 0.01 mg L^{-1}) in combination with silver nanoparticles (50 μg L^{-1}), larvae reached the same developmental stage as controls. However, low concentrations of silver nanoparticles (5 μg L^{-1}) were found to increase the toxicity of indomethacin, with all larvae undeveloped at an indomethacin concentration of 0.01 mg L^{-1}. The cause of such antagonistic or synergistic effects may be related to the interaction of indomethacin with silver ions or the nanoparticles' surfaces, however more research is required to uncover the role each plays. Reactive oxygen species concentrations were low for most combinations of indomethacin and silver nanoparticles, suggesting that indomethacin may play an anti-inflammatory role in ameliorating the toxic effects of the silver ions or nanoparticles.

Key words: silver nanoparticles, *Arbacia lixula,* embryonic development, indomethacin

Supervisor: Prof. dr. sc. Daniel Mark Lyons

Reviewers: Assoc. Prof. Mauro Štifanić
Asst. Prof. Ines Kovačić
Prof. Daniel Mark Lyons

Thesis defense: 03.07.2020.