Bioakumulacija i utjecaj srebrnih nanočestica na unutarstaničnu raspodjelu metala i metalotioneine u gujavice Eisenia fetida (Savigny, 1826)

Horvat, Filip

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:091115

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Filip Horvat

Bioakumulacija i utjecaj srebrnih nanočestica na unutarstaničnu raspodjelu metala i metalotioneine u gujavice *Eisenia fetida* (Savigny, 1826)

Diplomski rad

Zagreb, 2016.

Rad izrađen u Laboratoriju za biološke učinke metala, Zavoda za istraživanje mora i okoliša Instituta «Ruđer Bošković» u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Dušice Ivanković te na Zoologijskom zavodu, Biološkog odsjeka, Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, pod pomoćnim vodstvom doc. dr. sc. Anamarie Štambuk, predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

Zahvaljujem se voditeljici dr. sc. Dušici Ivanković na mentorstvu i savjetima tijekom upoznavanja eksperimentalnih metoda i pisanja ovoga rada te doc. dr. sc. Anamariji Štambuk na svoj pomoći tijekom izlaganja i uzimanja uzoraka te tijekom pisanja rada. Hvala članovima Laboratorija za biološke učinke metala, dr. sc. Zrinki Dragun i Nesrete Krasnići, dipl. ing., za pomoć u analizama metala na ICP-MS i razdvajanju uzoraka na SE-HPLC te Laboratoriju za anorgansku geokemiju okoliša na korištenju ICP-MS instrumenta. Velika hvala mojoj obitelji na podršci, ljubavi, a prije svega na strpljenju tijekom cijelog mojeg studija.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek Diplomski rad

Bioakumulacija i utjecaj srebrnih nanočestica na unutarstaničnu raspodjelu metala i metalotioneine u gujavice *Eisenia fetida* (Savigny, 1826)

Filip Horvat
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Gujavica *Eisenia fetida* izlagana je povišenoj koncentraciji nanočestica odnosno ionskog srebra ($AgNO_3$). Uspoređen je stupanj bioakumulacije te su praćene sličnosti i razlike u subcelularnoj i citosolnoj distribuciji srebra nakon izlaganja. Također je istraživan potencijal oba oblika srebra za pobudnu sintezu metalotioneina te utjecaj na raspodjelu nekoliko esencijalnih elemenata (Cu, Zn, Mn, Fe, Co, Mo i Se) i Cd između citosola i netopljive frakcije tkiva gujavica. Također je napravljena analiza distribucije srebra i ostalih elemenata između citosolnih liganda različite molekulske mase razdvojenih pomoću SE-HPLC. Pokazano je da kod oba oblika srebra dolazi do bioakumulacije u tkivima gujavica. Razina bioakumulacije nekoliko je puta veća kod ionskog oblika. Postoje vidljive razlike u unutarstaničnoj i citosolnoj raspodjeli srebra između dva oblika. Nanočestice ne induciraju sintezu metalotioneina, a ionsko srebro ju inducira tek pri najvećoj koncetraciji izlaganja, no dio unutarstaničnog srebra vezan je na postojeće metalotioneine u stanici. Kvantitativne i kvalitativne promjene u unutarstaničnoj distribuciji esencijalnih elemenata željeza, kobalta i molibdena pokazuju potencijal kao biomarkeri izloženosti nanočesticama odnosno ionskom srebru.

(58 stranica, 21 slika, 3 tablice, 43 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici
Ključne riječi: Srebro/Metalotioneini/Nanočestice/Biomarker/*Eisenia fetida*

Voditelj: Dr. sc. Dušica Ivanković, viši znanstveni suradnik, Institut "Ruđer Bošković"
Suvoditelj: Dr. sc. Anamaria Štambuk, doc.
Ocjenitelji: Dr. sc. Anamaria Štambuk, doc.
Dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.
Dr. sc. Inga Marijanović, doc.

Rad prihvaćen: 18. 2. 2016.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Bioaccumulation and effect of silver nanoparticles on subcellular distribution of metals and on metallothioneins in earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826)

Filip Horvat
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Earthworm *Eisenia fetida* was exposed to increased concentrations of silver in nanoparticle and ionic ($AgNO_3$) form. The comparison of bioaccumulation between two forms of silver, along with comparison of similarities and differences in subcellular and cytosolic distribution of silver after exposure were made. The potential of both silver forms to induce the synthesis of metallothioneins and change the distribution of chosen essential elements (Cu, Zn, Mn, Fe, Co, Mo, Se) and Cd between the particulate (pellet) and cytosolic fraction of *E. fetida* tissue was investigated. The distribution of chosen elements among different molecular mass cytosolic fractions separated by size exclusion HPLC was also analysed. It was shown that both silver forms accumulate in earthworm tissues. Bioaccumulation levels were higher in earthworms exposed to ionic silver when compared to nanoparticle silver. There are significant differences in cellular and cytosolic distribution of silver between these two forms of exposure. Silver nanoparticles are not inducing metallothionein synthesis while ionic silver induces it, but only in the highest concentration of exposure. Part of intracellular silver is bound to metallothioneins which are already expressed in cells. The quantitative and qualitative differences in intracellular distribution of essential elements iron, cobalt and molybdenum show potential as biomarkers of nanoparticle and ionic silver form exposure.

(58 pages, 21 figure, 3 tables, 43 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in Central biological library
Keywords: Silver/Metallothioneins /Nanoparticles/Biomarker/*Eisenia fetida*

Supervisor: Senior Research Associate Dušica Ivanković, Ph.D., Ruđer Bošković Institute
Co-supervisor: Asst. Prof Anamaria Štambuk, Ph.D.
Reviewers: Asst. Prof. Anamaria Štambuk, Ph.D.
Assoc. Prof. Željka Vidaković-Cifrek, Ph.D.
Asst. Prof. Inga Marijanović, Ph.D.

Thesis accepted: 18. 2. 2016.

SADRŽAJ

1 UVOD ... 1
1.1 NANOMATERIJALI ... 1
1.2 TOKSIČNOST METALA ... 1
1.3 SREBRO I NANOČESTICE SREBRA ... 2
1.3.1 MEHANIZMI TOKSIČNOSTI SREBRA I NANOSREBRA ... 3
1.4 GUJAVICE KAO TESTNI ORGANIZMI ... 4
1.4.1 UTJECAJ SREBRA NA GUJAVICE ... 4
1.5 METALOTIONEINI ... 5
1.5.1 METALOTIONEINI SISAVACA ... 6
1.5.2 METALOTIONEINI GUJAVICA ... 7
2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA ... 9
3 MATERIJALI I METODE ... 10
3.1. MATERIJAL ... 10
3.1.1. TESTNI ORGANIZAM ... 10
3.1.2. KEMIKALIJE ... 12
3.1.3. INSTRUMENTI I PRIBOR ... 13
3.2. METODE ... 15
3.2.1. IZLAGANJE GUJAVICA POVIŠENIM KONCENTRACIJAMA SREBRNIH NANOČESTICA I $AgNO_3$ U LABORATORIJSKIM UVJETIMA ... 15
3.2.2. POSTUPAK OBRADE TKIVA I PRIPREME UZORKA ZA ODREĐIVANJE METALOTIONEINA I METALA ... 17
3.2.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE METALOTIONEINA ... 19
3.2.4. RAZDVAJANJE CITOSOLNIH PROTEINA PREMA MOLEKULSKOJ MASI POMOĆU TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI UZ ISKLJUČENJE PO VELIČINI (SE-HPLC) ... 22
3.2.5. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE METALA ... 25
3.2.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA ... 27
4 REZULTATI ... 28
4.1 SADRŽAJ SREBRA U TKIVU *E. fetida* NAKON IZLAGANJA IONSKOM SREBRU I NANOČESTICAMA SREBRA ... 28
4.2 RASPODJELA SREBRA IZMEĐU NETOPLJIVE (TALOG) I VODOTOPLJIVE (CITOSOL) FRAKCIJE TKIVA GUJAVICA ... 29
4.3 UKUPNE KONCENTRACIJE I RASPODJELA ODABRANIH ESENCIJALNIH ELEMENATA I Cd IZMEĐU TALOGA I CITOSOLNE FRAKCIJE ... 32
4.4 SADRŽAJ METALOTIONEINA ... 36
4.5 RASPODJELA SREBRA IZMEĐU CITOSOLNIH SPOJEVA RAZLIČITIH MOLEKULSKIH MASA ... 37
4.6 RASPODJELA ODABRANIH ESENCIJALNIH ELEMENATA I Cd IZMEĐU CITOSOLNIH LIGANDA ... 43

5 RASPRAVA 47
5.1 SADRŽAJ I RASPODJELA SREBRA U TKIVU *E. fetida* NAKON IZLAGANJA IONSKOM SREBRU I NANOČESTICAMA SREBRA 47
5.2 POTENCIJAL SREBRA ZA POBUDNU SINTEZU METALOTIONEINA 49
5.3 UTJECAJ SREBRA NA KONCENTRACIJU I RASPODJELU ODABRANIH ELEMENATA UNUTAR TKIVA TE NA RASPODJELU IZMEĐU CITOSOLNIH LIGANDA 50
6 ZAKLJUČAK 53
7 LITERATURA 54

1 UVOD

1.1 NANOMATERIJALI

Nanomaterijali su materijali koji su barem u jednoj dimenziji manji od 100 nm (Sekhon 2014). Svojstva koja pokazuju materijali nano veličine često se vrlo razlikuju od svojstava tih istih materijala u većim dimenzijama (Johnston i sur. 2010). Zbog svojih jedinstvenih i poželjnih svojstava koriste se u mnogim područjima kao što su zdravstvo, informatika, prehrambena industrija i agrikultura (Wijnhoven i sur. 2009). Materijali u nanodimenzijama imaju veliku površinu u odnosu na volumen što znači veću površinu za kemijske reakcije pa je njihova reaktivnost otprilike i do 1000 puta veća (Buzea i sur. 2007). Upravo zbog svoje izuzetne reaktivnosti nanočestice mogu biti toksične za žive organizme (Ai i sur. 2011). Zbog različitih i često nepredvidivih fizikalnih i kemijskih osobina nanočestica nije moguće procijeniti njihov učinak na zdravlje jednostavnom ekstrapolacijom učinka na zdravlje te iste tvari u makro ili molekularnoj veličini.

1.2 TOKSIČNOST METALA

Unos metala u stanicu se vrši preko stanične membrane procesima olakšane difuzije, aktivnog transporta ili pinocitoze (Simkiss i Taylor 1998). Toksičnost metala proizlazi pretežno iz vezanja metala na esencijalne biomolekule kao što su enzimi i transportni proteini te iz uloge u stvaranju slobodnih radikala (Strižak i sur. 2014). Metali mogu inaktivirati esencijalne biomolekule vezanjem na neophodne funkcionalne skupine, ionskom zamjenom neophodnih metalnih iona ili pak promjenom aktivne konformacije (Viarengo 1989). S obzirom na takvo djelovanja toksičnih metala aktiviraju se različiti homeostatski mehanizmi kao što su stvaranje netopljivih taloga metala, odjeljivanje unutar lizosoma te vezanje za specifične ligande, od kojih su najvažniji metalotioneini (Viarengo i Nott 1993). Izloženost metalima također dovodi do stvaranja reaktivnih oblika kisika kao što su vodikov peroksid (H_2O_2), superoksidni (O_2^-) i hidroksilni ($OH^\cdot$) radikali. Kako bi se izbjegao oksidativni stres i oštećenja bioloških makromolekula (lipidi, proteini, DNA) u stanicama djeluju enzimi (superoksid dismutaza, katalaza, glutation peroksidaza, glutation reduktaza) i antioksidansi niske molekulske mase kao što je glutation (Lionetto i sur. 2012).

1.3 SREBRO I NANOČESTICE SREBRA

Kao i zlato, srebro se upotrebljava već tisućama godina za razne namjene, uključujući nakit, posuđe, novac, zubne ispune, razvijanje fotografija i proizvodnju eksploziva (Chen i Schluesener, 2008). Zbog svojih antibakterijskih svojstava srebro je kroz povijest korišteno za tretiranje rana, a koristi se i danas u filterima i dezinficijensima vode. U koloidnom obliku tj. u obliku sitnih čestica raspršenih u suspenziji srebro se nekad koristilo u borbi protiv prehlade, a danas je sastojak dodataka prehrani koji se koriste kod alergijskih poremećaja (Wijnhoven i sur. 2009).

Nanočestice srebra uglavnom su manje od 100 nm te sadrže oko 2 milijuna atoma srebra. U proizvodima namijenjenim ljudskoj uporabi pojavljuju se prije svega zbog anti-bakterijskog učinka. Među ostalim sadrže ih zavoji koji se stavljaju na rane, odjeća (protiv neugodnih mirisa), paste za zube, sapuni, šamponi, boje, lakovi, plastika te pakiranja gdje dolaze u izravni kontakt s hranom (Christensen i sur. 2010). Uz to se koristi u antibakterijskim premazima u kućanskim aparatima kao što su hladnjaci, filteri za zrak, usisavači, perilice za rublje i suđe te čak i ekranima na dodir mobilnih uređaja (Buzea i sur. 2007). Od 800 proizvoda za koje je 2009. zabilježeno da sadrže nanomaterijale njih oko 30% sadržavalo je nanočestice srebra (Wijnhoven i sur. 2009).

Većim korištenjem nanočestica srebra u proizvodima za ljudsku upotrebu dolazi i do njihovog povećanog otpuštanja u okoliš. Unatoč tome nema puno podataka o okolišnim putevima nanočestica srebra te o njihovom potencijalnom učinku, pogotovo na kopnene biotope. Srebro se u nano ili otopljenom obliku otpušta iz kozmetičkih proizvoda i iz odjeće te odlazi u otpadne vode. Procjenjuje se da se 90% srebra pročisti iz otpadnih voda pomoću biljaka i filtera te se istaloži u kanalizacijski mulj. U većini europskih zemalja kao i u SAD-u veći dio tog mulja prerađuje se u biokrutine koje se potom koriste kao gnojivo u agrikulturi, pri uređenju zelenih površina, šumarstvu, u zemlji za sađenje, kompostu te proizvodnji cigli. Na taj način dolazi do mogućeg izlaganja većeg broja kopnenih biljaka kao i životinja nanočesticama srebra (Shoults-Wilson i sur. 2011a).

1.3.1 MEHANIZMI TOKSIČNOSTI SREBRA I NANOSREBRA

Većina dostupnih toksikoloških podataka o srebru bave se toksikologijom elementarnog srebra (Ag^0) i monovalentog iona srebra (Ag^+). Spojevi srebra koji otpuštaju slobodne ione srebra mnogo su toksičniji od ostalih oblika te se stoga toksični učinak tvari koja sadrži srebro može proporcionalno povezati sa stopom otpuštanja slobodnih iona srebra iz te tvari (Wijnhoven i sur. 2009). Metalno srebro ima minimalni utjecaj na zdravlje dok se topivi spojevi srebra puno lakše apsorbiraju u organizam te zbog toga predstavljaju veći rizik za zdravlje (Drake i Hazelwood, 2005).

Utjecaj nanočestica srebra na organizme najviše je ispitivan u vodenim okolišima. Pastrve izložene nanočesticama srebra u vodi u koncentraciji od 100 ppm uginule su nakon 4 sata (Joo i sur. 2013). Embriji zebrice u ranom stadiju (8 stanica) ugibaju ili se deformiraju pri mnogo manjim koncentracijama (0.19 nM) (Lee i sur. 2007). Ispitivanje toksičnosti u kulturi humanih stanica pokazalo je kako se nakon dodatka nanočestica u medij u stanicama smanjuje sadržaj ATP-a, dolazi do oštećenja mitohondrija, povećava se koncentracija reaktivnih oblika kisika te dolazi od oštećenja DNA (AshaRani i sur. 2008). Ispitivanje na HeLa stanicama pokazalo je kako nanočestice srebra imaju genotoksičan učinak te da izlaganje nakon 48 sati dovodi do povećane ekspresije gena povezanih s metabolizmom lipida i ugljikohidrata, staničnim obrambenim i imunosnim odgovorom, endocitozom te signalnom kaskadom JAK-STAT koja sudjeluje u osnovnim staničnim funkcijama kao što su rast i diferencijacija stanica (Xu i sur. 2012).

Nije u potpunosti jasno koliko su nanočestice srebra toksične same po sebi, a koliko je razlog njihove toksičnosti otpuštanje iona srebra s njihove površine u otopini. U eksperimentu 2009. godine autori su izložili humane stanice tumora jetre otopini nanočestica srebra prethodno filtriranoj kroz ionski izmjenjivač kako bi se uklonili ioni te su zaključili da je citotoksičnost nanočestica srebra prvenstveno rezultat oksidativnog stresa te je neovisna od toksičnosti Ag^+ iona (Kim i sur. 2009). U odvojenom istraživanju na istim stanicama dodatak cisteina koji snažno veže ione srebra nije potpuno uklonio toksičnost mjerenu mikronukleus testom što indicira da osim iona koji se otpuštaju s površine nanočestica i one same u određenoj mjeri sudjeluju u oštećenju kromosoma (Kawata i sur. 2009).

1.4 GUJAVICE KAO TESTNI ORGANIZMI

Gujavice se smatraju ključnim vrstama u mnogim kopnenim ekosustavima te su prihvaćene kao indikatorski organizam kod proučavanja utjecaja onečišćenja na organizme tla. Imaju veliku ulogu u razgradnji organskih tvari u tlu i na taj način u mineralizaciji nutrijenata, sudjeluju u primarnoj produkciji, poboljšavaju strukturu tla te su važan dio mnogih kopnenih hranidbenih lanaca. Zbog male pokretljivosti odražavaju stupanj onečišćenja uskog područja. Kako žive u zemlji te ju u velikim količinama unose u svoj organizam izložene su onečišćenju tla preko kože i kroz probavni sustav te u svom tijelu akumuliraju štetne tvari. Zbog toga su gujavice idealni organizmi za procjenu biodostupnosti mnogih štetnih tvari u tlu. Prednosti gujavica kao povoljnih organizama u proučavanju toksikologije tla uključuju i jednostavan uzgoj u laboratoriju te lako mjerenje reprodukcije, rasta, akumulacije i ekskrecije tvari kao i biokemijskih odgovora (Lukkari, 2004; Lanno i sur. 2004). Prema OECD protokolu, *E. fetida* je preporučena vrsta za toksikološke testove (OECD, 2004). Razlozi tomu su visoka plodnost, brzo sazrijevanje, kratak životni ciklus u odnosu na druge vrste te odgovor na široki raspon zagađivača (Nahmani i sur. 2007). Osim toga, jednostavne su za održavanje i uzgoj u laboratoriju, lako su dostupne i mogu se nabaviti od komercijalnih uzgajivača (Nahmani i sur. 2007).

1.4.1 UTJECAJ SREBRA NA GUJAVICE

U istraživanju 2011. godine na gujavici vrste *E. fetida* autori su pokazali kako izlaganje nanočesticama srebra u koncentraciji od 1000 mg/kg suhe zemlje dovodi do smanjenja biomase, potpunog prekida razmnožavanja te povećane smrtnosti jedinki. Istovremeno, izlaganje $AgNO_3$ je dovelo do značajno veće smrtnosti u odnosu na izlaganje nanočesticama (u odnosu na kontrolu preživjelo je svega 2,5% izloženih jedinki) (Heckmann i sur. 2011). U odvojenom istraživanju na istoj vrsti nije primijećena veća smrtnost ni promjene u rastu kod najvećih koncentracija izlaganja ($AgNO_3$ - 95 mg/kg zemlje, nanočestice - 790 mg/kg zemlje), no primijećena je reproduktivna toksičnost. Jedinke izložene $AgNO_3$ akumulirale su značajno više srebra u svojim tkivima te im se značajno smanjila reprodukcija u odnosu na jedinke izložene jednakim koncentracijama nanočestica srebra. Autori zaključuju da je ionski oblik srebra više toksičan za *E. fetida* od nanočestica srebra. (Shoults-Wilson i sur. 2011a).

1.5 METALOTIONEINI

Metalotioneini (MT) su neenzimatski intracelularni proteini male molekulske mase (500 do 14000 Da) bogati cisteinom te bez aromatskih aminokiselina i histidina. Vežu esencijalne (cink, bakar, selen) i neesencijalne (kadmij, živu, srebro, arsen) teške metale pomoću tiolnih grupa cisteinskih ostataka, koji mogu činiti i do 30% aminokiselinog sadržaja pojedinog proteina. Lokalizirani su na membrani Golgijevog aparata. Prvi metalotioneini izolirani su 1957. godine iz kore bubrega konja (Margoshes i sur. 1957) te su od onda pronađeni kod mnogih vrsta kralješnjaka te beskralješnjaka (većinom mekušaca i rakova) (Stürzenbaum i sur. 1998; Gruber i sur. 2000).

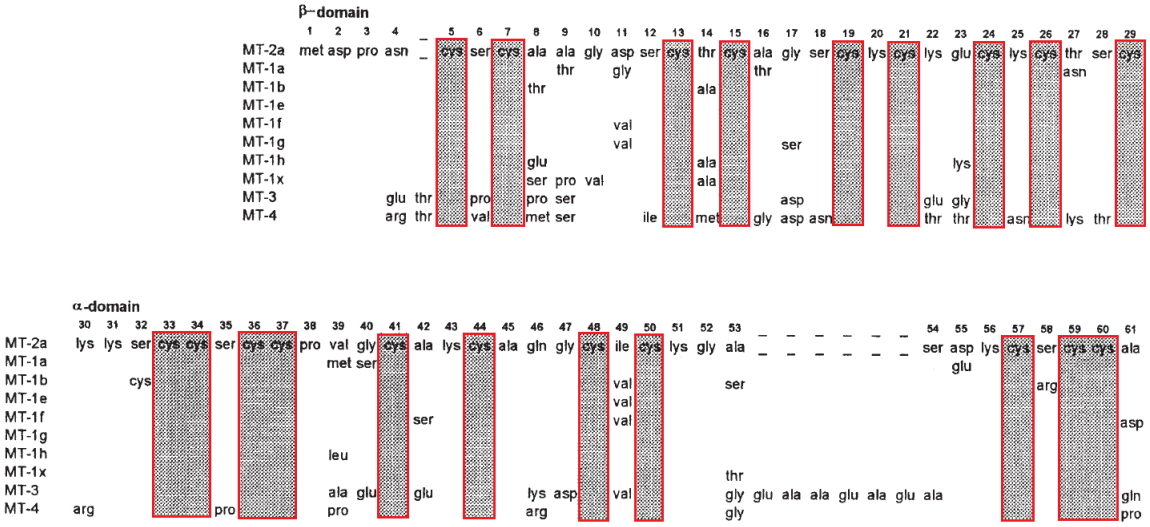
Biološke uloge metalotioneina još uvijek nisu u potpunosti određene. S obzirom na kapacitet za vezanje metala smatra se da imaju ulogu u kontroli homeostaze esencijalnih metala (prije svega bakra i cinka) koje otpuštaju kad su potrebni enzimima i u drugim metaboličkim ulogama. Neesencijalni metali mogu istisnuti esencijalne metale iz veznih mjesta metalotioneina te je primijećeno da povećana indukcija metalotioneina pojačava toleranciju organizma na toksične teške metale. Stoga se smatra da su također uključeni i u detoksikaciju viška esencijalnih i neesencijalnih metala u organizmu (Hogstrand i sur. 1996).

Ekspresija metalotioneina inducirana je vezanjem metal-transkripcijskog faktora 1 (MTF-1) na regulatornu regiju MT gena nazvanu metal-osjetljivi elementi (MRE-s, eng. *metal responsive elements*). Indukciju MT preko MRE regije može uzrokovati nekoliko metalnih iona kao što su Zn, Cu i Cd, no Zn je jedini teški metal koji može reverzibilno i izravno aktivirati DNA-veznu domenu MTF-1 (Sakulsak 2012). Metalotioneini se smatraju ključnim biomarkerima pri toksičnosti metala (Xu i sur. 2012).

U istraživanju 1994. godine pokazano je da dodatak srebrovog nitrata u medij u kulturi stanica sisavaca (BHK stanice) inducira sintezu metalotioneina (Palmiter, 1994). Izlaganje juvenilnih kalifornijskih pastrvi solima srebra ($AgNO_3$, $Ag(S_2O_3)_n$, $AgCl_n$) dovodi do nakupljanja srebra u jetri te do indukcije sinteze metalotioneina u škrgama i u jetri (Hogstrand i sur. 1996). U već spomenutoj studiji iz 2012. nakon tretiranja humanih stanica hidrogelom s nanočesticama srebra među genima povećane ekspresije detektirano je 10 različitih izoformi gena metalotioneina (Xu i sur. 2012).

1.5.1 METALOTIONEINI SISAVACA

Metalotioneini sisavaca sastavljeni su od 61 do 68 aminokiselina, od čega je 18 do 23 cisteina. Pozicije cisteina u aminokiselinskom slijedu su vrlo konzervirane i čine *Cys-x-Cys*, *Cys-x-y-Cys* i *Cys-Cys* sekvence, pri čemu su *x* i *y* ne-cisteinske aminokiseline (Slika 1) (Coyle i sur. 2002).



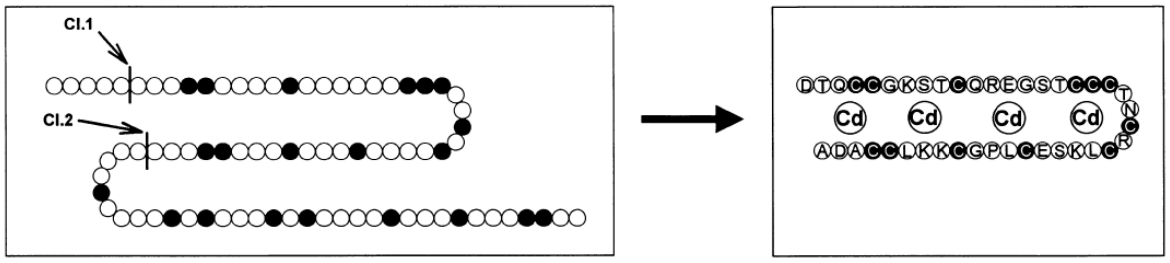
SLIKA 1. Shema sekvence aminokiselina poznatih izoformi humanog metalotioneina. Prikazane su α i β domene te aminokiseline koje se u izoformama razlikuju od MT-2a. Mjesta konzerviranih cisteina su naglašena crvenom bojom (Coyle i sur. 2002).

Atomi sumpora vežu dvovalentne metale u tiolatne klastere tetraedarske geometrije (trigonske u slučaju Cu^{+}). Afinitet vezanja najveći je za Cu, potom slijedi Cd te Zn. Osamnaest različitih metala ulazi u interakcije s metalotioneinima, ali samo Cu^{+}, Cd^{2+}, Pb^{2+}, Ag^{+}, Hg^{+} i Bi^{2+} mogu istisnuti Zn iz veznog mjesta. MT ima dvije domene, C-terminalnu α-domenu koja je stabilnija i veže četiri dvovalentna metalna atoma te reaktivniju N-terminalnu β-domenu koja veže tri dvovalentna metalna atoma. Postoji više različitih izoformi metalotioneina koje se razlikuju po biološkim funkcijama i razdiobi u tkivima. Dvije najčešće izoforme kod sisavaca MT-1 i MT-2 eksprimiraju se primarno u jetri te u probavnom sustavu i gušterači, a uključene su u regulaciju cinka i detoksikaciju teških metala (posebno kadmija) (Coyle i sur. 2002).

1.5.2 METALOTIONEINI GUJAVICA

Za razliku od metalotioneina kralješnjaka, a posebno sisavaca, čija je struktura visoko konzervirana, MT kopnenih beskralješnjaka značajno se strukturalno razlikuju između različitih skupina što ukazuje da mnogi od tih proteina filogenetski nisu jako srodni. Razlog velike varijacije u strukturi metalotioneina kopnenih beskralješnjaka proizlazi iz toga što su se te skupine životinja prilagođavale kopnenom načinu života u različito vrijeme i pod različitim evolucijskim uvjetima. (Gruber i sur. 2000).

Dosad poznati metalotioneini gujavica sadrže 71-80 aminokiselina među kojima se ističe odsutnost aromatskih aminokiselina te 19-21 cisteina u slijedu *Cys-Cys*, *Cys-x-Cys* i samostalnog *Cys* (*x* je necisteinska aminokiselina). U istraživanju iz 2000. proučavana je struktura proteina metalotioneina te odgovarajućeg gena kod vrste *E. fetida*. Utvrđeno je da gen MT kodira za protein duljine 80 aminokiselina koji sadrži slijed *Cys-Cys-Cys* jedinstven među gujavicama. Nakon izolacije proteina utvrđeno je da se sastoji od 41 aminokiseline što je upola manje od pretpostavljene duljine. Autori zaključuju da dolazi do cijepanja translatiranog proteina blizu N-terminusa te u regiji koja povezuju dvije metal-vezujuće domene (Slika 2). Tako posttranslacijski obrađeni protein sadrži 12 cisteina koji vežu 4 iona kadmija te je nakon izolacije stabilan *in vitro* dok *in vivo* tvori stabilne dimere (Gruber i sur. 2000).



SLIKA 2. Prikaz mjesta cijepanja (Cl. 1 i Cl. 2) metalotioneina vrste *E. fetida* nakon translacije te način vezanja 4 iona kadmija u dobivenom proteinu (Gruber i sur. 2000).

Kod gujavice *Lumbricus rubellus* postoje dvije izoforme MT koje dijele 81% sličnosti nukleotidnog te 75% sličnosti aminokiselinskog sastava. Obje izoforme sadrže 20 cisteina čije pozicije u strukturi aminokiselinskog lanca su u potpunosti konzervirane te vežu šest atoma kadmija. Izoforma 1 čini manje stabilan klaster s metalima te se smatra da ima

ulogu prijenosnika i donora esencijalnih metala. Izoforma 2 je stabilnije te je inducirana porastom koncentracije kadmija u stanici pa se smatra da ima ulogu u imobilizaciji i detoksikaciji tog metala (Stürzenbaum i sur. 2001).

2 CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Ciljevi ovog rada mogu se podijeliti u četiri dijela. Prvi cilj ovog rada je usporediti stupanj bioakumulacije (bioraspoloživost), te odrediti sličnosti i razlike u subcelularnoj i citosolnoj distribuciji srebra u gujavica *E. fetida* nakon izlaganja povišenim koncentracijama Ag nanočestica odnosno ionskog Ag ($AgNO_3$). Također, cilj je istražiti utjecaj izlaganja povišenim koncentracijama nano odnosno ionskog srebra na raspodjelu drugih, a napose esencijalnih, elemenata između citosola i netopljive frakcije tkiva gujavica. Treći cilj je istražiti potencijal srebra za pobudnu sintezu metalotioneina (MT). Na kraju, cilj je odrediti utjecaj nano i ionskog srebra na raspodjelu Cd i esencijalnih elemenata Co, Cu, Fe, Mn, Mo i Zn između liganda različitih molekulskih masa u staničnom citosolu kontrolnih organizama (tzv. citosolni profil metala), te odrediti kvantitativne i/ili kvalitativne promjene u citosolnim profilima ovih metala nakon izlaganja povišenim koncentracijama nano odnosno ionskog srebra.

3 MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJAL

3.1.1. TESTNI ORGANIZAM

U radu su korištene gujavice vrste *Eisenia fetida* (Savigny, 1826).

Tip organizacije: *Polymeria*

Koljeno: *Annelida* (kolutićavci)

Razred: *Clitellata* (pojasnici)

Red: *Haplotaxida*

Podred: *Opisthopora*

Porodica: *Lumbricidae*



SLIKA 3. Testni organizam, gujavica *Eisenia fetida* (Savigny, 1826)

Tijelo gujavice *E. fetida* (Slika 3) cjevastog je oblika, duljine 3-13 cm, širine 3-5 mm i jasno segmentirano na kolutiće izvana i iznutra. Prvi kolutić na kojem se nalaze usta naziva se metastomij. Ispred metastomija nalazi se akron koji se ne smatra kolutićem s obzirom da nema celom. Zadnji kolutić na kojem je analni otvor naziva se pigidij ili analni kolutić. Kolutići između prvog i zadnjeg nazivaju se peristomijalni kolutići trupa. Tijelo *E. fetide* obavijeno je jednoslojnom epidermom koju prekriva albuminozna kutikula. Ispod epiderme nalazi se mišićni sustav sastavljen od prstenastih i uzdužnih mišića dok se u unutrašnjosti tijela nalaze kosi mišići. Na površini tijela nalaze se skupine čekinja koje se uvlače i izvlače iz tijela te se hvataju za okolne površine kako gujavica širi i skuplja svoje mišiće. Na taj se način gujavica pokreće naprijed ili natrag. Tjelesna šupljina koja se proteže cijelom duljinom tijela naziva se celom te je također kolutićavo raspoređena. Svaki kolutić ima lijevu i desnu celomsku vrećicu koje su ispunjene celomskom tekućinom. Ta tekućina služi kao potpora mišićima i naziva se hidroskelet. Probavilo je prohodno, a probava je ekstracelularna. Optjecajni sustav je zatvoren i ispunjen hemolimfom. Ljestvičavi živčani sustav smješten je ventralno. Osjetilne stanice nalaze se na cijelom tijelu dok su kemoreceptorne stanice smještene u blizini usta (Matoničkin i sur. 1999).

E. fetida je epigeična vrsta koja živi na površini tla na kiselim staništima bogatim organskim tvarima kao što su kompostišta i gnojišta. Uobičajeni životni vijek iznosi dvije godine. Visoko je reproduktivna vrsta i polaže oko 900 jajašaca godišnje. Hrani se otpalim lišćem te ostalim organskim otpadom u plićem sloju tla. Rijetko ih se može naći u tlu te stvaraju privremene tunele samo za vrijeme mirovanja. Po tim osobinama slične su vrsti *Lumbricus rubellus*. Vrsta je nativna u Europi, ali je unešena na sve kontinente osim Antartike. Koristi se kod vermikompostiranja tla (Garg i sur. 2006) te kao mamac kod pecanja riba (Fadaee 2012).

3.1.2. KEMIKALIJE

Korištene kemikalije su analitičke čistoće (p.a.), osim ako nije drukčije navedeno. Za pripremu otopina korištena je Milli-Q voda.

- nanočestice srebra, veličina čestica do 100 nm, Sigma-Aldrich
- $AgNO_3$, srebrov nitrat, Sigma-Aldrich
- Trisma®/Base (SigmaUltra) (Tris[hidroksimetil]aminometan)hidroklorid, $C_4H_{11}NO_3$, Sigma Chemical Co., St. Louis, SAD
- HCl (Suprapur), 30%, klorovodična kiselina, Merck, Darmstadt, Njemačka
- β-merkaptoetanol, Sigma Chemical Co., St. Louis, SAD
- Leupeptin (Acetil-Leu-Leu-Arg-al), Sigma Chemical Co., St. Louis, SAD
- PMSF, fenilmetilsulfonil-fluorid, Sigma Chemical Co., St. Louis, SAD
- EDTA, Titriplex III, $C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8x2H_2O_2$, etilen-diamin-tetraoctena kiselina, Merck, Darmstadt, Njemačka
- Apsolutni etanol, C_2H_6O, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Kloroform, $CHCl_3$, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- GSH, reducirani L-glutation, $C_{10}H_{17}N_3O_6S$, Serva, Feinbiochemia, Heidelberg, Njemačka
- DTNB, 5,5`-ditio-bis(2-nitrobenzojeva kiselina), Sigma Chemical Co., St. Louis, SAD
- KH_2PO_4, kalij-dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- NaOH, natrij-hidroksid, Kemika, Zagreb, Hrvatska
- Zn-MT95 - MT standard iz zečje jetre (Ikzus Environment, Italy)
- Blue dextran, plavi dekstran (Sigma Chemical Co., St. Louis, SAD) - standard za određivanje praznog volumena na gel-filtracijskim kolonama
- Kit proteinskih standarda MW-GF-1000 za određivanje molekulske mase proteina pomoću gelske filtracije, Sigma- Chemical Co., St. Louis, SAD
- HNO_3, 65% Suprapur, dušična kiselina, Merck, Darmstadt, Njemačka
- H_2O_2, vodikov peroksid, 30% Suprapur, Merck, Darmstadt, Njemačka
- multielementna standardna otopina za metale u tragovima u 5% HNO_3 (100 mg/L, Analitika, Republika Češka)
- pojedinačna standardna otopina Ag u 5% HNO3 (100 mg/L, Analitika, Republika Češka)

- In, standardna otopina indija (interni standard), 1000 mg/L u 2 M HNO_3, Fluka, Njemačka
- DOLT-3 (Dogfish Liver Certified Reference Material for Trace Metals, National Research Council,Kanada) - certificirani referentni uzorak jetre za provjeru točnosti određivanje metala u tragovima u tkivima
- QC (Quality control sample for trace metals, UNEP GEMS/Water PE Study No. 7) - referentni uzorak za provjeru točnosti mjerenja metala na HR-ICPMS
- Argon, čistoće 99,99%

3.1.3. INSTRUMENTI I PRIBOR

- Analitička vaga, Mettler AE 240, (Mettler-Toledo GmbH, Švicarska), mjereno područje 0 – 210 g
- Precizna vaga Viper SW 3 (Mettler-Toledo GmbH, Švicarska), mjerno područje 0 g – 3100 g
- pH-metar PerpHecT LogR meter, model 320; pH 0-14 (ATI Orion, Boston, MA, USA) - prije mjerenja pH-metar je kalibriran standardnim otopinama definiranih pH vrijednosti (7,00 i 10,00)
- Homogenizator K6424 high-speed, brzina okretaja: 100-11500 rpm (Potter-Elverhjem GLAS-COL, SAD) s teflonskim batićem pričvršćenim na rotirajuću osovinu – homogenizacija tkiva u epruveti
- Centrifuga Avanti J-E s hlađenjem, maksimalni RCF: 50000xg (Beckman Coulter, SAD) – centrifugiranje homogenata tkiva u svrhu razdvajanja vodotopljive (supernatant S50) od netopljive frakcije tkiva gujavica
- Centrifuga Biofuge Fresco s hlađenjem, maksimalni RCF: 16.016xg (Kendro Laboratory Products, SAD) – centrifugiranje uzoraka u postupku kvantitativnog određivanja metalotioneina te dodatno pročišćavanje uzoraka citosola prije nanošenja na kromatografsku kolonu
- Vrtložna mješalica MS1 (Ika-Works, Njemačka)
- Fotometar (čitač mikroploča) Tecan Infinite M200 (Tecan Group Ltd, Švicarska) – mjerenje apsorbancije za određivanje koncentracije MT
- Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti uz isključenje po veličini (SE-HPLC, Perkin Elmer, serija 200; kolona Superdex™ 200 10/300 GL (GE Healthcare

Biosciences) – razdvajanje uzoraka prema molekulskoj masi u svrhu određivanja distribucije metala između citosolnih liganda

- Maseni spektrometar visokog razlučivanja s induktivno spregnutom plazmom (HR ICP-MS, Element 2 (Thermo Finnigan, Bremen, Njemačka) – određivanje sadržaja metala u razgrađenim uzorcima taloga i citosola te u kromatografskim frakcijama dobivenim razlučivanjem uzoraka citosola pomoću SE-HPLC

3.2. METODE

3.2.1. IZLAGANJE GUJAVICA POVIŠENIM KONCENTRACIJAMA SREBRNIH NANOČESTICA I $AgNO_3$ U LABORATORIJSKIM UVJETIMA

Sastav medija za izlaganje gujavica (Slika 4):

- 70% kvarcnog pijeska
- 20% kaolinske gline
- 5% crnog treseta (blago lužnat pH)
- 5% bijelog treseta (blago kiseli pH)

Sastojci su promiješani, prebačeni u vatrostalne čaše te sterilizirani na temperaturi od 105°C u trajanju 90 minuta. Jedan dan prije izlaganja u mješavinu su dodane otopine $AgNO_3$ ili srebrnih nanočestica te destilirana voda do relativne vlage od 35% (OECD, 1984).



SLIKA 4. Medij za izlaganje: 1 - kvarcni pijesak; 2 - kaolinska glina; 3 – crni treset; 4 - bijeli treset; 5 - sastojci pomiješani s vodom

U staklenim akvarijima volumena 2,3 litara dodano je 1248 g medija za uzgoj pomiješanog s 12 g zobenog brašna i 441 ml vodene otopine $AgNO_3$ odnosno vodene suspenzije srebrnih nanočestica (do 100 nm, Sigma-Aldrich). Konačne koncentracije srebrnih nanočestica odnosno $AgNO_3$ iznosile su 2 mg/kg, 10 mg/kg te 50 mg/kg. Kako bi raspored

čestica u suspenziji bio homogen otopine su tijekom dodavanja čestica miješane na elektromagnetnoj miješalici. Uz medije s dodanim $AgNO_3$ i nanočesticama srebra postavljen je i medij bez kemikalija kao kontrolni uzorak. Nakon dodatka otopina srebra medij je ostavljen preko noći kako bi se stabilizirale kemijske reakcije između otopina i medija te kako bi se medij aklimatizirao.

Gujavice su nabavljene od tvrtke Eršak d.o.o iz Donje Bistre koja se bavi uzgojem gujavica za vermikompostiranje. Dan prije izlaganja jedinke su temeljito isprane destiliranom vodom kako bi se odstranio sav organski materijal s njihove površine te su stavljene u suspenziju medija za uzgoj i destilirane vode kako bi izbacile sadržaj iz crijeva da bi se u analizi dobili samo metali iz tkiva gujavice. Posude su prekrivene s nekoliko slojeva sterilne gaze pričvršćene ljepljivom trakom (Slika 5). Izlaganje gujavica trajalo je 10 dana te su za vrijeme izlaganja redovito vizualno provjeravane, bez diranja koje bi im uzrokovalo dodatni stres. Izlaganje je provedeno u laboratoriju s prirodnim ciklusom dnevne svjetlosti uz pažnju kako posude s gujavicama ne bi bile izravno izložene sunčevom svjetlu.



SLIKA 5. Posude s medijem i otopinama srebra u kojima je provedeno izlaganje

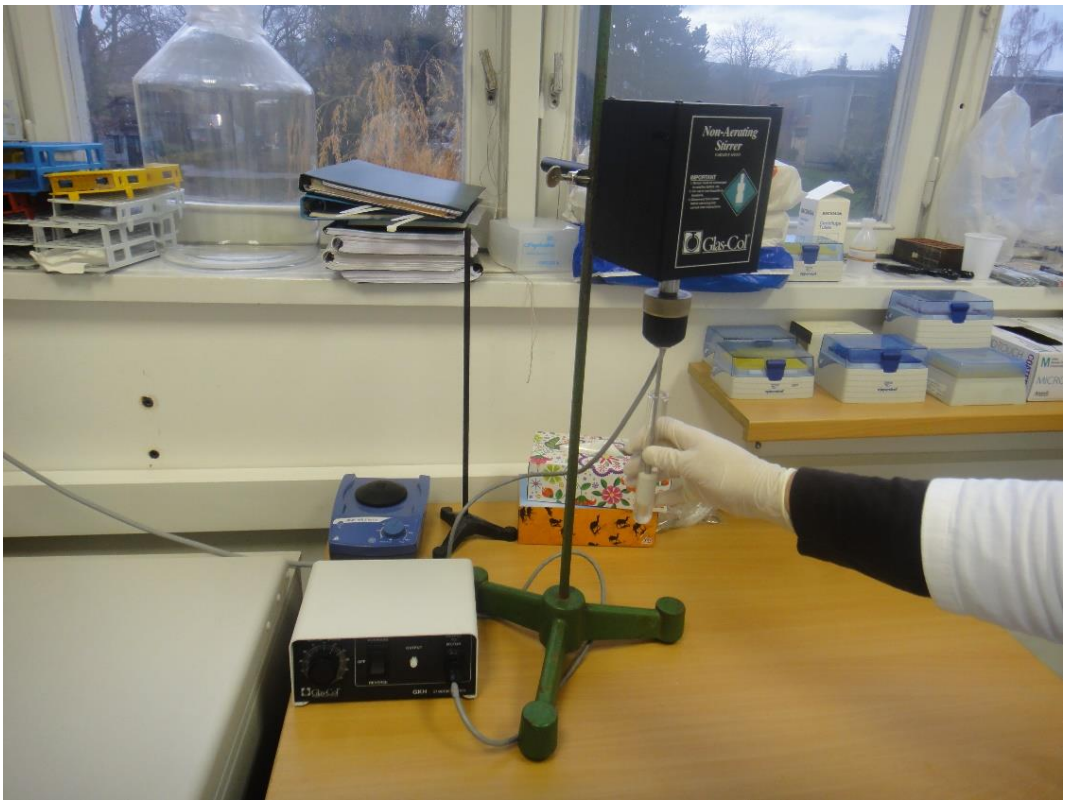
3.2.2. POSTUPAK OBRADE TKIVA I PRIPREME UZORKA ZA ODREĐIVANJE METALOTIONEINA I METALA

Tijekom cijelog postupka pripreme uzoraka potrebno je održavati nisku temperaturu zbog čega se pufer za homogenizaciju, epruveta za homogeniziranje te posudice za pohranu uzoraka drže u ledenoj kupelji.

Neposredno prije homogeniziranja uzorci su izvađeni iz hladnjaka u kojem su bili čuvani na temperaturi od -80°C. Uzorci su zatim djelomično odmrznuti te se usitnjeni škarama. Usitnjenom tkivu dodan je u omjeru 5:1 svježe pripremljen pufer za homogenizaciju slijedećeg sastava:

- 20 mM Tris/HCl (pH=8,6),
- 0,006 mM leupeptin i 0,5 mM PMSF kao inhibitori proteolitičke aktivnosti
- 0,01% β-merkaptoetanol kao reducens

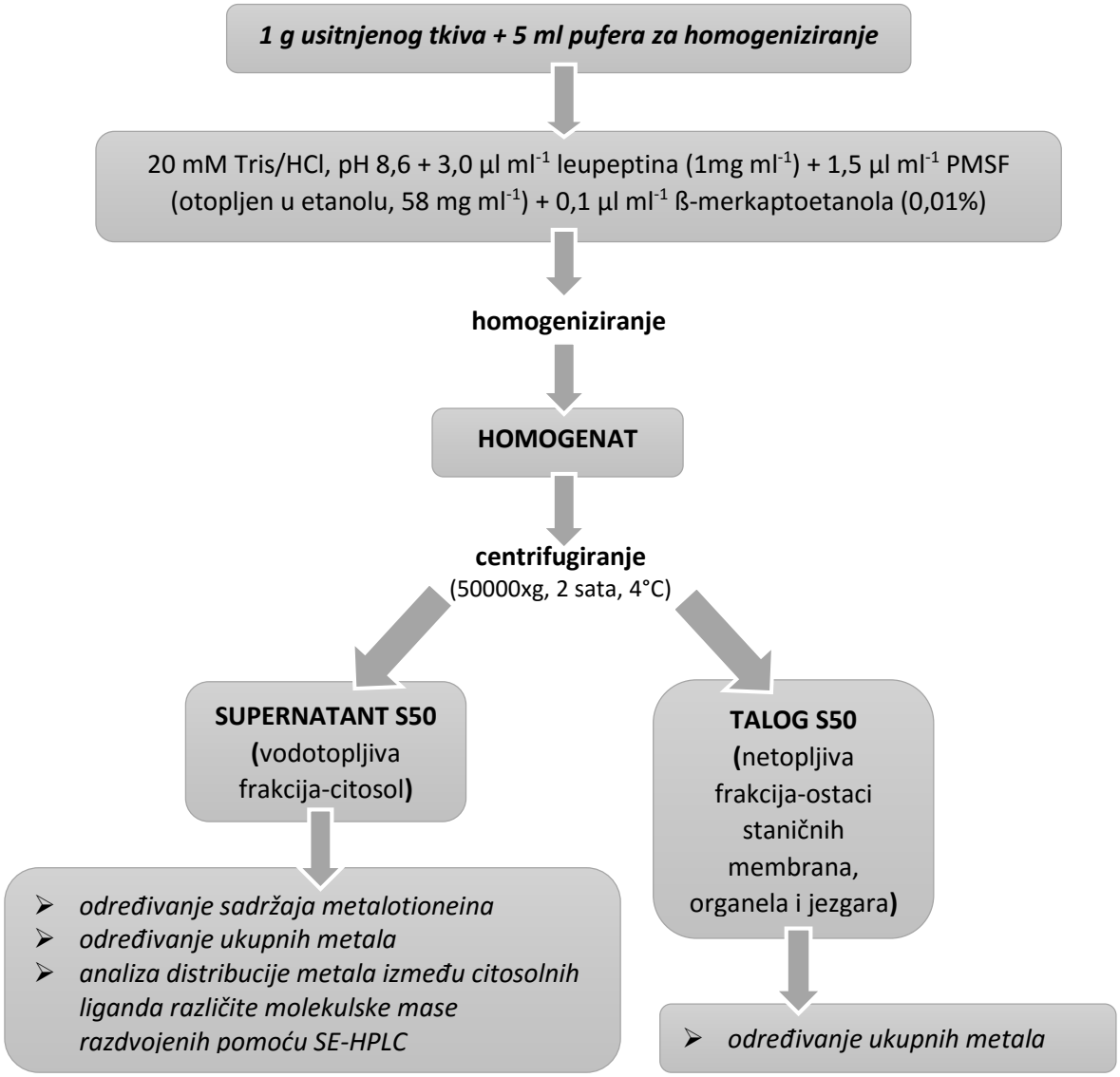
Tako pripremljeno tkivo homogenizirano je u staklenoj epruveti pomoću homogenizatora s teflonskim batićem pričvršćenim na rotirajuću osovinu (Slika 6).



SLIKA 6. Homogeniziranje tkiva u staklenoj epruveti homogenizatorom s teflonskim batićem

Dobiveni homogenat je zatim centrifugiran 2 sata na 50 000 × g i temperaturi od 4ºC kako bi se odijelila vodotopljiva citosolna frakcija tkiva gujavica (supernatant S50) od netopljive frakcije (taloga) u kojoj su sadržani ostaci staničnih membrana, organela i jezgara.

Alikvoti supernatanta S50 odvojeni su u čiste, ohlađene Eppendorf epruvete od 1,5 ml i zamrznuti na -80°C za daljnje analize: određivanje sadržaja metalotioneina (nakon postupka etanolne precipitacije), ukupnih metala (nakon razgradnje s kombinacijom koncentrirane HNO_3 i HCl, te vodikovog peroksida) te sadržaja metala u citosolnim frakcijama razdvojenim prema molekulskoj masi pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti uz isključenje po veličini (SE-HPLC).



SLIKA 7. Shematski prikaz postupka obrade tkiva i odijeljivanja vodotopljive frakcije tkiva (citosol) od netopljive tkivne frakcije (talog)

3.2.3. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE METALOTIONEINA

Određivanje koncentracije MT provedeno je prema metodi opisanoj u radu Viarengo i sur. (1997) koja je prilagođena na manji volumen uzorka (250 µl umjesto 1 ml u standardnoj metodi). Metoda se sastoji od diferencijalnog frakcijskog taloženja proteina mješavinom organskih otapala etanola i kloroforma (tzv. etanolna precipitacija) kojom se priprema djelomično pročišćeni i koncentrirani uzorak metalotioneina. Potom se u tom uzorku koncentracija metalotioneina određuje spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na reakciji tiolnih skupina cisteina s 5,5-ditiobis-2-nitrobenzojevom kiselinom (DTNB, Ellmanov reagens).

3.2.3.1. Etanolna precipitacija

Etanolna precipitacija primijenjena je na supernatantu S50 (citosol). Taloženje je izvedeno u Eppendorf epruvetama od 1,5 ml i 2 ml. Tijekom postupka epruvete su držane na ledu, a otapala i pufer za ispiranje prethodno su ohlađeni na -20°C, jer pri povišenoj temperaturi alkohol uzrokuje denaturaciju proteina.

Postupak taloženja izveden je u tri koraka. U prvom koraku uklanjanju se proteini molekulske mase iznad 20 000: u Eppendorf epruvete od 1,5 ml otpipetirano je 250 µl citosola S50, a zatim je dodano 262 µl hladnog apsolutnog etanola (-20°C) i 20 µl kloroforma (-20°C). Koncentracija etanola u takvoj otopini je oko 49% što je dovoljno za taloženje visokomolekularnih proteina. Uzorci su nekoliko sekundi promiješani na vrtložnoj miješalici i centrifugirani 6 minuta na 12 000 × g pri 2°C. Dobiveni supernatant preliven je u čiste ohlađene Eppendorf epruvete od 2 ml.

U drugom koraku pri koncentraciji etanola u otopini od oko 87% istaložena je frakcija bogata metalotioneinima. Na supernatant dobiven u prethodnom koraku dodano je 3 volumena hladnog etanola (1,35 ml) i sadržaj epruvete je dobro promiješan. Uzorci su ostavljeni na -20°C jedan sat, a zatim su centrifugirani 6 minuta na 12 000 × g pri 2°C. Nakon toga je supernatant izliven i rubovi epruveta osušeni su na filtar papiru kako bi se što potpunije uklonio supernatant.

U trećem koraku talozi su isprani sa 700 µl hladne otopine (-20°C) etanola/kloroforma/pufera 20 mM Tris/HCl pomiješanih u volumnom omjeru 87:1:12. Ispiranje osigurava uklanjanje eventualno zaostalih onečišćenja niskomolekularnim

topljivim tiolima. Uzorci su ponovno centrifugirani 6 minuta na 12 000 × g. Epruvete su postavljene na filtar papir u okrenutom položaju kako bi se ocijedile, a talozi su zatim osušeni na struji dušika dovoljno dugo da se ispari sav alkohol.

Nakon što su osušeni, talozi su otopljeni dodavanjem 35 µl 0,25 M NaCl te 35 µl otopine 1 M HCL/4 mM EDTA. Tako pripremljeni uzorak držan je na sobnoj temperaturi do dodavanja Ellmanovog reagensa.

3.2.3.2. Spektrofotometrijsko određivanje sadržaja slobodnih SH skupina pomoću Ellmanovog reagensa

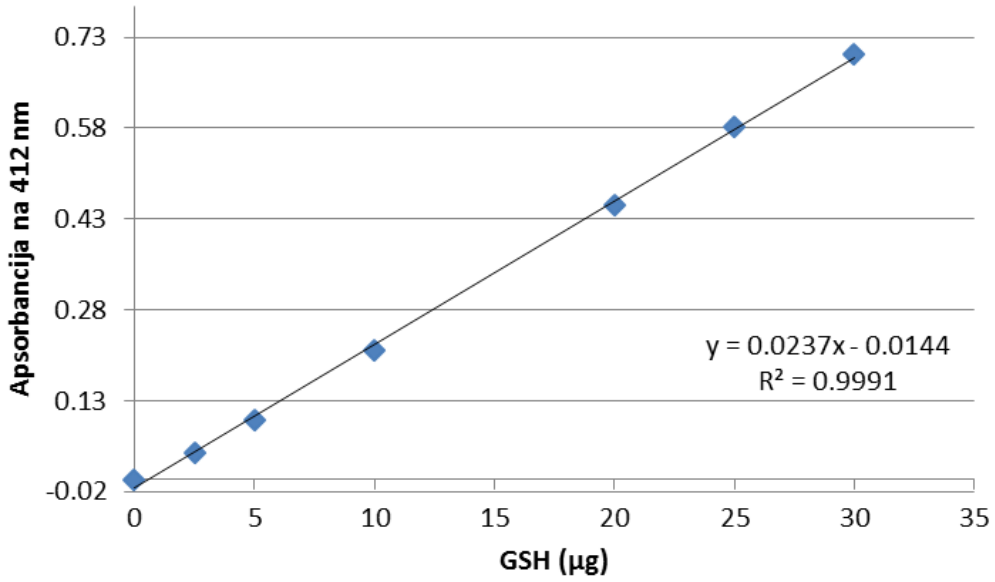
Koncentracija MT određena je spektrofotometrijskom metodom koja se temelji na reakciji tiolnih skupina cisteina s 5,5-ditiobis-2 nitrobenzojevom kiselinom (DTNB, Ellmanov reagens). Reakcija se izvodi u prisutnosti EDTA koja uklanja metale kako bi –SH skupine bile slobodne.

Kao referentni standard korišten je reducirani glutation (GSH). Osnovna otopina GSH (1 mg/ml u 0,25 M NaCl) prirеđivana je uvijek neposredno prije analize te je do upotrebe držana na ledu. Otopina DTNB (0,43 M DTNB u 0,2 M NaH_2PO_4 puferu s dodatkom 2 M NaCl , pH=8) prirеđivana je također neposredno prije analize te do upotrebe držana u mraku na sobnoj temperaturi. Shema prirеđivanja standardnih otopina GSH i uzoraka dobivenih etanolnom precipitacijom u kojima je određivan sadržaj MT prikazana je u Tablici 1.

TABLICA 1. Priprema standarda GSH i uzoraka dobivenih etanolnom precipitacijom za određivanje sadržaja slobodnih –SH skupina pomoću Ellmanovog reagensa.

	Osnovna otopina GSH u 0,25 M NaCl (µl)	0,25M NaCl (µl)	1M HCl/ 4mM EDTA (µl)	DTNB (µl)
Standard				
2,5 µg GSH	2,5	32,5	35	1055
5 µg GSH	5	30	35	1055
10 µg GSH	10	25	35	1055
20 µg GSH	20	15	35	1055
25 µg GSH	25	10	35	1055
30 µg GSH	30	5	35	1055
Slijepa proba (0,25 M NaCl +1M HCl/4 mM EDTA)	-	35	35	1055
Uzorak	-	35	35	1055

Nakon dodavanja DTNB reagensa uzorci su promiješani na vrtložnoj miješalici, a potom centrifugirani 3 minute na 12 000 × g pri 20°C kako bi se uklonile neotopljene čestice. Bistri nadtalog preliven je u Eppendorf epruvete od 1,5 ml i inkubiran dvadeset minuta na sobnoj temperaturi. 200 µl uzorka/standarda prebačeno je u triplikatu u jažice mikroploče sa 96 jažica te je u fotometru izmjerena apsorbancija pri 412 nm. Iz kalibracijskog pravca (Slika 8) određene su masene koncentracije MT u analiziranim uzorcima.



SLIKA 8. Kalibracijski pravac prema kojem je određena koncentracija MT u gujavica. Prikazana je linearna ovisnost apsorbancije na 412 nm o koncentraciji –SH skupina primijenjenog standarda GSH nakon reakcije s DTNB.

3.2.4. RAZDVAJANJE CITOSOLNIH PROTEINA PREMA MOLEKULSKOJ MASI POMOĆU TEKUĆINSKE KROMATOGRAFIJE VISOKE DJELOTVORNOSTI UZ ISKLJUČENJE PO VELIČINI (SE-HPLC)

Kromatografija uz isključenje po veličini (SEC – *size exclusion chromatography*) omogućava razdvajanje molekula prema njihovoj veličini, odnosno radijusu, prolaženjem uzorka kroz kolonu punjenu netopljivim, jako hidratiziranim ugljikohidratnim polimerom u obliku kuglica koje djeluju kao molekulsko sito. Male molekule difundiraju kroz poroznu strukturu kuglica, pa se dulje zadržavaju putujući kroz kolonu u vodenoj otopini, unutar kuglica polimera i između njih, dok velike molekule prolaze kolonom brže, samo u otopini između kuglica polimera (Stryer, 1995). Tako velike molekule iznad gornje granice razdvajanja odabranog polimera izlaze prve u tzv. praznom volumenu, dok se ostale zadržavaju na koloni različito vrijeme ovisno o njihovoj molekulskoj masi. Rezultati kromatografije prikazuju se obično u obliku elucijskog dijagrama (kromatograma) koji pokazuje raspodjelu izmjerenih karakterističnih parametara (karakteristične apsorbancije, koncentracije metala itd.) u kromatografskim frakcijama u ovisnosti o vremenu eluiranja (t_e) ili elucijskom volumenu (V_e).

U ovom radu korišten je HPLC sustav Perkin Elmer, serija 200 (Slika 9; Perkin Elmer Inc., Norwalk, CT, SAD) koji se sastoji od rezervoara za otapala, kvaterarne visokotlačne pumpe, otplinjača, injekcijskog bloka s termostatiranim automatskim dodavačem uzoraka, termostatirane komore za kolone (pećnica), UV/VIS detektora s diodnim nizom koji omogućuje snimanje spektra eluiranih sastojaka u UV/VIS području (DAD detektor), te računala s programskim paketom TotalChrom (Perkin Elmer Inc.) za upravljanje sistemom i prikupljanje podataka.

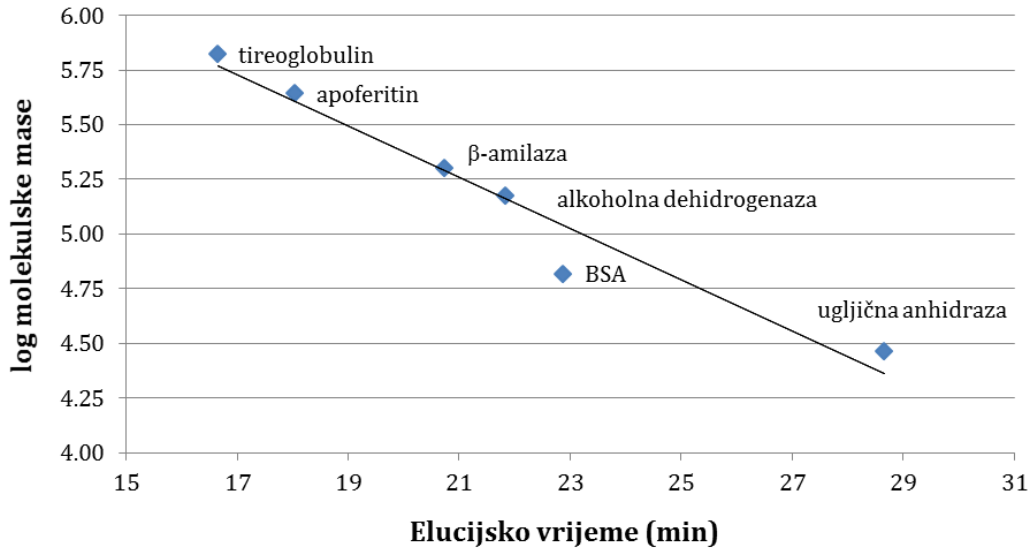


SLIKA 9. HPLC sustav Perkin Elmer, serija 200 sa kolonom Superdex™ 200 10/300 GL (GE Healthcare Biosciences).

Za razlučivanje uzoraka citosola korištena je kolona Superdex™ 200 10/300 GL (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, USA). Granica isključenja za globularne proteine kod ove kolone iznosi 1300 kDa, a optimalno područje razlučivanja je između 10 i 600 kDa. Na kolonu je nanošeno 100 µl uzorka, a uzorci su eluirani pomoću 20 mM Tris–HCl/Base (pH 8,1) uz protok od 0,5 ml/min i pri temperaturi 22^{o}C. Frakcije su sakupljane pomoću automatskog sakupljača frakcija Gilson FC 203B (Gilson, Middleton, WI, SAD) u intervalima od 1 minute, tako da je volumen frakcije iznosio ~ 0,5 mL. Frakcije su sakupljane od 13 do 53 minute i ukupno je sakupljeno 40 frakcija. Za svaki analizirani uzorak citosola napravljena su četiri uzastopna kromatografiranja kako bi se u svakoj

frakciji prikupila količina uzorka (~ 2 mL) dostatna za kasniju analizu metala na HR-ICP-MS-u. Nakon kromatografije, po 1910 µL uzorka iz svake frakcije prebačeno je u nove epruvete te potom zakiseljeno dodavanjem 30 µL 65% HNO_3 i 70 µL 30% HCl. Tako pripremljene frakcije pohranjene su do analize metala u hladnjaku na 4°C.

Osim razdvajanja molekula prema molekulskoj masi, kalibracijom kromatografskog stupca (kolone) s nizom proteina kojih je molekulska masa poznata (proteinski standardi) i nalazi se unutar područja razdvajanja polimera, SEC-om se mogu procijeniti približne molekulske mase razdvojenih komponenti. Pri tome se koristi svojstvo linearne ovisnosti logaritma molekulske mase komponente o vremenu eluiranja komponente s kolone (t_e) (Slika 10). Za određivanje praznog volumena kolone korišten je plavi dekstran (2 000 kDa), dok su za kalibraciju kolone upotrijebljeni slijedeći proteinski standardi: tireoglobulin (669 kDa), apoferitin (443 kDa), amilaza (200 kDa), alkoholna dehidrogenaza (150 kDa), albumin iz goveđeg seruma - BSA (66 kDa) i ugljična anhidraza (29 kDa). Standardi su kromatografirani pojedinačno, a elucijsko vrijeme (t_e) standarda definirano je prema položaju vrha maksimuma apsorbancije na 280 nm. Za određivanje pozicije eluiranja metalotioneina (MT) korišten je MT standard iz zečje jetre Zn-MT95 (Ikzus), a njegova elucijska pozicija je određena prema položaju vrha apsorbancije na 254 nm koja je karakteristična za Cd-SH vezu.



SLIKA 10. Kalibracijski pravac prema kojem je izračunata približna molekulska masa liganda koji vežu metale u citosolu tkiva gujavica. Prikazana je linearna ovisnost elucijskog volumena o logaritmu molekulske mase primjenjenih proteinskih standarda.

3.2.5. ODREĐIVANJE KONCENTRACIJE METALA

Koncentracije metala određene su u uzorcima citosola i taloga te u kromatografskim frakcijama dobivenim razlučivanjem uzoraka citosola pomoću SE-HPLC.

Za određivanje metala u kromatografskim frakcijama, frakcije su odmah nakon kromatografiranja zakiseljene dodavanjem 1,5% v/v 65% HNO_3 i 3,5% v/v 30% HCl, a neposredno prije same analize u svaku frakciju je kao interni standard dodan indij u koncentraciji 1 μg/L.

Uzorke taloga i citosola prije određivanja metala bilo je potrebno razoriti. Razaranje uzoraka provedeno je primjenom smjese otopina koncentrirane 65% HNO_3, H_2O_2 i 30% HCl u omjeru 6:1:1 (v/v) i zagrijavanjem u sušioniku. Uzorci su razgrađivani u duplikatu, a uz svaki set uzoraka za razgradnju bili su također uključeni slijepa proba i certificirani referentni uzorak za provjeru točnosti određivanje metala u tkivima. Kod razgradnje taloga, u teflonske posudice odvagano je 50-70 mg taloga odnosno referentnog uzorka, a zatim je u svaki uzorak, referentni uzorak i slijepu probu dodano 1,5 mL 65% HNO_3 i 0.25 mL 30% H_2O_2 te je otopina ostavljena na sobnoj temperaturi tijekom 24 sata. Nakon toga u sve posudice je dodano 0,25 mL 30% HCl i uzorci su dalje razgrađivani u sušioniku na 85^oC tijekom 3 sata. Za razgradnju citosola, u teflonske posudice je na 0,4 mL uzorka citosola dodano 0,3 mL koncentrirane HNO_3 i 0,05 mL H_2O_2. Posudice su ostavljene na sobnoj temperaturi tijekom 24 sata, a potom su, nakon dodavanja 0,05 mL 30% HCl uzorci dalje razgrađivani u sušioniku na 85^oC tijekom 3 sata. Nakon hlađenja su dobiveni digestati taloga razrijeđeni Milli-Q vodom 20 puta, dok su digestati citosola razrijeđeni 10 puta. Razrijeđeni digestati su naknadno još dodatno zakiseljeni s HCl, tako da je konačni udio HCl u uzorku za mjerenje na ICP-MS iznosio 1,5% v/v. Dodavanje HCl kod razaranja uzoraka je neophodno radi stabilizacije srebra u otopini. Za provjeru točnosti metode korišten je certificirani referentni uzorak DOLT-3 (Dogfish Liver Certified Reference Materijal for Trace Metals, National Research Council, Kanada). Usporedba izmjerenih i certificiranih udjela metala u referentnom uzorku ukazuje na dosta visoku efikasnost primjenjene metode. Iskorištenje metode (eng. *recovery*) za analizirane elemente kretalo se u rasponu 80-100%, a za Ag je iznosilo 93%.

Mjerenje metala izvedena su na masenom spektrometru visokog razlučivanja s induktivno spregnutom plazmom (HR ICP-MS) Element 2 (Thermo Finnigan, Bremen, Njemačka) prikazanom na Slici 11. Za uvođenje uzorka u instrument korišten je

automatski dodavač uzoraka ASX 510 (CETAC, SAD). Mjerenje ^{82}Se, ^{95}Mo, ^{109}Ag i ^{111}Cd je provedeno korištenjem niske rezolucije, dok su ^{55}Mn, ^{56}Fe, ^{59}Co, ^{63}Cu i ^{66}Zn mjereni u visokoj rezoluciji. Koncentracija metala određena je primjenom standardnog kalibracijskog postupka. Standardne otopine metala pripremljene su odgovarajućim razrijeđenima iz multielementnih standardnih otopina za metale u tragovima (100 mg/L, Analitika, Republika Češka). Sve otopine za kalibraciju pripremane su u 2% HNO_3 (Suprapur, Merck, Njemačka) uz dodatak indija (1 µg/L) kao internog standarda. Indij (1 µg/L) je također neposredno prije mjerenja dodan u sve uzorke i slijepu probu. Za provjeru točnosti mjerenja mikroelemenata na HR ICP-MS korišten je referentni QC (eng. *quality control*) uzorak za metale u tragovima UNEP GEMS/Water PE Study No. 7.



SLIKA 11. Maseni spektrometar visokog razlučivanja s induktivno spregnutom plazmom (HR ICP-MS) (Thermo Finnigan, Bremen, Njemačka) povezan sa automatskim dodavačem uzorka ASX 510 (CETAC, SAD).

3.2.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

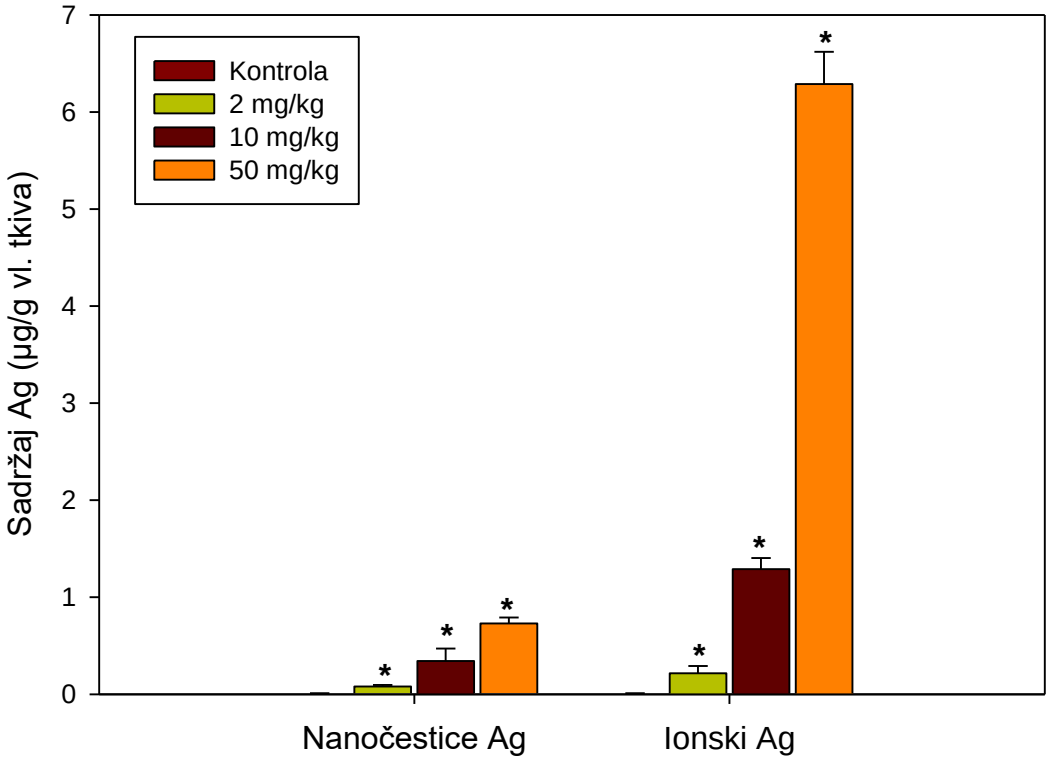
Rezultati pokusa obrađeni su opisnim statističkim metodama (aritmetička sredina ± SD), te prikazani slikovno ili u tablicama. Za usporedbu skupina korišten je Studentov t-test za nezavisne uzorke. Izrada grafova i statistička analiza podataka provedeni su u računalnim programima SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc.) i Statistica 8.0 (StatSoft Inc.). Statistički značajna razlika uzeta je na razini 95%-tne vjerojatnosti ($p<0,05$).

4 REZULTATI

4.1 SADRŽAJ SREBRA U TKIVU *E. fetida* NAKON IZLAGANJA IONSKOM SREBRU I NANOČESTICAMA SREBRA

Sadržaj srebra u tkivu kontrolnih gujavica i gujavica koje su bile izložene rastućim koncentracijama (2, 10 i 50 mg/kg zemlje) nanočestica srebra i ionskog srebra u zemlji tijekom 10 dana prikazan je na Slici 12.

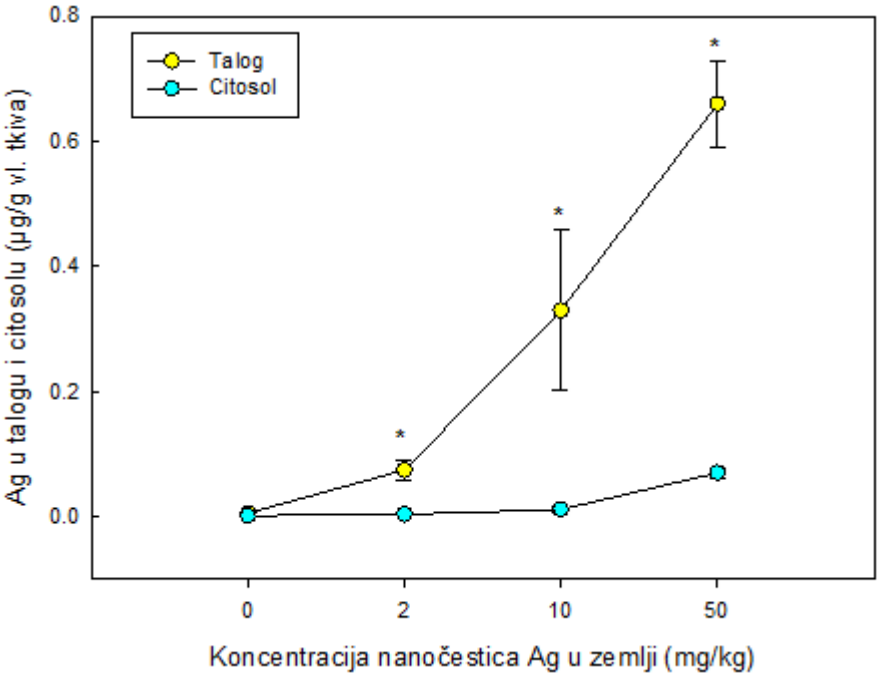
Kod oba oblika srebra generalno dolazi do povećanja akumulacije s povećanjem koncentracije metala u zemlji. Međutim, gujavice koje su bile izložene ionskom srebru akumulirale su značajno više koncentracije metala od gujavica izloženih nanočesticama srebra. Gujavice izložene 2, 10 i 50 mg/kg ionskog srebra akumulirale su redom 2,8, 3,8 i 8,8 puta više srebra od gujavica izloženih nanočesticama srebra.



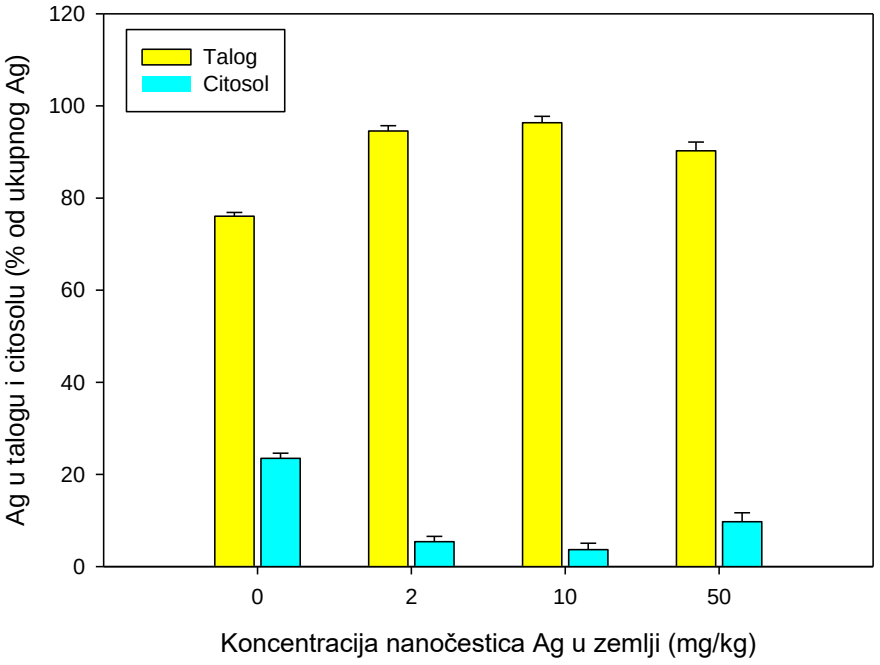
SLIKA 12. Sadržaj srebra u tkivu gujavica *E. fetida* izloženih nanočesticama srebra odnosno ionskom srebru u koncentraciji od 2, 10 i 50 mg/kg zemlje u laboratoriju tijekom 10 dana. Prikazane su srednje vrijednosti sa S.D. za tri kompozitna uzorka. Zvjezdica označava značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p<0,05$, t-test).

4.2 RASPODJELA SREBRA IZMEĐU NETOPLJIVE (TALOG) I VODOTOPLJIVE (CITOSOL) FRAKCIJE TKIVA GUJAVICA

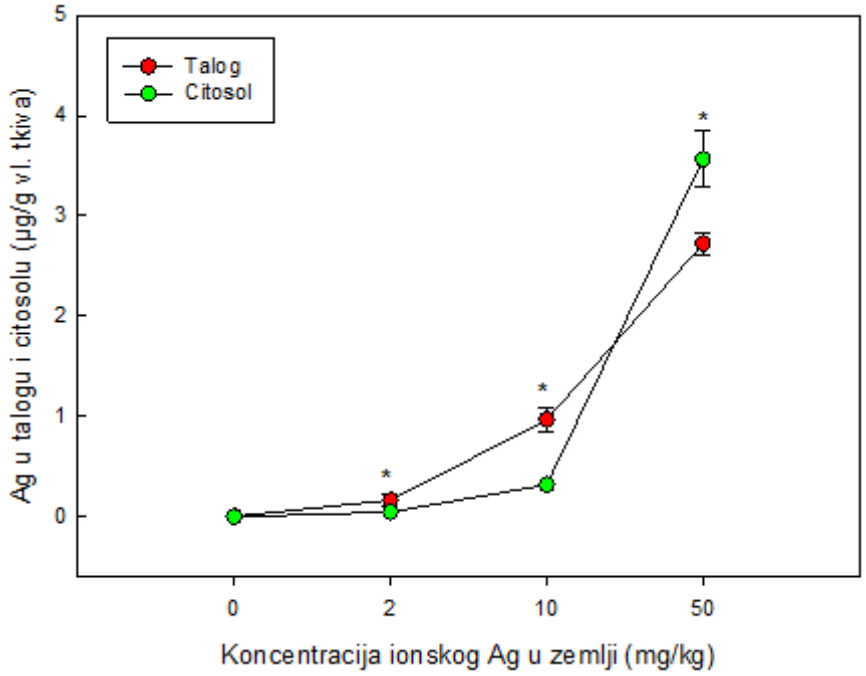
Raspodjela srebra između taloga i citosolne frakcije (supernatanta) tkiva nakon izlaganja gujavica različitim koncentracijama nanočestica odnosno ionskog srebra prikazana je redom na Slikama 13a i 13b te 14a i 14b. Kod kontrolnih je organizama gotovo 80% ukupnog srebra bilo vezano u talogu kao netopljiva frakcija tkiva. Ostatak od oko 20% bio je vezan na topljive bioligande u citosolu tkiva. Izlaganje nanočesticama srebra kao i ionskom srebru dovelo je do linearnog nakupljanja srebra u obje frakcije (Slika 13a i 14a). Međutim, raspodjela srebra između tih frakcija tkiva razlikovala se između dva ispitivana oblika srebra (Slika 13b i 14b). Izlaganje nanočesticama srebra dovelo je do značajnog porasta postotka srebra vezanog u talogu u usporedbi s kontrolnim organizmima (Slika 13b) što je posebno naglašeno kod gujavica izloženih 2 i 10 mg/kg nanočestica srebra kod kojih je oko 95% vezanog srebra u talogu. Kod gujavica izloženih najvišoj koncentraciji nanočestica srebra također dolazi do značajnog porasta koncentracije srebra u talogu u usporedbi s kontrolom. U toj grupi dolazi i do malog, ali značajnog smanjenja postotka srebra u talogu s istodobnim porastom u postotku srebra u citosolnoj frakciji (Slika 13b). Izlaganje ionskom srebru nije značajno utjecalo na distribuciju srebra između taloga i citosola kod najniže (2 mg/kg) i srednje (10 mg/kg) koncentracije izlaganja. Značajne promjene u subcelularnoj raspodjeli srebra primijećene su kod najviše koncentracije (Slika 14b). U toj je skupini za razliku od nižih koncentracija izlaganja te kontrole veći dio nakupljenog srebra (57%) bio vezan u citosolnoj frakciji.



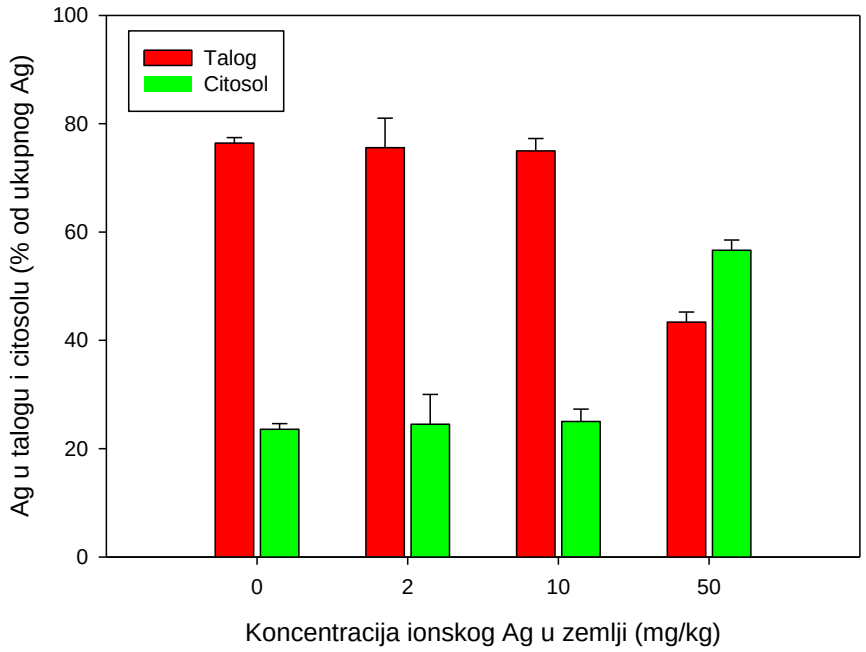
SLIKA 13a. Sadržaj srebra u netopljivoj (talog) i vodotopljivoj (citosol) frakciji tkiva gujavica *E. fetida* izloženih nanočesticama srebra izražen po mokroj masi tkiva. Prikazane su srednje vrijednosti sa S.D. za tri kompozitna uzorka. Zvjezdica označava značajnu razliku u sadržaju srebra između taloga i citosola ($p<0,05$, t-test).



SLIKA 13b. Sadržaj srebra u netopljivoj (talog) i vodotopljivoj (citosol) frakciji tkiva gujavica *E. fetida* izloženih nanočesticama srebra izražen kao postotni udio u ukupnom tkivnom srebru. Prikazane su srednje vrijednosti sa S.D. za tri kompozitna uzorka.



SLIKA 14a. Sadržaj srebra u netopljivoj (talog) i vodotopljivoj (citosol) frakciji tkiva gujavica *E. fetida* izloženih ionskom srebru izražen po mokroj masi tkiva. Prikazane su srednje vrijednosti sa S.D. za tri kompozitna uzorka. Zvjezdica označava značajnu razliku u sadržaju srebra između taloga i citosola ($p<0,05$, t-test)



SLIKA 14b. Sadržaj srebra u netopljivoj (talog) i vodotopljivoj (citosol) frakciji tkiva gujavica *E. fetida* izloženih ionskom srebru izražen kao postotni udio u ukupnom tkivnom srebru. Prikazane su srednje vrijednosti sa S.D. za tri kompozitna uzorka.

4.3 UKUPNE KONCENTRACIJE I RASPODJELA ODABRANIH ESENCIJALNIH ELEMENATA I Cd IZMEĐU TALOGA I CITOSOLNE FRAKCIJE

U Tablici 2 prikazan je sadržaj odabranih esencijalnih mikroelemenata (Cu, Zn, Mn, Fe, Co, Mo i Se) te neesencijalnog elementa Cd u ukupnom tkivu te njihova raspodjela između taloga i citosolne frakcije tkiva gujavica. Sadržaj u talogu i citosolu je naveden kao μg/g vlažnog tkiva te kao postotak ukupnog sadržaja pojedinog elementa u tkivu.

Jednosmjernim ANOVA testom uspoređen je sadržaj te postotna raspodjela uzoraka netretiranih gujavica s uzorcima gujavica izloženim 2, 10 i 50 mg/kg nanočestica srebra te ionskog srebra (N = 4 za kontrolne, N = 3 za tretirane uzorke).

Nema značajne razlike u raspodjeli kadmija, bakra, cinka, mangana ni selena između taloga i citosolne frakcije tkiva neizloženih (kontrolnih) gujavica te gujavica izloženih nanočesticama srebra odnosno ionskom srebru. Također ne dolazi do značajnih promjena u ukupnim vrijednostima sadržaja tih elemenata između tkiva kontrolnih gujavica i tkiva gujavica izloženih nanočesticama odnosno ionskom srebru.

U odnosu na uzorke tkiva kontrolnih gujavica kod uzorka tkiva gujavica izloženih svim koncentracijama nanočestica i ionskog srebra postotak željeza značajno je viši u talogu, a niži u citosolnoj frakciji tkiva. Kada se promatraju ukupne vrijednosti, u odnosu na kontrolu značajno je povećan sadržaj željeza u uzorcima tkiva gujavica izloženim najnižim (2 mg/kg) i srednjim (10 mg/kg) koncentracijama nanočestica srebra, ali nema značajne razlike između kontrolnih uzoraka i uzoraka izloženih najvišoj (50 mg/kg) koncentraciji nanočestica srebra. Kod izlaganja ionskom srebru značajno se povećava ukupan sadržaj željeza u tkivima gujavica izloženih najnižoj koncentraciji, no nema značajnih promjena u ukupnom sadržaju kod izlaganja višim koncentracijama.

Ne postoji značajna razlika u raspodjeli sadržaja kobalta između taloga i citosolne frakcije tkiva kontrolnih gujavica i tkiva gujavica izloženih bilo kojim koncentracijama nanočestica srebra kao ni ionskog srebra. Međutim, izlaganje nanočesticama srebra u svim koncentracijama, kao i izlaganje ionskom srebru kod najviše koncentracije značajno smanjuje ukupan sadržaj kobalta u tkivima u odnosu na tkiva kontrolnih gujavica. Kod niže i srednje koncentracije izlaganja ionskom srebru ne dolazi do te promjene.

Izlaganje gujavica nanočesticama srebra ne mijenja značajno raspodjelu molibdena između taloga i citosola u odnosu na kontrolne uzorke, no kada se promatra ukupan sadržaj izlaganje gujavica svim koncentracijama nanočestica srebra značajno povećava sadržaj molibdena u njihovim tkivima u odnosu na neizložene gujavice. Izlaganje ionskom srebru dovodi do značajnog rasta sadržaja molibdena u talogu (a pada u citosolu) kod gujavica izloženih najnižoj i srednjoj koncentraciji. Izlaganje najvišoj koncentraciji ionskog srebra ne dovodi do značajne razlike u raspodjeli molibdena. Kod svih gujavica izloženih ionskom srebru bez obzira na koncentraciju dolazi do značajnog rasta ukupnog sadržaja molibdena u tkivima u odnosu na neizložene gujavice.

TABLICA 2. Sadržaj Cd, Cu, Zn, Mn, Fe, Co, Mo i Se (μg/g vlažnog tkiva) u ukupnom tkivu, te u talogu i citosolnoj frakciji tkiva *E. fetida* (srednja vrijednost ± S. D.). U zagradama su navedeni sadržaji metala u talogu i citosolu izraženi kao postoci ukupnog sadržaja pojedinog elementa u tkivu. Zvjezdica označava značajnu razliku u sadržaju elementa između tretiranog uzorka i odgovarajuće kontrole ($p<0,05$, jednosmjerni ANOVA test).

Sadržaj metala (μg/g vl. tkiva)						
	Izlaganje nanočesticama srebra			Izlaganje ionskom srebru		
Grupe	Tkivo	Talog	Citosol	Tkivo	Talog	Citosol
Cd						
Kontrola	0.223±0.045	0.022±0.003 (10±1)	0.200±0.043 (90±1)	0.223±0.045	0.022±0.003 (10±1)	0.200±0.043 (90±1)
2 mg/kg	0.211±0.046	0.021±0.003 (10±1)	0.190±0.043 (90±1)	0.221±0.044	0.024±0.001 (11±2)	0.197±0.044 (89±2)
10 mg/kg	0.250±0.067	0.027±0.005 (11±1)	0.224±0.061 (89±1)	0.236±0.029	0.025±0.003 (10±1)	0.211±0.026 (90±1)
50 mg/kg	0.234±0.023	0.025±0.006 (11±1)	0.209±0.018 (89±1)	0.225±0.073	0.024±0.009 (11±2)	0.200±0.065 (89±2)
Cu						
Kontrola	1.39±0.23	0.80±0.21 (57±6)	0.59±0.06 (43±6)	1.39±0.23	0.80±0.21 (57±6)	0.59±0.06 (43±6)
2 mg/kg	1.43±0.12	0.83±0.11 (58±3)	0.60±0.03 (42±3)	1.65±0.23	1.09±0.16 (65±6)	0.59±0.12 (35±6)
10 mg/kg	1.54±0.14	0.92±0.13 (60±4)	0.61±0.05 (40±4)	1.59±0.19	1.05±0.23 (64±4)	0.59±0.12 (36±4)
50 mg/kg	1.47±0.11	0.84±0.05 (59±3)	0.59±0.07 (41±3)	1.43±0.13	0.87±0.06 (62±3)	0.54±0.07 (38±3)
Zn						
Kontrola	21.42±1.76	12.93±1.03 (60±2)	8.49±0.90 (40±2)	21.42±1.76	12.93±1.03 (60±2)	8.49±0.90 (40±2)
2 mg/kg	20.64±1.79	12.12±0.79 (59±2)	8.52±1.07 (41±2)	22.53±2.46	13.96±2.87 (62±6)	8.57±0.54 (38±6)
10 mg/kg	22.94±1.69	14.36±0.79 (63±2)	8.58±0.96 (37±2)	21.25±0.39	13.43±0.40 (63±1)	7.82±0.25 (37±1)
50 mg/kg	22.86±2.08	14.60±2.35 (64±4)	8.26±0.38 (36±4)	24.29±2.60	16.03±1.90 (66±3)	8.26±1.03 (34±3)
Mn						
Kontrola	2.23±0.50	1.77±0.49 (78±5)	0.47±0.05 (22±5)	2.23±0.50	1.77±0.49 (78±5)	0.47±0.05 (22±5)
2 mg/kg	2.50±0.26	2.03±0.23 (81±3)	0.47±0.08 (19±3)	2.50±0.63	2.05±0.48 (82±3)	0.45±0.17 (18±3)
10 mg/kg	2.62±0.51	2.19±0.51 (83±3)	0.43±0.03 (17±2)	2.39±0.41	1.96±0.34 (82±2)	0.44±0.08 (18±2)
50 mg/kg	2.23±0.15	1.86±0.13 (84±2)	0.37±0.06 (16±1)	1.63±0.25	1.31±0.21 (81±3)	0.31±0.06 (19±3)

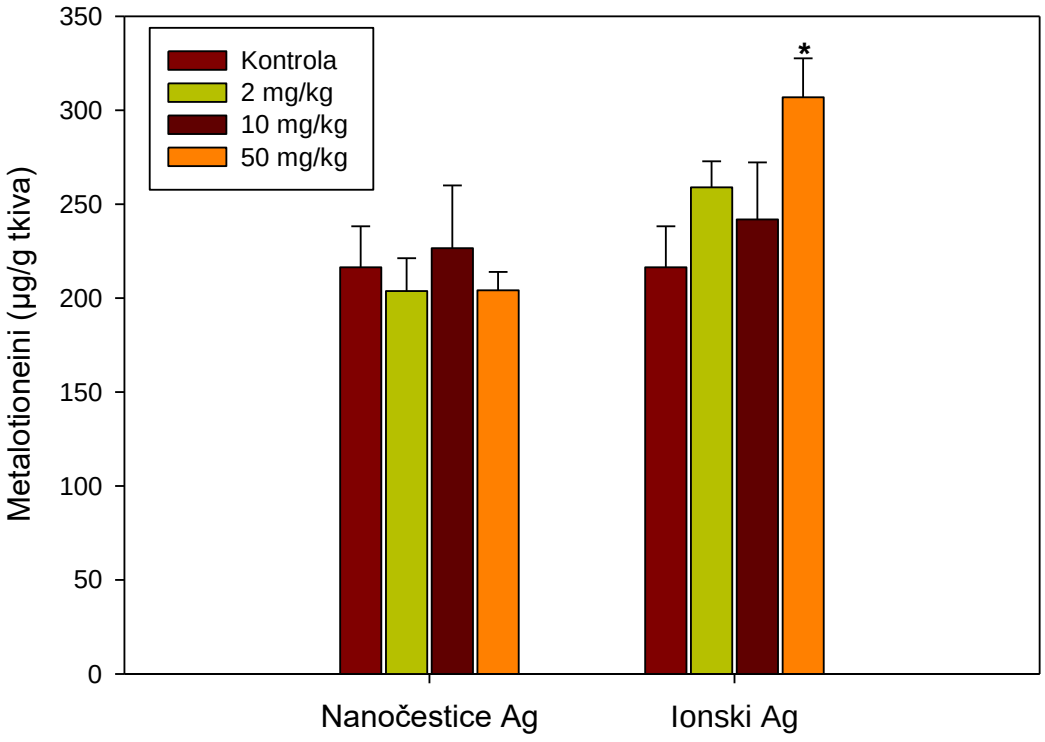
Nastavak tablice 2

Fe						
Kontrola	48.7±6.4	37.3±7.3 (76±6)	11.4±2.1 (24±6)	48.7±6.4	37.3±7.3 (76±6)	11.4±2.1 (24±6)
2 mg/kg	96.1±17.1*	85.0±18.8 (88±4)*	11.1±1.8 (12±4)*	82.3±20.6*	72.2±20.5 (87±5)*	10.2±2.6 (13±5)*
10 mg/kg	110.4±21.6*	97.2±23.7 (88±4)*	13.1±2.5 (12±4)*	66.4±6.1	55.8±5.6 (84±3)*	10.6±1.9 (16±3)*
50 mg/kg	68.2±9.3	59.7±10.2 (87±3)*	8.5±1.2 (13±3)*	59.8±3.1	48.3±1.9 (81±1)*	11.6±1.2 (19±1)*
Co						
Kontrola	0.577±0.030	0.305±0.040 (53±8)	0.273±0.041 (47±8)	0.577±0.030	0.305±0.040 (53±8)	0.273±0.051 (47±8)
2 mg/kg	0.413±0.042*	0.221±0.060 (53±9)	0.192±0.019 (47±9)	0.592±0.041	0.350±0.049 (59±6)	0.242±0.029 (41±6)
10 mg/kg	0.440±0.043*	0.241±0.054 (54±7)	0.199±0.020 (46±7)	0.565±0.063	0.327±0.068(57±6)	0.238±0.016 (43±6)
50 mg/kg	0.421±0.047*	0.236±0.053 (56±6)	0.185±0.014 (44±6)	0.425±0.077*	0.216±0.047(52±2)	0.197±0.048 (48±2)
Mo						
Kontrola	0.113±0.007	0.067±0.005 (59±2)	0.047±0.004 (41±2)	0.113±0.007	0.067±0.005 (59±2)	0.047±0.004 (41±2)
2 mg/kg	0.133±0.010*	0.083±0.007 (63±2)	0.049±0.004 (37±2)	0.144±0.009*	0.099±0.009 (68±3)*	0.046±0.004 (32±3)*
10 mg/kg	0.145±0.006*	0.094±0.011 (65±5)	0.051±0.005 (35±5)	0.137±0.007*	0.090±0.008 (66±4)*	0.047±0.005 (34±4)*
50 mg/kg	0.136±0.005*	0.085±0.004 (62±3)	0.051±0.004 (38±3)	0.136±0.015*	0.088±0.008 (65±3)	0.048±0.008 (35±3)
Se						
Kontrola	0.150±0.014	0.074±0.006 (49±1)	0.076±0.007 (51±1)	0.150±0.014	0.074±0.006 (49±1)	0.076±0.007(51±1)
2 mg/kg	0.158±0.010	0.084±0.009 (53±3)	0.074±0.001 (47±3)	0.169±0.030	0.089±0.017 (52±1)	0.081±0.013 (48±1)
10 mg/kg	0.218±0.056	0.121±0.042 (55±5)	0.097±0.014 (45±5)	0.165±0.008	0.088±0.003 (54±1)	0.077±0.005 (46±2)
50 mg/kg	0.132±0.006	0.064±0.005 (48±2)	0.068±0.001 (52±2)	0.164±0.085	0.076±0.041 (46±1)	0.088±0.045 (54±1)

4.4 SADRŽAJ METALOTIONEINA

Sadržaj metalotioneina u tkivu kontrolnih gujavica i gujavica koje su bile izložene rastućim koncentracijama (2, 10 i 50 mg/kg zemlje) nanočestica srebra i ionskog srebra u zemlji tijekom 10 dana prikazan je na Slici 15.

Ne postoji značajna razlika između sadržaja metalotioneina u tkivu kontrolnih gujavica i gujavica izloženih bilo kojim koncentracijama nanočestica srebra. Značajan porast koncentracije metalotioneina u odnosu na kontrolu zabilježen je samo kod izlaganja najvišoj koncentraciji (50 mg/kg) ionskog srebra.



SLIKA 15. Sadržaj metalotioneina u tkivu gujavica *E. fetida* izloženih nanočesticama srebra odnosno ionskog srebra u koncentraciji od 2, 10 i 50 mg/kg zemlje u laboratoriju tijekom 10 dana. Prikazane su srednje vrijednosti sa S.D. za četiri kompozitna uzorka. Zvjezdica označava značajnu razliku u odnosu na kontrolu ($p<0,05$, t-test).

4.5 RASPODJELA SREBRA IZMEĐU CITOSOLNIH SPOJEVA RAZLIČITIH MOLEKULSKIH MASA

Raspodjela srebra između citosolnih spojeva (proteini, peptidi i druge biomolekule) različitih molekulskih masa uzorka kontrolnih gujavica te uzoraka gujavica izloženih rastućim koncentracijama nanočestica srebra odnosno ionskog srebra tijekom 10 dana prikazani su na kromatogramima na Slikama 16a i 16b.

Na kromatografskim profilima razlučenih citosola može se prema molekulskim masama maksimuma metala ugrubo definirati šest kategorija spojeva koji vežu metale (Slika 16a i 16b):

1. Kategorija VVMM spojeva – obuhvaća elucijsko područje s maksimumima metala u regiji proteina vrlo visoke molekulske mase (> 400 kDa) i elucijskim vremenom (t_e) 13-18 min
2. Kategorija VMM spojeva – obuhvaća elucijsko područje s maksimumima metala u regiji proteina visoke molekulske mase (100-400 kDa) i elucijskim vremenom (t_e) 19-23 min
3. Kategorija SMM spojeva – obuhvaća elucijsko područje s maksimumima metala u regiji proteina srednje molekulske mase (30-100 kDa) i elucijskim vremenom (t_e) 24-28 min
4. Kategorija NMM-MT spojeva – obuhvaća područje s maksimumima metala u području eluiranja MT standarda (9-20 kDa) i elucijskim vremenom (t_e) 29-32 min
5. Kategorija NMM spojeva – obuhvaća elucijsko područje s maksimumima metala u regiji proteina niske molekulske mase (3-9 kDa) i elucijskim vremenom (t_e) 33-36 min
6. Kategorija VNMM spojeva – obuhvaća elucijsko područje s maksimumima metala u regiji proteina vrlo niske molekulske mase (< 3 kDa) i elucijskim vremenom (t_e) > 36 min

Postotni udjeli srebra u pojedinim citosolnim kategorijama (VVMM, VMM, SMM, NMM-MT, NMM i VNMM) u ukupnom sadržaju srebra eluiranog u svim citosolnim frakcijama uzorka kontrolnih gujavica i uzoraka gujavica izloženih nanočesticama srebra odnosno ionskog srebra prikazani su u Tablici 3.

Uspoređene su elucijske pozicije i sadržaj srebra u maksimumima metala (Slika 16a i 16b) te postotni udjeli srebra u citosolnim kategorijama VVMM, VMM, SMM, NMM-MT, NMM i VNMM uzoraka kontrolnih gujavica s uzorcima gujavica izloženih nanočesticama srebra odnosno ionskom srebru (Tablica 3).

Na kromatogramu uzorka kontrolnih gujavica zbog niske koncentracije srebra u citosolu ne uočavaju se jasno izraženi maksimumi metala (Slika 16a), no zbrajanjem sadržaja srebra u citosolnim frakcijama unutar pojedinih citosolnih kategorija uočava se da je najveći dio citosolnog srebra (oko 40 %) bio vezan uz frakcije koje eluiraju u području SMM proteina, dok je samo mali dio srebra bio vezan uz frakcije koje odgovaraju elucijskom području metalotioneina.

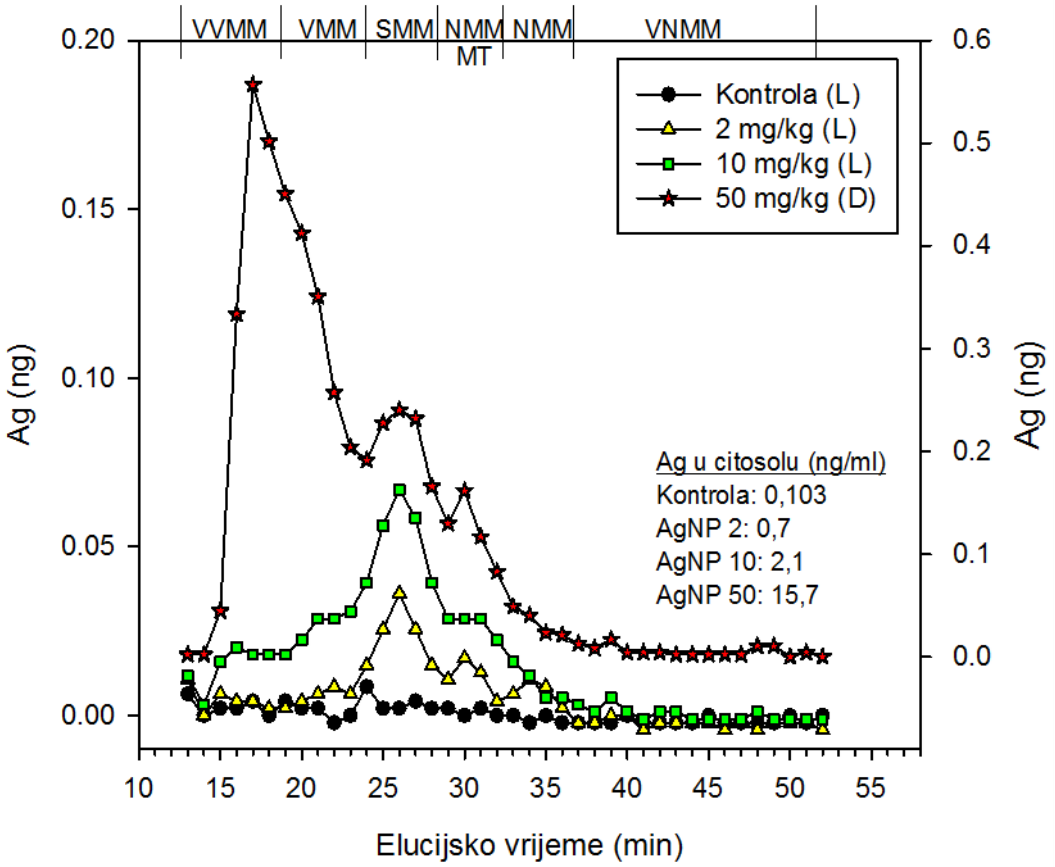
Izlaganje gujavica nanočesticama srebra rezultiralo je pojavom vidljivih maksimuma metala na kromatogramu. Maksimumi u elucijskom području spojeva VVMM i VMM kategorija međusobno se djelomično preklapaju kod svih koncentracija izlaganja (korištenom kolonom nije ih moguće razlučiti). Kod najviše koncentracije izlaganja (50 mg/kg) najveći dio citosolnog srebra vezan je za proteine u ovim kategorijama (ukupno oko 55%). Primijećeno je kako porastom koncentracije srebra u citosolu dolazi do većeg uključivanja proteina VMM kategorije u vezanje srebra - pri koncentraciji izlaganja od 2 mg/kg vežu oko 11% ukupnog, kod koncentracije izlaganja od 10 mg/kg taj postotak iznosi oko 21%, dok kod koncentracije od 50 mg/kg iznosi oko 34%.

U SMM kategoriji proteina jasno su vidljivi maksimumi kod svih koncentracija izlaganja. Za nižu i srednju koncentraciju izlaganja najveći dio srebra vezan je za proteine u toj kategoriji (redom 48% i 42%).

Kod svih koncentracija izlaganja nanočesticama srebra vidljiv je maksimum u elucijskom području spojeva NMM-MT kategorije. Kod najniže koncentracije izlaganja oko 18% citosolnog srebra vezano je na spojeve u toj kategoriji, kod srednje koncentracije oko 17%, a kod najviše koncentracije oko 10%.

Maksimum kategorije NMM spojeva jasno je istaknut samo kod najniže koncentracije izlaganja kod koje je oko 11% citosolnog srebra vezano na proteine iz te kategorije.

U području maksimuma kategorije VNMM spojeva nema jasno izraženih maksimuma te je vezan vrlo mali dio citosolnog srebra.



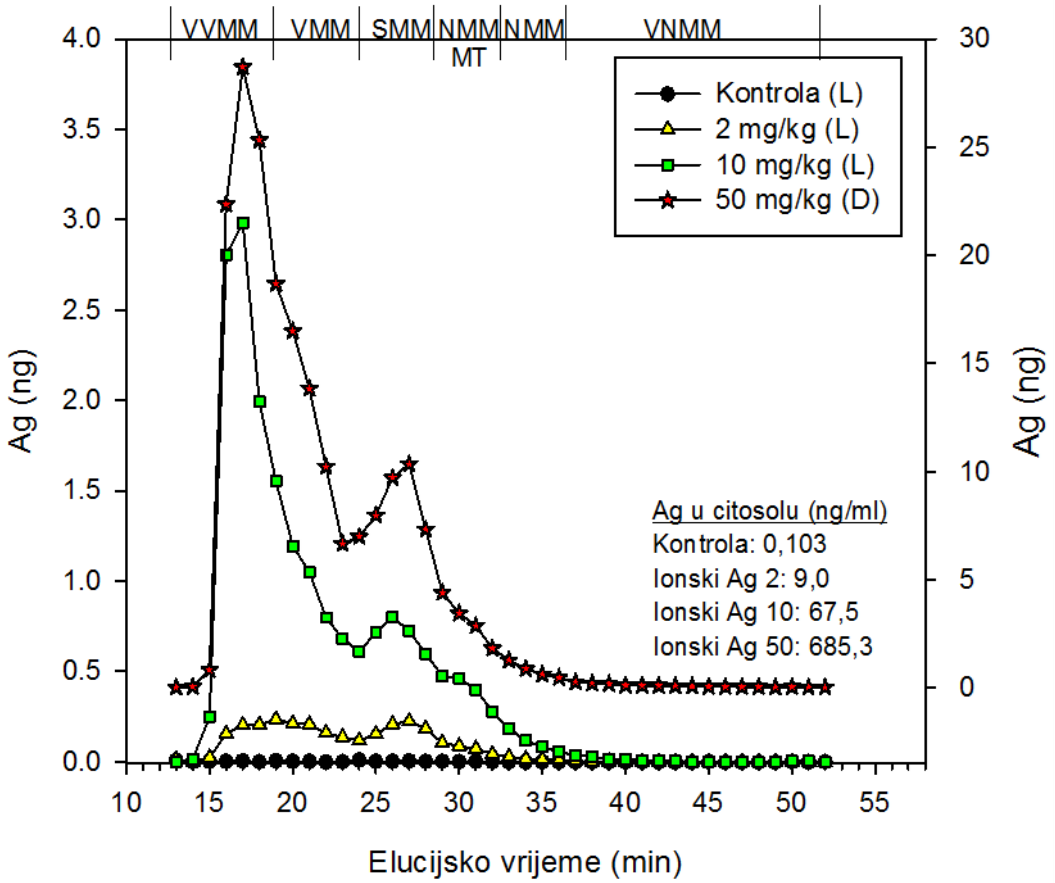
SLIKA 16a. Kromatografski profili raspodjele srebra između citosolnih frakcija različitih molekulskih masa iz citosola kontrolnih gujavica i citosola gujavica izloženih nanočesticama srebra (AgNP) u koncentracijama 2, 10 i 50 mg/kg, razdvojenih tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz isključenje po veličini na koloni Superdex™ 200 10/300 GL. Na slici su navedene koncentracije Ag u citosolu te su označena elucijska područja proteinskih kategorija VVMM, VMM, SMM, NMM-MT, NMM i VNMM.

U citosolu jedinki izloženim ionskom srebru izmjerene su koncentracije srebra koje su oko jednog reda veličine više nego koncentracije srebra u citosolu jedinki gujavica izloženih nanočesticama srebra (točne koncentracije prikazane su u okviru na kromatogramima). Kao i kod izlaganja nanočesticama, elucijski maksimumi VVMM i VMM proteinskih kategorija nisu jasno odijeljeni (Slika 16b). No, za razliku od izlaganja nanočesticama, kod izlaganja ionskom srebru nije primijećen porast uključivanja proteina VMM kategorije u vezanju srebra proporcionalan porastu koncentracije srebra u citosolu. Na proteinima kategorija VVMM i VMM vezan je najveći dio citosolnog srebra kod svih koncentracija izlaganja.

Na kromatogramu su jasno vidljivi maksimumi u području SMM kategorije proteina kod svih koncentracija izlaganja. Kod koncentracije izlaganja od 2 mg/kg udio sadržaja citosolnog srebra eluiranog u području SMM proteina (oko 32%) samo je malo manji od udjela srebra eluiranog s proteinima iz VMM područja (oko 34%), za razliku od ostale dvije koncentracije izlaganja gdje taj udio iznosi oko 18% (10 mg/kg) i 21% (50 mg/kg).

U elucijskom području NMM-MT spojeva na kromatogramu su vidljiva mala preklapanja sa maksimumima u susjednom elucijskom području SMM proteina (tzv. rame). Kod najniže koncentracije izlaganja u tom elucijskom području vezano je oko 11% ukupnog citosolnog srebra dok porastom koncentracije izlaganja taj postotak pada. Tako je kod izlaganja od 10 mg/kg ionskog srebra u tom elucijskom području vezano 8,5%, a kod najviše koncentracije izlaganja oko 6% ukupnog srebra iz citosola.

U ostalim elucijskim područjima (NMM i VNMM kategoriji spojeva) nisu vidljivi maksimumi te je u spojevima koji eluiraju u tim područjima vezan vrlo mali udio ukupnog citosolnog srebra.



SLIKA 16b. Kromatografski profili raspodjele srebra između citosolnih frakcija različitih molekulskih masa iz citosola kontrolnih gujavica i citosola gujavica izloženih ionskom srebru u koncentracijama 2, 10 i 50 mg/kg, razdvojenih tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz isključenje po veličini na koloni Superdex™ 200 10/300 GL. Na slici su navedene koncentracije Ag u citosolu te su označena elucijska područja proteinskih kategorija VVMM, VMM, SMM, NMM-MT, NMM i VNMM.

TABLICA 3. Sadržaj srebra vezanog u frakcijama pojedinih proteinskih kategorija (VVMM, VMM, SMM, NMM-MT, NMM i VNMM) izražen u postotku ukupnog sadržaja srebra eluiranog u svim citosolnim frakcijama. Kromatografski profili analiziranih citosola prikazani su na Slici 16a i 16b.

	Sadržaj Ag u proteinskim kategorijama[a] (%)					
	Izlaganje nanočesticama srebra					
	VVMM	VMM	SMM	NMM-MT	NMM	VNMM
Kontrola	31,8	18,2	40,9	9,1	—	—
2 mg/kg	11,3	11,3	47,8	18,3	11,3	—
10 mg/kg	14,0	20,6	41,8	17,4	6,1	2,2
50 mg/kg	29,5	34,3	21,6	10,1	2,7	1,8
	Izlaganje ionskom srebru					
	VVMM	VMM	SMM	NMM-MT	NMM	VNMM
Kontrola	31,8	18,2	40,9	9,1	—	—
2 mg/kg	21,2	33,8	31,5	10,9	2,3	0,2
10 mg/kg	42,5	27,9	18,2	8,5	2,3	0,6
50 mg/kg	38,1	32,5	20,9	6,2	1,6	0,7

[a] opis proteinskih kategorija pogledati na str. 37 u potpoglavlju 4.5

4.6 RASPODJELA ODABRANIH ESENCIJALNIH ELEMENATA I CD IZMEĐU CITOSOLNIH LIGANDA

Na kromatogramima na Slikama 17a i 17b prikazana je raspodjela esencijalnih elemenata (Fe, Co, Cu, Mn i Mo) te Cd između citosolnih spojeva različitih molekulskih masa u dvama uzorcima kontrolnih gujavica kao i u uzorcima gujavica izloženih rastućim koncentracijama nanočestica srebra odnosno ionskog srebra tijekom 10 dana. Na kromatografskim profilima razlučenih citosola označeno je šest kategorija spojeva koji vežu metale ugrubo definiranih prema molekulskim masama maksimuma metala.

Na kromatogramima kadmija pri svim koncentracija izlaganja nanočesticama te ionskom obliku srebra kao i kod kontrolnih uzoraka vidljiva su dva preklapajuća maksimuma u elucijskom području NMM-MT spojeva - jedan na elucijskom vremenu od oko 30 minuta te drugi oko 32-33 minute.

Na oba kromatograma željeza jasno su izražena tri maksimuma u elucijskom područjima: na prijelazu VVMM u VMM kategoriju, NMM-MT te na prijelazu NMM u VNMM kategoriju spojeva. Najizraženiji maksimum nalazi se u elucijskom području kategorije NMM-MT spojeva kao i kod Cd. Na početku elucijskog područja spojeva VVMM vidljiv je manji maksimum koji nije potpunosti odvojen od glavnom maksimuma. Kod izlaganja nanočesticama vidljivo je smanjenje sadržaja Fe u maksimumu VVMM-VMM (18-19 minuta) gdje najmanji sadržaj odgovara najvišoj koncentraciji nanočestica. Ne postoji izraženija razlika u rasporedu maksimuma kontrolnih uzoraka i uzoraka gujavica izloženih ionskom srebru.

Kromatogrami kobalta također pokazuju tri jasno izražena i jedan manji maksimum kod obje vrste izlaganja te svim koncentracijama izlaganja kao i kod kontrolnih uzoraka te jedan manji maksimum. Najviši maksimum nalazi se na prijelazu iz SMM kategorije spojeva u NMM-MT kategoriju te se djelomično preklapa s glavnim maksimumom kod željeza (s pomakom prema višim molekulskim masama). Maksimum koji se nalazi u elucijskom području NMM spojeva također se preklapa s odgovarajućim maksimumom kod željeza sa sličnim pomakom prema nešto višim molekulskim masama. Maksimum u elucijskom području prijelaza VVMM u VMM spojeve nalazi se na istom mjestu kao odgovarajući maksimum kod željeza te je kod njega također naslonjen manji maksimum na početku tog područja. U VNMM oko 39 minute elucije vidljiv je još jedan manji maksimum. Na kromatogramu tretmana nanočesticama vidljivo je smanjenje sadržaja u

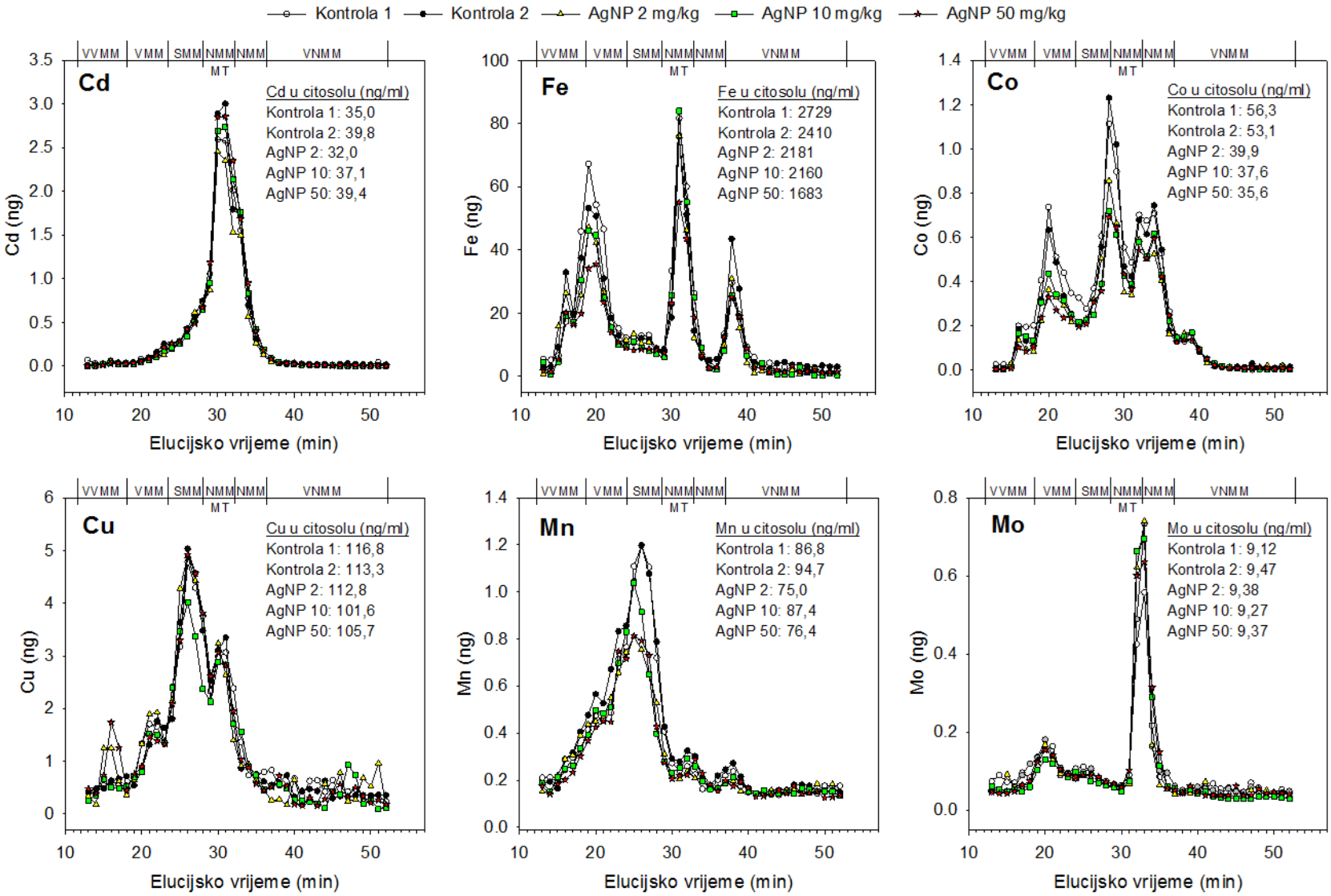
svim koncentracijama tretmana u odnosu na kontrolne uzorke. To je u skladu sa značajno manjim koncentracijama ukupnog Co u citosolu tretiranih gujavica, a pri tome sniženje ne ovisi o koncentraciji izlaganja. Kod tretmana ionskim srebrom u odnosu na kontrolu dolazi do premještanja metala – snižen je sadržaj Co u VVMM i VMM (najveće sniženje kod najviše, a nešto manje kod ostale dvije koncentracije), a istodobno je povišen sadržaj Co u maksimumima NMM-MT i NMM.

Najizraženiji maksimum bakra nalazi se na sredini područja spojeva SMM kod tretmana nanočesticama kao i ionskom obliku srebra te su u oba slučaja na njega naslonjena dva maksimuma (VMM s lijeve te NMM-MT s desne strane). Ne uočava se razlika između elucijske raspodjele tretiranih i kontrolnih uzoraka.

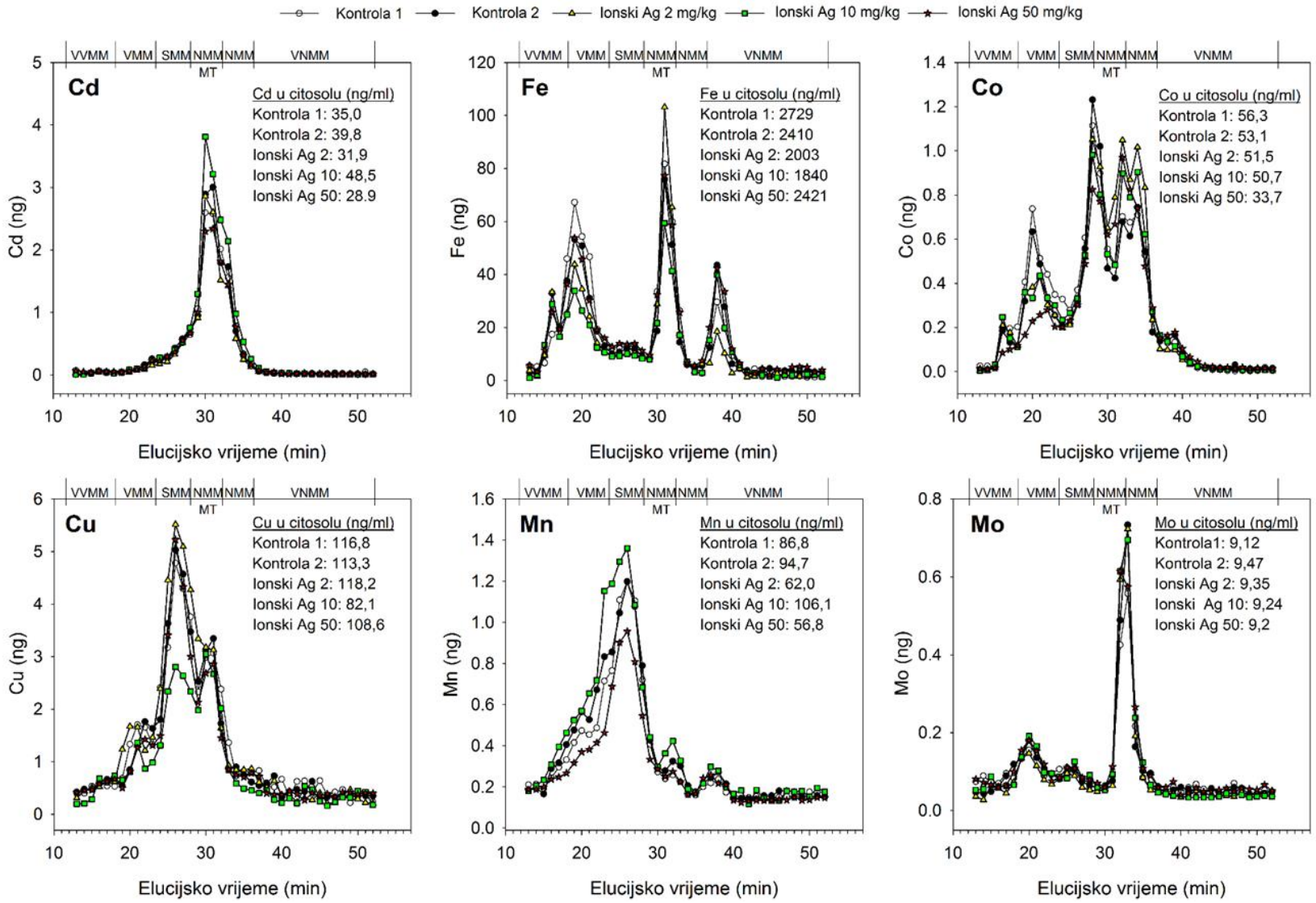
Glavni maksimum mangana također se kao i kod bakra nalazi u elucijskom području SMM kategorije u oba oblika srebra korištena kao tretman. Na kromatogramu nema vidljive razlike između kontrolnih i tretiranih uzoraka.

Kromatografski profil molibdena pokazuje dominantni maksimum na prijelazu iz elucijskog područja spojeva NMM-MT kategorije u NMM kategoriju te jedan manji maksimum u području prijelaza iz VVMM u VMM kategoriju spojeva. Kromatografski profil ne razlikuje se između uzoraka tretiranih nanočesticama odnosno ionskim srebrom. Nema jasne razlike između kontrolnih i tretiranih uzoraka.

Kromatografski profili selena i cinka nisu prikazani jer nisu bili reproducibilni.



SLIKA 17a. Kromatografski profili raspodjele Cd, Fe, Co, Cu, Mn i Mo između citosolnih frakcija različitih molekulskih masa iz citosola kontrolnih gujavica i gujavica izloženih nanočesticama srebra (AgNP) u koncentracijama od 2, 10 i 50 mg/kg razdvojenih tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz isključenje po veličini na koloni Superdex™ 200 10/300 GL. Na slikama su navedene koncentracije pojedinih elemenata u citosolu te su označena elucijska područja proteinskih kategorija VVMM, VMM, SMM, NMM-MT, NMM i VNMM.



SLIKA 17b. Kromatografski profili raspodjele Cd, Fe, Co, Cu, Mn i Mo između citosolnih frakcija različitih molekulskih masa iz citosola kontrolnih gujavica i gujavica izloženih ionskom srebru u koncentracijama od 2, 10 i 50 mg/kg razdvojenih tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti uz isključenje po veličini na koloni Superdex™ 200 10/300 GL. Na slikama su navedene koncentracije pojedinih elemenata u citosolu te su označena elucijska područja proteinskih kategorija VVMM, VMM, SMM, NMM-MT, NMM i VNMM.

5 RASPRAVA

5.1 SADRŽAJ I RASPODJELA SREBRA U TKIVU *E. FETIDA* NAKON IZLAGANJA IONSKOM SREBRU I NANOČESTICAMA SREBRA

Prvi cilj ovog rada bio je istražiti dolazi li do bioakumulacije srebra kod gujavica izloženih nanočesticama odnosno ionskom srebru te kako je takvo akumulirano srebro raspoređeno u tkivima gujavica. Za oba oblika srebra pokazano je da gujavice u svojim tkivima akumuliraju srebro u koncentracijama koje su proporcionalne koncentracijama otopina srebra u umjetnoj zemlji u kojoj su izlagane. Koncentracija srebra akumuliranog u tkivima gujavica bila je nekoliko puta veća kod jedinki izloženih ionskom srebru nego kod gujavica izloženih nanočesticama srebra što je u skladu s dosad provedenim istraživanjima (Shoults-Wilson i sur. 2011a i 2011b).

Unutarstanična raspodjela specifična je za pojedine elemente u skladu s njihovom fiziološkom ulogom i promjena raspodjele elemenata unutar stanice može indicirati toksični učinak. Kod gujavica koje nisu bile izložene nanočesticama ni ionskom srebru oko 23% ukupnog srebra nalazi se u vodotopivoj (citosolnoj) frakciji dok je u partikularnoj frakciji tkiva (organele, jezgra, granule, ostaci staničnih membrana) vezano oko 77% ukupnog srebra.

Izlaganje nanočesticama pomiče udio ukupnog srebra prema taložnoj frakciji. Povećavanjem koncentracije nanočestica ukupno srebro vezano uz citosolnu frakciju raste vrlo malo (tek je pri najvišoj koncentraciji nanočestica došlo je do značajnijeg porasta koncentracije ukupnog srebra u citosolnoj frakciji), a dolazi do velikog rasta ukupnog srebra vezanog uz taložnu frakciju. Iz toga možemo zaključiti da se nanočestice u stanici većinski vežu za unutarstanične membranske sustave (autori Greulich i sur. 2010 navode da se nanočestice u aglomeratima nakupljaju u endolizosomalnom sustavu), a da do uključivanja novih proteina koji vežu srebro u citosolu dolazi tek kod najviše koncentracije izlaganja. To je vidljivo i iz kromatograma: pri niskoj i srednjoj koncentraciji najznačajniji maksimum nalazi se u SMM elucijskoj regiji, jednako kao i kod kontrolnih organizama. Rastom koncentracije nanočestica u vezanje srebra uključuju se proteini iz VMM kategorije te je tako za najvišu koncentraciju najznačajniji maksimum u tom elucijskom području. Vjerojatno se radi o transportnim proteinima. U tom elucijskom području također se nalaze enzimi poput katalaze (vezanje srebra bi moglo uzrokovati

inhibiciju enzimske aktivnosti) te neki od proteina za pohranu metala, npr. Fe-feritin u kojem bi srebro moglo kompetitivno zamijeniti željezo ili se nespecifično vezati. Istisnuti ioni željeza unutar stanice djeluju kao katalizator nastanka slobodnih radikala koji mogu oštetiti unutarstanične strukture pa bi kompetitivno vezanje srebra moglo izazivati oksidativni stres u stanicama.

Izlaganjem gujavica koncentracijama nanočestica srebra višim od 50 mg/kg u novom eksperimentu mogli bi vidjeti bi li došlo do daljnjeg rasta udjela unutarstaničnog srebra u citosolnoj frakciji i rasta postotka proteina iz VMM elucijske kategorije na koje je vezano srebro što bi nam dalo daljnje dokaze o ulozi tih proteina u vezanju srebra.

Izlaganje ionskom srebru rezultiralo je drukčijom raspodjelom unutarstaničnog srebra u odnosu na nanočestice pri najvišoj koncentracije izlaganja gdje je 57% ukupnog unutarstaničnog srebra u citosolnoj, a 43% u taložnoj frakciji tkiva. Do promjene raspodjele dolazi zbog velikog rasta količine srebra u citosolnoj frakciji. Istovremeno je i količina srebra vezana u taložnoj frakciji također veća nego pri izlaganjima nižim koncentracijama. Kako je na kromatogramu vidljivo da nema razlike u pozicijama maksimuma između različitih koncentracija ionskog srebra (ne dolazi do uključivanja novih proteina u vezanje srebra kako raste koncentracija). Može se zaključiti ili da dolazi do pojačane sinteze proteina citosola koji sudjeluju u vezanju srebra ili da uslijed većeg afiniteta dolazi do kompetitivne zamjene metala fiziološki vezanih u ovim proteinima akumuliranim ionima srebra bez povećanja sinteze samih proteina. Kako bi se dobio odgovor na ovo pitanje potrebno je provesti daljnja istraživanja u kojima će se uz metale odrediti i sadržaj proteina u pojedinim maksimumima.

Maksimum koji se nalazi u elucijskom području SMM kategorije proteina kod nanočestica kao i kod ionskog srebra (27 minuta) odgovara elucijskom vremenu superoksid dismutaze (Krasnići i sur. 2013). Promatranjem elucijskih profila ostalih metala, kod bakra i mangana vidljiv je isti maksimum u 27 minuti. U obitelji enzima superoksid dismutaze postoji forma koja u aktivnom mjestu ima bakar te forma koja veže mangan. Autori Roe i sur. (1990) pokazali su da se srebro može vezati u aktivno mjesto superoksid dismutaze goveda. Vezanje srebra u aktivno mjesto i istiskivanje cinka/bakra/mangana moglo bi inaktivirati enzim SOD koji u organizmu ima antioksidativnu ulogu pa bi na taj način srebro moglo uzrokovati rast opasnih reaktivnih oblika kisika u stanicama.

5.2 POTENCIJAL SREBRA ZA POBUDNU SINTEZU METALOTIONEINA

Metalotioneini su proteini koji vežu razne esencijalne i neesencijalne metale te se smatraju ključnim biomarkerima kod toksičnosti metala. Poznato je kako indukciju gena metalotioneina mogu uzrokovati metalni ioni cinka, bakra i kadmija (Sakulsak, 2012). U ovom radu smo htjeli vidjeti dolazi li do pobudne sinteze metalotioneina pod utjecajem nanočestica odnosno ionskog srebra te postoje li razlike u razini metalotioneina između ta dva oblika. Rezultati nisu pokazali indukciju metalotioneina pod utjecajem nanočestica dok je ionsko srebro jedino u koncentraciji od 50 mg/kg značajno povećalo koncentraciju metalotioneina u stanicama. U radu Hayashi i sur. (2013) autori su qPCR-om pokazali kako nanočestice kao i ioni srebra induciraju metalotioneine kod *E. fetida*, no pri mnogo višim koncentracijama od korištenih u ovom radu (500 mg/kg). Također, značajna ekspresija metalotioneina potvrđena je prvi dan nakon početka izlaganja za nanočestice odnosno drugi dan za ionski oblik srebra dok nakon 7 i 14 dana nije bilo značajne razlike u ekspresiji u odnosu na kontrolne organizme. Iz navedenog se može zaključiti kako bi za preciznije povezivanje sinteze metalotioneina pod utjecajem srebra trebalo koristiti više koncentracije izlaganja kao i vremenski kraći period za uzorkovanje.

Iako nije pokazano da srebro sudjeluje u pobudnoj sintezi metalotioneina, u kromatogramima se vide maksimumi u elucijskom području NMM-MT u kojem eluira MT standard (9-20 kDa) što bi moglo indicirati da se srebro veže za metalotioneine. Kod oba oblika srebra najviši udio unutarstaničnog srebra eluira u NMM-MT području kod najniže koncentracije izlaganja (2 mg/kg) te se smanjuje rastom koncentracije izlaganja. To se slaže s opažanjem kako se s rastom koncentracije nanočestica u vezanje srebra uključuju proteini iz VMM kategorije pa možemo zaključiti da se pri višim koncentracijama unutarstanično srebro (bez obzira radi li se on nanočesticama ili ionskom obliku) predominantno veže na proteine više molekulske mase.

5.3 UTJECAJ SREBRA NA KONCENTRACIJU I RASPODJELU ODABRANIH ELEMENATA UNUTAR TKIVA TE NA RASPODJELU IZMEĐU CITOSOLNIH LIGANDA

Jedan od interesa ovog rada bio je vidjeti dolazi li do promjena u koncentraciji i raspodjeli esencijalnih elemenata (Co, Cu, Fe, Mn, Mo i Zn) i Cd nakon izlaganja nanočesticama odnosno ionskom srebru te kakve su kvantitativne i kvalitativne osobine tih promjena.

Najznačajnije promjene primijećene nakon izlaganje gujavica nanočesticama srebra:

- povećava se sadržaj željeza u taložnoj frakciji, a smanjuje u citosolu
- smanjuje se ukupan sadržaj kobalta u tkivima
- povećava se ukupan sadržaj molibdena u tkivima

Najznačajnije promjene primijećene nakon izlaganja gujavica ionskom srebru:

- povećava se sadržaj željeza u taložnoj frakciji, a smanjuje u citosolu
- smanjuje se ukupan sadržaj kobalta u tkivima kod najviše koncentracije izlaganja
- povećava se ukupan sadržaj molibdena u tkivima (pri čemu pri nižoj i srednjoj koncentraciji dolazi do rasta sadržaja u taložnoj, a pada u citosolnoj frakciji)

Kako bi dobili dodatne informacije o utjecaju ova dva oblika srebra na raspodjelu odabranih esencijalnih elemenata i kadmija napravljeni su citosolni profili tih elemenata. Oba oblika srebra uzrokuju slične promjene koncentracije elemenata između maksimumima kromatograma. Najznačajnije primijećene razlike kod tretmana nanočesticama bile su:

- smanjenja sadržaja Fe u maksimumu VVMM-VMM (18-19 minuta) u citosolu izloženih gujavica (najmanji sadržaj kod najviše koncentracije nanočestica). Prema Krasnići i sur. (2014) radi se o proteinu mase 405 kDa što odgovara feritinu. Iz tablice ukupnog sadržaja Fe u citosolu također se vidi taj pad citosolnog Fe kod najviše koncentracije nanočestica srebra. Ovdje se vjerojatno ne radi o istiskivanju željeza ionima srebra jer bi takvo sniženje također bilo prisutno (u puno većem intenzitetu) kod najviše koncentracije ionskog srebra
- smanjenje sadržaja Co u svim maksimumima u odnosu na kontrolne uzorke što je u skladu sa izmjerenim manjim koncentracijama ukupnog Co u citosolu tretiranih gujavica

Najznačajnije razlike u citosolnoj raspodjeli primijećene nakon tretmana ionskim srebrom:

- snižen je sadržaj Co u VVMM i VMM elucijskom području (maksimum oko 21 minute, odgovara spojevima MM od 100-300 kDa, moglo bi se raditi o aldolazi koja u aktivnom mjestu ima Co) dok se istodobno povećava sadržaj Co u maksimumima NMM-MT (maksimum oko 30 minute, odgovara metalotioneinskom standardu) i NMM (maksimum oko 34 minute). Taj efekt je najviše izražen kod najviše koncentracije tretmana ionskim srebrom, a nešto je slabiji kod ostale dvije koncentracije.
- smanjenje sadržaja Mn u VVMM, VMM i SMM maksimumima u gujavica izloženih najvišoj koncentraciji ionskog srebra u odnosu na kontrolne uzorke i uzorke gujavica izloženih nižim koncentracijama ionskog srebra što je u skladu sa izmjerenim manjim koncentracijama ukupnog Mn u citosolu ovih gujavica

Primijećene kvantitativne razlike, promjene raspodjele između citosolne i taložne frakcije te promjene citosolnih profila navedenih metala mogli bi ukazivati na izloženost organizama nanočesticama odnosno ionskom srebru. Provedbom dodatnih istraživanja sa širim rasponom koncentracija tretmana i reprodukcijom ovih rezultata navedeni metali mogli bi se u konačnici upotrijebiti kao biološki pokazatelji (biomarkeri) izloženosti/učinka nanočesticama odnosno ionskom srebru u programima biomonitoringa.

Na kromatogramima su primijećeni slijedeći značajniji maksimumi zajednički svim koncentracijama izlaganja nanočesticama te ionskom srebru kao i kontroli:

- kobalt: maksimum u VNMM elucijskom području (oko 40 minute elucije) prema Krasnići i sur. (2013) odgovara spoju za koji je poznato da sadrži kobalt – cijanokobalminu (vitamin B12)
- molibden: manji maksimum na oko 20 minuta elucije prema Krasnići i sur. (2013) odgovara elucijskom području u kojem se nalazi nekoliko proteina koji sadrže molibden kao kofaktor – aldehid oksidaza (~130 kDa), sulfit oksidaza (~120 kDa) i Fe-Mo flavoprotein ksantin oksidaza (275 kDa). Dominantni maksimum Mo

nalazi se u elucijskom području nešto iza metalotioneinskog standarda (32-33 minuta) i nije poznato kojim spojevima odgovara.

- kadmij: vidljiv je vrlo snažan maksimum koji se u stvari sastoji od dva preklapajuća maksimuma u 30 minuti i u 32-33 minuti. Maksimum u 30 minuti odgovara metalotioneinu što je očekivano s obzirom da nekoliko autora navodi kako metalotioneini vežu ione kadmija (Gruber i sur. 2000, Stürzenbaum i sur. 1998). Vezanje srebra u maksimumu MT nije istisnulo Cd iz MT (nema razlike u sadržaju Cd u maksimumu na 30 minuta kod oba oblika srebra i svim koncentracijama). Obzirom da kod svih triju koncentracija nanočestica srebra te kod dvije niže ionskog srebra nije utvrđen značajan porast sinteze MT (Slika 15) najvjerojatnije je došlo do zamjene cinka iona ionima srebra. Maksimum oko 32-33 minute nalazi se na istom mjestu kao i dominantni maksimum kod molibdena, no nije poznato o kojim spojevima se radi.

- mangan: kao i kod bakra, maksimum u 27 minuti odgovara elucijskom vremenu superoksid dismutaze za koju je poznato da postoji i u formi koja u aktivnom mjestu može imati mangan.

6 ZAKLJUČAK

Gujavice izložene nanočesticama odnosno ionskom srebru u svojim tkivima akumuliraju srebro u koncentracijama koje su proporcionalne koncentracijama otopina srebra u umjetnoj zemlji u kojoj su izlagane. Ionsko srebro značajno se više akumulira u tkivima gujavica od nanočestica srebra. Nanočestice srebra se u stanici većinski vežu na unutarstaničnim membranskim sustavima, a u vrlo malo mjeri na citosolne ligande. Iako nanočestice srebra ne induciraju sintezu metalotioneina, a ionsko srebro ju inducira tek pri najvećoj koncetraciji izlaganja, dio unutarstaničnog srebra vezan je na postojeće metalotioneine u stanici. Izlaganje nanočesticama kao i ionskom srebru dovodi do specifičnih promjena u koncentraciji te unutarstaničnoj raspodjeli željeza, kobalta i molibdena. Izlaganje nanočesticama dovodi do specifičnih promjena u citosolnim profilima željeza i kobalta, a izlaganje ionskom srebru dovodi do specifičnih promjena u citosolnom profilu kobalta. Kvantitativne i kvalitativne promjene u unutarstaničnoj distribuciji esencijalnih elementata željeza, kobalta i molibdena pokazuju potencijal kao biomarkeri izloženosti nanočesticama odnosno ionskom srebru što bi se moglo potvrditi dodatnim istraživanjima.

7 LITERATURA

Ai, J., Biazar, E., Jafarpour, M., Montazeri, M., Majdi, A., Aminifard, S., Zafari, M., Akbari, H. R., Rad, H. G. (2011): Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. Int. J. Nanomedicine **1117**.

AshaRani, P. V, Low Kah Mun, G., Hande, M. P., Valiyaveettil, S. (2009): Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells - SOM. ACS Nano **3**: 279–290.

Buzea, C., Pacheco, I. I., Robbie, K. (2007): Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. Biointerphases **2**: MR17–R71.

Chen, X., Schluesener, H. J. (2008): Nanosilver: A nanoproduct in medical application. Toxicol. Lett. **176**: 1–12.

Christensen, F. M., Johnston, H. J., Stone, V., Aitken, R. J., Hankin, S., Peters, S., Aschberger, K. (2010): Nano-silver – feasibility and challenges for human health risk assessment based on open literature. Nanotoxicology **4**: 284–295.

Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C., Rofe, A. M. (2002): Metallothionein: The multipurpose protein. Cell. Mol. Life Sci. **59**: 627–647.

Drake, P. L. (2005): Exposure-Related Health Effects of Silver and Silver Compounds: A Review. Ann. Occup. Hyg. **49**: 575–585.

Fadaee, R. (2012): A review on earthworm Esienia fetida and its applications. Ann. Biol. Res. **3**: 2500–2506.

Garg, P., Gupta, A., Satya, S. (2006): Vermicomposting of different types of waste using Eisenia foetida: A comparative study. Bioresour. Technol. **97**: 391–395.

Greulich, C., Diendorf, J., Simon, T., Eggeler, G., Epple, M., Köller, M. (2011): Uptake and intracellular distribution of silver nanoparticles in human mesenchymal stem cells. Acta Biomater. **7**: 347–354.

Gruber, C., Stu, S., Gehrig, P., Sack, R., Hunziker, P., Berger, B., Dallinger, R. (2000): Isolation and characterization of a self-sufficient one-domain protein. Eur. J. Biochem. **267**: 573-582.

Hayashi, Y., Heckmann, L. H., Simonsen, V., Scott-Fordsmand, J. J. (2013): Time-course profiling of molecular stress responses to silver nanoparticles in the earthworm *Eisenia fetida*. Ecotoxicol. Environ. Saf. **98**: 219–226.

Heckmann, L. H., Hovgaard, M. B., Sutherland, D. S., Autrup, H., Besenbacher, F., Scott-Fordsmand, J. J. (2011): Limit-test toxicity screening of selected inorganic nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida*. Ecotoxicology. **20**: 226–233.

Hogstrand, C., Galvez, F., Wood, C. M. (1996): Toxicity, silver accumulation and metallothionein induction in freshwater rainbow trout during exposure to different silver salts. Environ. Toxicol. Chem. **15**: 1102–1108.

Johnston, H. J., Hutchison, G., Christensen, F. M., Peters, S., Hankin, S., Stone, V. (2010): A review of the *in vivo* and *in vitro* toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity. Crit. Rev. Toxicol. **40**: 328–346.

Joo, H. S., Kalbassi, M. R., Yu, I. J., Lee, J. H., Johari, S. A. (2013): Bioaccumulation of silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Influence of concentration and salinity. Aquat. Toxicol. **140-141**: 398–406.

Kawata, K., Osawa, M., Okabe, S. (2009): In vitro toxicity of silver nanoparticles at noncytotoxic doses to HepG2 human hepatoma cells. Environ. Sci. Technol. **43**: 6046–6051.

Kim, S., Choi, J. E., Choi, J., Chung, K. H., Park, K., Yi, J., Ryu, D. Y. (2009): Oxidative stress-dependent toxicity of silver nanoparticles in human hepatoma cells. Toxicol. Vitr.: **23**, 1076–1084.

Krasnići, N., Dragun, Z., Erk, M., Raspor, B. (2013): Distribution of selected essential (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Se, and Zn) and nonessential (Cd, Pb) trace elements among protein fractions from hepatic cytosol of European chub (*Squalius cephalus* L.). Environ. Sci. Pollut. Res. **20**; 2340–2351.

Krasnići, N., Dragun, Z., Erk, M., Raspor, B. (2014): Distribution of Co, Cu, Fe, Mn, Se, Zn, and Cd among cytosolic proteins of different molecular masses in gills of European chub (*Squalius cephalus* L.). Environ. Sci. Pollut. Res. **21**, 13512–13521.

Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K., Basta, N. (2004): The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. Ecotoxicol. Environ. Saf. **57**: 39–47.

Lionetto, M. G., Calisi, A., Schettino, T. (2012): Earthworm Biomarkers as Tools for Soil Pollution Assessment. U: Hernandez Soriano, M. C. (ur.) Soil Health and Land Use Management. InTech, Rijeka, str. 305-332

Lukkari, T. (2004): Earthworm Responses to Metal Contamination - Tools for Soil Quality Assessment. Jyväskylä studies in biological and environmental science **146**

Margoshes, M., Vallee, B. L. (1957): A cadmium protein from equine kidney cortex. J. Am. Chem. Soc. **79**: 4813-4814.

Matoničkin, I., Habdija, I., Primc-Habdija, B. (1999): Beskralješnjaci: biologija viših avertebrata. Školska knjiga, Zagreb.

Nahmani, J., Hodson, M. E., Black, S. (2007): A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. Environ. Pollut. **145**: 402–424.

OECD (1984): Earthworm, acute toxicity test. **27**: Guideline for testing animals. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris

OECD (2004): Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida*/*Eisenia Andrei*). **222**: Guideline for testing animals. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris

Palmiter, R. D. (1994): Regulation of metallothionein genes by heavy metals appears to be mediated by a zinc-sensitive inhibitor that interacts with a constitutively active transcription factor, MTF-1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **91**: 1219–1223.

Roe, J. A., Peoples, R., Scholler, D. M., Valentine, J. S. (1990): Silver-binding properties of bovine cuprozinc superoxide dismutase and the overall stability of selected metal-ion derivatives. J. Am. Chem. Soc. **112**: 1538–1545.

Sakulsak, N. (2012): Metallothionein: An Overview on its Metal Homeostatic Regulation in Mammals Metalotioneina. Int. J. Morphol **30**: 1007–1012.

Sekhon, B. S. (2014): Nanotechnology in agri-food production: An overview. Nanotechnol Sci Appl **7**: 31-53

Shoults-Wilson, W. A., Reinsch, B. C., Tsyusko, O. V, Bertsch, P. M., Lowry, G. V, Unrine, J. M. (2011a): Effect of silver nanoparticle surface coating on bioaccumulation and reproductive toxicity in earthworms (Eisenia fetida). Nanotoxicology **5**: 432–444.

Shoults-Wilson, W. A., Reinsch, B. C., Tsyusko, O. V, Bertsch, P. M., Lowry, G. V, Unrine, J. M. (2011b): Role of particle size and soil type in toxicity of silver nanoparticles to earthworms. Soil Sci. Soc. Am. J. **75**: 365–377.

Simkiss, K., Taylor, M. G. (1995): Transport of metals across membranes. U: Tessier, A., Turner, D. R. (ur.) Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. John Wiley & Sons, Chichester, str. 2–44

Strižak, Ž., Ivanković, D., Pröfrock, D., Helmholz, H., Cindrić, A. M., Erk, M., Prange, A. (2014): Characterization of the cytosolic distribution of priority pollutant metals and metalloids in the digestive gland cytosol of marine mussels: Seasonal and spatial variability. Sci. Total Environ. **470-471**: 159–170.

Stryer, L. (1995): Biochemistry. W. H. Freeman and Company, New York

Stürzenbaum, S. R., Kille, P., Morgan, A. J. (1998): The identification, cloning and characterization of earthworm metallothionein. FEBS Lett. **431**: 437–442.

Viarengo, A. (1989): Heavy metals in marine invertebrates: mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. CRC Critical Reviews in Aquatic Sciences **1**: 295-317.

Viarengo, A., Nott, J. A. (1993): Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. Mini-review. Comp Biochem Physiol, **104C**: 355-372.

Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbi R. (1997): A simple spectrophotometric method for MT evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. Mar. Environ. Res. **44**: 69-84.

Wijnhoven, S. W. P., Peijnenburg, W. J. G. M., Herberts, C. a, Hagens, W. I., Oomen, A. G., Heugens, E. H. W., Roszek, B., Bisschops, J., Gosens, I., Van De Meent, D., Dekkers, S., De Jong, W. H., van Zijverden, M., Sips, A. J. a M., Geertsma, R. E. (2009): Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. Nanotoxicology **3**: 109–138.

Xu, L., Li, X., Takemura, T., Hanagata, N., Wu, G., Chou, L. (2012): Genotoxicity and molecular response of silver nanoparticle (NP)-based hydrogel. J. Nanobiotechnology **10**: 16.

8 ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI

Ime i prezime:	Filip Horvat
Adresa:	Zagrebačka 35, 10292 Šenkovec
Telefonski broj:	091 728 4868
Mail adresa:	fihorvat@yahoo.com

OBRAZOVANJE

2013. – 2016.	Diplomski studij molekularne biologije, PMF, Zagreb
2009. – 2013.	Preddiplomski studij molekularne biologije, PMF, Zagreb
2005. – 2009.	V. gimnazija, Zagreb

RADNO ISKUSTVO, PRAKSA, VOLONTIRANJE

ožujak – svibanj 2012.	Stručna praksa u Laboratoriju za ekotoksikologiju, Biološki odsjek, PMF, Zagreb na projektu izlaganja i ispitivanja učinka nanočestica srebra i zlata na gujavice *Eisenia fetida*
siječanj – travanj 2014.	Stručna praksa u Laboratoriju za ekotoksikologiju, Biološki odsjek, PMF, Zagreb, na projektu ispitivanja genotoksičnosti fuorescentnih DNA boja na embrije ribe zebrice *Danio rerio*
travanj – kolovoz 2015.	Stručna praksa u Grupi staničnog odgovora na oštećenja DNA dr. sc. Dee Slade, Max F. Perutz Laboratories, Sveučilište u Beču
rujan 2015. – veljača 2016.	Stručna praksa u Grupi za bioinformatiku prof. Kristiana Vlahovičeka, Biološki odsjek, PMF, Zagreb

VJEŠTINE

Strani jezici:

- izvrsno poznavanje engleskog jezika
- osnovno poznavanje njemačkog jezik

Rad na računalu:

- poznavanje programa za statističku obradu podataka SigmaPlot i Statistica
- poznavanje programskih jezika R i Python
- poznavanje bioinformatičkih metoda
- poznavanje rada u Unix operativnom sustavu

Vozačka dozvola:

- B kategorija

OSOBNI INTERESI

- akvaristika (aktivno sudjelovanje u radu portala i foruma Akvarij.net i sudjelovanje u organizaciji humanitarno-edukativne izložbe AkTer FEST 2012., 2013. i 2014.)
- sviranje bisernice u KUD-u Mihovil Krušlin, Šenkovec