

# Primjena punog faktorskog plana i metode odzivnih površina za određivanje učinka mikroplastike na stanične linije zdravog i tumorskog porijekla

---

Polonji, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:974486>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-04-02**



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Iva Polonji

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, rujan 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Iva Polonji

**PRIMJENA PUNOG FAKTORSKOG PLANA I METODE  
ODZIVNIH POVRŠINA ZA ODREĐIVANJE UČINKA  
MIKROPLASTIKE NA STANIČNE LINIJE ZDRAVOG I  
TUMORSKOG PORIJEKLA**

DIPLOMSKI RAD

**Mentor:** doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

**Komentor:** doc. dr. sc. Jelena Knežević, viša znanstvena suradnica IRB

**Neposredni voditelj:** Martina Miloloža, mag. ing. oecoing.

**Članovi ispitnog povjerenstva:**

doc. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

izv. prof. dr. sc. Šime Ukić

dr. sc. Matija Cvetnić

Zagreb, rujan 2022.



*Ovaj diplomski rad izrađen je u sklopu projekata „Primjena naprednih tehnologija obrade voda za uklanjanje mikroplastike“ (IP-2019-04-9661) i „Genetički i epigenetički biomarkeri urođene imunosti u KOPBu i karcinomu pluća“ (IP-06-2016-1441) Hrvatske zaklade za znanost na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, te na Institutu Ruđer Bošković.*

## ZAHVALA

*Prvenstveno se zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Dajani Kučić Grgić što me prihvatila pod svoje mentorstvo i omogućila mi izradu ovog diplomskog rada. Zahvaljujem na pokretanju inicijative i pruženoj prilici za suradnju na Institutu Ruđer Bošković, strpljenju, savjetima te uloženom trudu i vremenu. Najviše hvala na ukazanom razumijevanju i povjerenju, te prijateljskom odnosu u zajedničkom radu.*

*Zahvaljujem asistentici Martini Miloloži na izdvojenom vremenu i trudu, te konstruktivnim idejama i savjetima prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada, te na svojoj dodatnoj pomoći.*

*Zahvaljujem se i asistentici Kristini Bule na pomoći i prijateljskom pristupu kojima mi je olakšala rad u laboratoriju.*

*Veliko hvala mojoj komentorici doc. dr. sc. Jeleni Knežević, višoj znanstvenoj suradnici Laboratorija za naprednu genomiku Zavoda za molekularnu medicinu na Institutu "Ruđer Bošković" u Zagrebu i asistentu Jurici Baranašiću, na ukazanoj prilici i povjerenju, velikoj količini prenesenog znanju i laboratorijskog iskustva, pomoći i vodstvu pri izvođenju eksperimentalnog dijela i obradi eksperimentalnih rezultata. Posebno hvala na izdvojenom vremenu i trudu, korisnim idejama i savjetima, pruženom razumijevanju te prijateljskom prihvaćanju, pozitivnoj atmosferi i zajedničko provedenom vremenu koje će mi zauvijek ostati u lijepom sjećanju.*

*Na posljetku, najviše hvala mojim roditeljima, sestri i baki, prijateljima i prijateljicama koji su uvijek bili uz mene i učili me da ne odustajem od svojih ciljeva. Vaša bezuvjetna pomoć i ljubav pružila mi je snagu i motivaciju za put do diplome!*

## SAŽETAK

Pretjerana uporaba plastičnih materijala i loše gospodarenje plastičnim otpadom stvorili su rastući problem u pogledu onečišćenja okoliša te utjecaja na žive organizme koji u njemu žive, pa tako i čovjeka. Poseban naglasak se u sklopu novijih znanstvenih istraživanja stavlja na mikroplastiku, koja nastaje kao posljedica fragmentacije plastičnog otpada uslijed izlaganja okolišnih uvjetima. Ova vrsta plastike predstavlja specifičnu opasnost, budući da se zbog svoje veličine olakšano kreće kroz ekosustave, uklapa u hranidbene lance i akumulira u živim jedinkama na koje potom ima potencijalno štetne učinke.

U ovome radu provedeno je ispitivanje učinka mikročestica polistirena na relativno preživljenje humanih plućnih staničnih linija zdravog (WI-38) i tumorskog porijekla (H1299 i A549) u ovisnosti o rasponu veličina čestica mikroplastike, koncentraciji otopina mikroplastike kojim su stanice tretirane i vremenu izlaganja. Kako bi se ustanovilo relativno preživljenje testnih staničnih kultura proveden je MTT test, a programom Desing Expert 7.1.5. određeni su eksperimentalni uvjeti kojima je postignut najštetniji učinak mikroplastike na ispitne stanične linije, odnosno uvjeti pri kojima je relativno preživljenje stanica bilo najniže. Za staničnu liniju WI-38 minimalno preživljenje ustanovljeno je pri: 157,01  $\mu\text{m}$  (veličina čestica PS-a), 0,50  $\mu\text{g/mL}$  (koncentracija otopina PS-a) i 39,74 sata (vrijeme izlaganja), a značajni procesni parametri bili su koncentracija i veličina čestica. Za H1299 najniže preživljenje ostvarilo se pri: 103,11  $\mu\text{m}$  (veličina čestica PS-a), 1,00  $\mu\text{g/mL}$  (koncentracija otopina PS-a) i 24 sata (vrijeme izlaganja), pri čemu su značajni procesni parametri bili koncentracija i vrijeme izlaganja. Stanična linija A549 najmanje preživljenje imala je pri: 200  $\mu\text{m}$  (veličina čestica PS-a), 2,00  $\mu\text{g/mL}$  (koncentracija otopina PS-a) i 51,17 sata (vrijeme izlaganja), dok je značajni procesni parametar bio isključivo vrijeme.

Prema dobivenim rezultatima zaključeno je da štetan učinak mikroplastike PS-a u pogledu smanjenja relativnog preživljenja postoji, te da s obzirom na vrstu ispitne stanične linije može ovisiti o veličini čestica PS-a, koncentraciji otopina i vremenu izlaganja.

***Ključne riječi:*** Mikroplastika; Polistiren; WI-38; H1299; A549

## **ABSTRACT**

Excessive use of plastic materials and poor management of plastic waste in modern times have created a growing problem in terms of environmental pollution and impact on living organisms that live in it, including humans. As part of recent scientific research, special emphasis is placed on microplastics, which are formed as a result of the fragmentation of plastic waste due to exposure to environmental conditions. This type of plastic represents a specific danger, since due to its size it can easily move through ecosystems, fit into food chains and accumulate in living organisms, on which it can have potentially harmful effects.

In this work, the effect of polystyrene microparticles on the relative survival of human lung cell lines of healthy origin (WI-38) and tumor origin (H1299 and A549) was investigated. The dependence of survival on the size range of the microplastic particle, the concentration of the microplastic solution with which the cells were treated and the exposure time was observed. In order to establish the relative survival of the test cell cultures, the MTT test was performed. Program Desing Expert 7.1.5. was used to determine the experimental conditions under which the most harmful effect of microplastics on the test cell lines was achieved. In other words, those were the conditions under which relative cell survival was the lowest. For the WI-38 cell line, minimum survival was found at: 157.01  $\mu\text{m}$  (PS particle size), 0.50  $\mu\text{g/mL}$  (PS solution concentration) and 39.74 hours (exposure time), a significant process parameters were concentration and particle size. For H1299, the lowest survival was achieved at: 103.11  $\mu\text{m}$  (PS particle size), 1.00  $\mu\text{g/mL}$  (PS solution concentration) and 24 hours (exposure time), where the significant process parameters were concentration and exposure time. The A549 cell line had the lowest survival at: 200  $\mu\text{m}$  (PS particle size), 2.00  $\mu\text{g/mL}$  (PS solution concentration) and 51.17 hours (exposure time), while the only significant process parameter was time.

According to the obtained results, it was concluded that the harmful effect of PS microplastics in terms of reducing relative survival exists. Also, depending on the test cell culture type, the decrease in survival depends on the size of the PS particle, the concentration of the solution and the exposure time.

**Key words:** Microplastics; Polystyrene; WI-38; H1299; A549

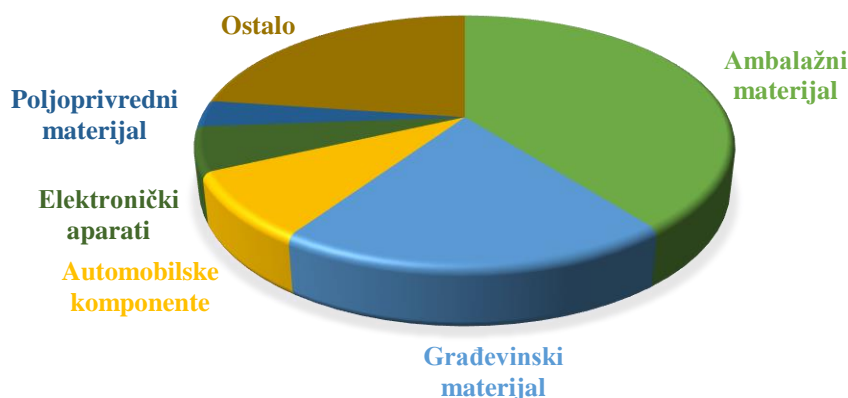
# SADRŽAJ

1.	Uvod .....	1
2.	Opći dio .....	3
2.1.	Mikroplastika .....	4
2.1.1.	Primarna mikroplastika .....	4
2.1.2.	Sekundarna mikroplastika .....	6
2.2.	Vrste mikroplastike .....	7
2.2.1.	Polietilen .....	8
2.2.2.	Polipropilen .....	9
2.2.3.	Poli (vinil-klorid) .....	10
2.2.4.	Polistiren .....	11
2.2.5.	Poli (etilen-tereftalat) .....	12
2.3.	Mikroplastika u okolišu .....	13
2.4.	Toksikologija .....	16
2.4.1.	Utjecaj mikroplastike na okolišne organizme .....	17
2.4.2.	Utjecaj mikroplastike na čovjeka .....	20
2.4.3.	Testovi toksičnosti .....	22
2.4.3.1.	Test redukcije tetrazolijeve soli (MTT) .....	24
2.4.4.	<i>In vivo</i> ispitivanje toksičnosti mikroplastike .....	25
2.4.5.	<i>In vitro</i> ispitivanje toksičnosti mikroplastike na humanim staničnim kulturama .....	29
2.5.	Dizajn eksperimenta .....	33
2.5.1.	Potpuni faktorski plan .....	33
2.5.2.	ANOVA (Metoda analize varijance) .....	34
3.	Eksperimentalni dio .....	35
3.1.	Materijali .....	35
3.1.1.	Mikroplastika .....	35
3.1.2.	Testni stanični modeli .....	35
3.1.3.	Mediji i kemikalije .....	37
3.2.	Mjerni instrumenti i oprema .....	38
3.3.	Metode rada .....	38
3.3.1.	Priprema mikroplastike .....	38
3.3.2.	Rad sa staničnim kulturama .....	40
3.3.3.	Priprema radnih otopina mikroplastike i tretiranje staničnih kultura .....	41
3.3.4.	Određivanje utjecaja THF-a / mikroplastike na preživljenje stanične kulture .....	44
3.3.5.	Statistička analiza .....	45
4.	Rezultati i rasprava .....	48
4.1.	MTT test .....	48
4.2.	Potpuni faktorski dizajn .....	55
4.3.	Statistička analiza prema ANOVA-i .....	59
5.	Zaključak .....	63
6.	Literatura .....	64
7.	Simboli i oznake .....	71
8.	Životopis .....	73



# 1. Uvod

Plastični materijali u današnje vrijeme pronalaze široku primjenu za raznovrsne svrhe zahvaljujući jedinstvenim svojstvima poput niske cijene, odlične otpornosti na koroziju, izdržljivosti, lakog oblikovanja i deformacije, te izvrsnih izolacijskih svojstava.<sup>1</sup> Začetkom globalne plastične industrije smatra se stvaranje prve sintetičke plastike 1907. godine<sup>2</sup>, dok je 50-tih godina prošlog stoljeća započeta masovna proizvodnja, te upotreba plastičnih proizvoda.<sup>3</sup> Danas godišnja globalna proizvodnja plastike iznosi oko 280 milijuna tona u čemu najveći udio imaju industrija ambalaže, poljoprivredna, medicinska i druge industrije.<sup>4,5</sup> **Slika 1.1.** shematski prikazuje udjele pojedinih skupina plastičnih proizvoda u ukupnoj proizvodnji. Širok raspon sintetičkih polimernih materijala koji su do danas razvijeni osigurao je raznolikost primjene krajnjih plastičnih proizvoda, pri čemu kao neke od najčešće korištenih materijala valja istaknuti polipropilen (PP), polivinil klorid (PVC), polietilen tereftalat (PET), polistiren (PS) i polietilen (PE).<sup>6</sup>



**Slika 1.1.** Shematski prikaz udjela plastičnih proizvoda u ukupnoj proizvodnji<sup>7</sup>

Međutim unatoč brojnim prednostima, zbog neodrživog korištenja i lošeg gospodarenja, industrijski i kućni plastični otpad danas predstavlja ozbiljan ekološki problem s obzirom na njegovu izrazitu postojanost i slabu prirodnu razgradnju.<sup>1,8</sup> Prema procjenama, vrijeme potrebno za potpunu razgradnju plastičnog otpada kreće se u rasponu od desetljeća do tisućljeća.<sup>9</sup> Kao posljedica spore razgradnje dolazi do nakupljanja plastičnog otpada unutar morskih i kopnenih ekosustava. Na taj način plastika ostvaruje direktan utjecaj na okoliš i organizme koje u njemu žive, a samim time i čovjeka.<sup>10</sup> Nadalje, problem plastičnog otpada mijenja se i pogoršava kada plastika izložena određenim okolišnim uvjetima fragmentira na manje čestice, poznate kao mikroplastika.<sup>11</sup>

Nedovoljno istražen utjecaj mikroplastike na onečišćenje okoliša, te ljudsko zdravlje razlog je zbog kojega se u posljednjem desetljeću ovoj temi i daljnjim istraživanjima u tom području pridaje veliki značaj.<sup>5</sup> U prilog tome ide i podatak da je na UN-ovoj konferenciji o zaštiti okoliša 2015. godine na području okolišnih i ekoloških istraživanja, onečišćenje mikroplastikom proglašeno drugim najznačajnijim znanstvenim problemom u svijetu.<sup>12</sup> Veliku zabrinutost izazivaju podaci o pronalasku čestica mikroplastike u gotovo svim domenama okoliša, što podrazumijeva vodu i sediment slatkovodnih sustava<sup>13</sup>, urbana vodena okruženja<sup>14</sup>, čestice zraka<sup>15</sup>, poljoprivredna zemljišta<sup>16</sup>, ali i udaljene regije poput izoliranih oceanskih predjela<sup>17</sup> i polarnih regija<sup>18</sup>. Štoviše, nekoliko studija prisutnost mikroplastike potvrdilo je u hrani<sup>19</sup> i vodi za piće<sup>20</sup>. Osim direktnog toksičnog djelovanja, negativan utjecaj ovih čestica na čovjeka može se ostvariti i indirektnim putem, odnosno na način da se na njihovu površinu adsorpcijom vežu druge štetne komponente iz okoliša koje mogu ugroziti ljudsko zdravlje. Poliklorirani bifenili (PCB), pesticidi, policiklički aromatski ugljikovodici (PAH) i drugih teški metali poput olova, kadmija, cinka i bakra neki su od poznatih okolišnih onečišćivala, a ujedno su i endokrini, reproduktivni i metabolički disruptori čija je prisutnost detektirana na površini čestica mikroplastike.<sup>14,21</sup>

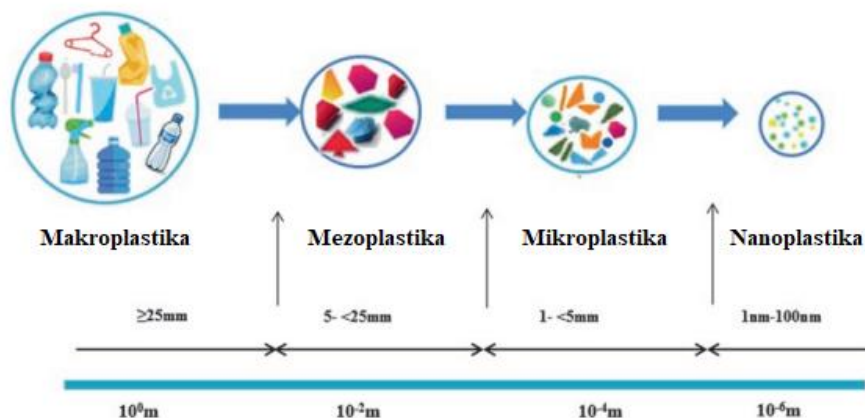
U ovom radu ispitan je štetan učinak mikročestica plastike polistirena različitih veličina na stanice čovjeka, ovisno o koncentraciji otopina mikroplastike i vremenu izlaganja. Istraživanje je provedeno na staničnim linijama zdravog porijekla WI-38 (stanice plućnih fibroblasta čovjeka), odnosno tumorskog porijekla H1299 i A549 (stanice izvedene iz metastaza adenokarcinoma pluća čovjeka). Dizajn eksperimenta proveden je prema dizajnu punog faktorskog plana, dok je za statističku analizu korištena metoda odzivnih površina.

## 2. Opći dio

Plastika se smatra najkorištenijim i najsvestranijim materijalom modernog doba. Sve veća potražnja za plastičnim materijalima objašnjava rapidno povećanje njihove proizvodnje posljednjih desetljeća. U priloge tome ide podatak kako je 1950. godine godišnja globalna proizvodnja plastike iznosila 1,5 milijuna tona, dok je isti podatak za 2009. godinu iznosio 250 milijuna tona. Nakon 2014. godine godišnja globalna proizvodnja plastike dosegla je svoj vrhunac s 311 milijuna tona, što u periodu od 65 godina proizvodnje ovoga materijala predstavlja eksponencijalno povećanje.<sup>22</sup>

Udio plastike u cjelokupnom komunalnom otpadu proizvedenom u svijetu iznosi značajnih 16%<sup>23</sup>, stoga zbrinjavanje plastičnog otpada danas predstavlja važno pitanje. Jedno od načina zbrinjavanja plastičnog otpada je njegovo spaljivanje. Međutim, izgaranjem plastičnih materijala oslobađaju se otrovni kemijski spojevi, furani i dioksini, koji mogu štetiti okolišu i ljudskom zdravlju. Idealan odgovor na pitanje zbrinjavanja plastičnog otpada bilo bi recikliranje. No, mnoge zemlje još uvijek nemaju nametnutu zakonsku regulativu koja bi ih obvezala na takav način postupanja s plastičnim otpadom. Shodno tome odabire se jednostavniji i jeftiniji pristup kojeg predstavljaju odlagališta.<sup>22</sup> Neizbježna posljedica korištenja odlagališta je ispuštanje velike količine plastičnog otpada u okoliš, od čega se pretpostavlja da 15-40% plastičnog otpada završi u oceanima.<sup>23</sup>

Plastični otpad općenito se klasificira prema veličini čestica: makroplastika (>25 mm), mezoplastika (25-5 mm), mikroplastika (5 mm-1  $\mu$ m) i nanoplastika (< 1  $\mu$ m).<sup>24</sup> Slika 2.1. prikazuje navedenu klasifikaciju, te način na kojim razgradnjom iz većih plastičnih vrsta nastaju manje.



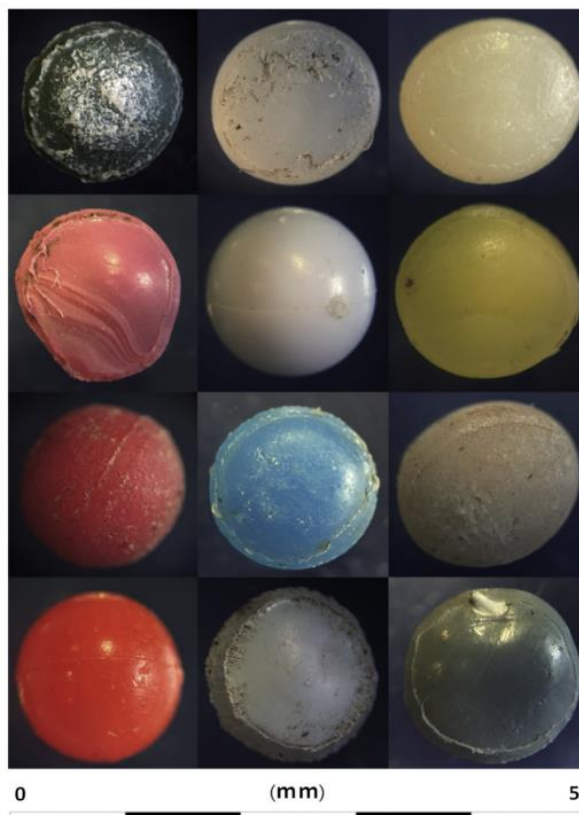
**Slika 2.1.** Klasifikacija plastičnog otpada prema veličini čestica<sup>24</sup>

## 2.1. Mikroplastika

Pojam „mikroplastika“ je usvojena kao rezultat studija Thompsona i sur.<sup>25</sup>, iako su i u ranijim istraživanjima uočene čestice mikro razmjera u morskom okolišu.<sup>26</sup> Danas se ona definira kao svaki polimerni materijal veličine čestica u rasponu od 5 mm do 1  $\mu\text{m}$ .<sup>7</sup> Mikroplastika nastaje kada se veći komadi plastičnog otpada, odnosno makroplastike u okolišu razgrađuju na manje komade. Daljnjom fragmentacijom mikroplastika se razgrađuje do još sitnijih veličina čestica, koje se tada naziva nanoplastikom.<sup>27</sup> Nanoplastika u odnosu na mikroplastiku ima promijenjenu strukturu i mehanička svojstva, te znatno veći omjer volumena i površine pojedinačne čestice. Posljedično se smanjenjem veličine čestica plastike mijenja i njezina dostupnost u okolišu, te utjecaj na žive organizme.<sup>24</sup> Mikroplastiku se s obzirom na podrijetlo dijeli u dvije kategorije: primarnu i sekundarnu.<sup>7</sup>

### 2.1.1. Primarna mikroplastika

Primarna mikroplastika je plastika koja se proizvodi ciljano u svojoj mikroskopskoj veličini za određene industrijske ili kućne svrhe<sup>28</sup>, a najčešće dolazi u obliku malih sferičnih zrnaca kakve prikazuje Slika 2.2.<sup>29</sup>



Slika 2.2. Čestice primarne mikroplastike<sup>29</sup>

Čestice primarne mikroplastike koriste se u sredstvima za čišćenje lica, pastama za zube, kozmetici poput gelova za tuširanje, pilinga, sjenila, pudera, maskara, dezodoransa, krema za brijanje, proizvoda za bebe, bojanje kose, lakova za nokte, sredstva za odbijanje insekata i krema za sunčanje.<sup>28</sup> Upotreba plastičnih čestica u kozmetici može imati više razloga, poput olakšane kontrole viskoznosti, te dobivanja kvalitetnijeg krajnjeg proizvoda. Tako se primjerice mikročestice polietilena često primjenjuju u sredstvima za njegu lica kao zamjena za tradicionalna prirodna abrazivna sredstva poput zobnih pahuljica, budući da zbog svoje glatke površine djeluju nježnije na kožu.<sup>29</sup> Navedeni kozmetički proizvodi široke potrošnje namijenjeni su za takozvanu „otvorenu upotrebu“ budući da se nakon uporabe ispiru i završavaju u odvodu.<sup>30</sup> Sustavi za pročišćavanje otpadnih voda mogu imati i do 99% učinkovitost u uklanjanju mikroplastičnih čestica, ovisno o procesima koje uređaji za pročišćavanje koriste. Međutim, prevelik broj čestica mikroplastike koje uđu u sustav za pročišćavanje svejedno mogu omogućiti da značajan broj istih zaobiđe sustave za filtraciju, te na posljetku bude ispušten u slatkovodni sustav.<sup>7</sup> Tim putem čestice mikroplastike dolaze i akumuliraju se u okoliš gdje onečišćuju mora, oceane, sedimente i druge okolišne sastavnice, a ispiranjem tla mogu dospjeti do podzemnih voda i onečistiti izvore pitke vode.<sup>22</sup> Utvrđeno je da Europa godišnje proizvede i u ocean ispusti između 80,042 i 218,662 tone primarne mikroplastike, od čega značajan dio opada na mikroplastiku porijeklom iz proizvoda za osobnu uporabu.<sup>29</sup> Osim toga, primarna mikroplastika također se koristi u abrazivnim sredstvima u proizvodima za čišćenje, u medicini kao vektor za različite lijekove, te u proizvodnji sintetičke odjeće.<sup>28</sup> Mikroplastična vlakna ubrajaju se u skupinu najzastupljenijih okolišnih onečišćivala, budući da se prilikom samo jednog ciklusa svakodnevnog pranja sintetičkog rublja oslobodi više od 1900 plastičnih vlakana. Tako oslobođena mikroplastika prenosi se do kanalizacijskog sustava i vodotoka. Potvrdu o opasnosti sintetičkih vlakana za okoliš predstavljaju rezultati istraživanja u kojima je otkriven velik broj čestica mikroplastike u tlu tretiranom sakupljenih kanalizacijskim sedimentima.<sup>29</sup> Još jedan značajan oblik primarne mikroplastike predstavljaju peleti (Slika 2.3.), odnosno malene plastične kuglice koje se proizvode sa svrhom dobivanja industrijske sirovine za daljnje topljenje i oblikovanje u druge i veće plastične artefakte. Također, ovaj oblik primarne mikroplastike smatra se jednim od glavnih izvora onečišćenja u vodenom okolišu.<sup>29</sup>

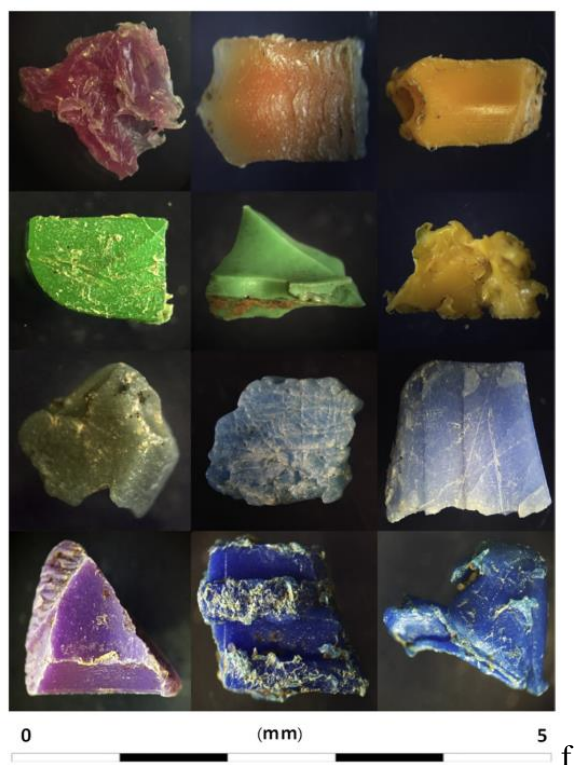


**Slika 2.3.** Primarna mikroplastika u obliku peleta<sup>29</sup>

S obzirom na razmjer problema ispuštanja golemih količina primarne mikroplastike u vodeni okoliš posljednjih desetljeća, istraživanja na ovom području od izuzetne su važnosti, te bi u budućnosti trebala biti temelj za ostvarivanje strožih zakonskih regulativa za svjetske proizvođače. Ograničavanje proizvodnje i uporabe primarne mikroplastike, kao i razvoj metoda za uklanjanje one koja je već prisutna u okolišu cilj je kojega se nastoji ostvariti.<sup>22,29</sup>

### **2.1.2. Sekundarna mikroplastika**

Sekundarnu mikroplastiku predstavljaju nepravilni komadi plastike (Slika 2.4.) koji nastaju ne ciljano kao rezultat razgradnje većih komada plastike, poput plastičnih vrećica i boca. Posebice velik udio u ukupnoj proizvodnji sekundarne plastike ima razgradnja plastičnih užadi i mreža, na koje prema procjenama opada 18%.<sup>29</sup> Razgradnja se odvija kao kulminacija fizikalnih, kemijskih i bioloških okolišnih procesa kojima se smanjuje strukturni integritet megaplastičnog i makroplastičnog otpada.<sup>31</sup> Čimbenici koji najintenzivnije utječu na dezintegraciju plastičnog otpada su sunčeva svjetlost i temperatura, ali i sama svojstva polimernog materijala. Izlaganje ultraljubičastom (UV) zračenju uzrokuje fotodegradaciju plastičnog otpada, potičući oksidaciju polimerne matrice što dovodi do cijepanja kemijske veze.<sup>31,32</sup> Proizvodnja sekundarne mikroplastike stoga je najistaknutija na plažama, budući da je tamo dostupnost UV zračenja i kisika najveća, uz fizičku abraziju valovima.<sup>31,33</sup> Nakon što nastali fragmenti urone u dublje vodene sredine i smanji se temperatura i količina svjetla, razgradnja im se također usporava. Posljedično dolazi do nakupljanja sekundarnih čestica mikroplastike u morskom okolišu, te utjecaja na žive organizme u njemu.<sup>28</sup> Prema procjenama Europa godišnje proizvede i ispusti u ocean između 68,500 i 275,000 tona sekundarne mikroplastike.<sup>29</sup>



**Slika 2.4.** Čestice sekundarne mikroplastike<sup>29</sup>

## 2.2. Vrste mikroplastike

Velike polimerne molekule od kakvih je plastika sastavljena nastaju spajanjem, odnosno polimerizacijom velikog broja manjih molekularnih jedinica poznatih pod nazivom monomeri. Monomeri se dobivaju ekstrakcijom iz nafte ili prirodnog plina.<sup>31</sup> Svojstva plastike određena su kemijskom strukturom monomernih jedinica i duljinom polimernog lanca. Tako povećanje broja monomernih jedinica omogućava stvaranje jačih intermolekularnih van der Waalsovih sila između polimernih lanaca, dajući polimerima veću čvrstoću i žilavost. Stoga će polietilen kojemu se broj monomera u lancima kreće u stotinama tisuća biti čvrsta plastika, dok će u obliku mekog voska ili tekućine biti ukoliko mu se polimerni lanci sastoje od nekoliko stotina monomernih jedinica.<sup>34</sup> Prostorna struktura polimera sastoji se od nasumično orijentiranih amorfni lanaca, dok polimeri u masi mogu imati kratke kristalne dijelove koji utječu na njihovu morfologiju. Veći stupanj kristalnosti čini polimer žilavijim, a previsok može učiniti polimer krhkim. "Staklasti" polimeri su oni koji su po svojoj strukturi amorfni i ne kristaliziraju, dok su polukristalni polimeri poznati kao "gumeni" polimeri. Stupanj kristalizacije u polimeru je promjenjiv, te se na njega može utjecati fizičkom ili toplinskom obradom. Također, tijekom proizvodnje sa svrhom postizanja željenih svojstava polimerima se obično dodaju različiti aditivi.

Oni najčešće sadržavaju ugljik ili silicij za jačanje materijala, toplinske ili UV stabilizatore.<sup>35</sup> U ukupnoj proizvodnji plastike najveći udio imaju sljedeće vrste polimernih materijala: polietilen (PE) (36%), polipropilen (PP) (21%) i poli (vinil-klorid) (PVC) (12%), te poliester (PES) (<10%), poliuretan (PU) (<10%), polistiren (PS) (<10%)<sup>36</sup>, te poli (etilen-tereftalat) (PET). Posljedica visoke stope proizvodnje navedenih plastičnih materijala je njihova široka rasprostranjenost u svijetu, te značajni doprinos u onečišćenju okoliša.<sup>37</sup>

Tablica 2.1. prikazuje osnovna svojstva i primjene odabranih plastičnih materijala, dok je njihov detaljniji opis predstavljen u nastavku rada.

**Tablica 2.1.** Klasifikacija, svojstva i najčešće primjene PE, PP, PVC, PS i PET-a<sup>22,37</sup>

POLIMER	MONOMER	MORFOLOGIJA	GUSTOĆA [g/cm <sup>3</sup> ]	NAJČEŠĆA PRIMJENA
<b>Polietilen</b>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	Semi-kristalna	0,90 – 0,98	Vrećice, pakiranje hrane, kartonske obloge, folije, vanjski namještaj, kante za otpad, kemijski spremnici, cijevi
<b>Polipropilen</b>	-CH(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -	Semi-kristalna Amorfna	0,84 – 0,91	Čepovi za boce, cijevi, užadi, vanjski namještaj
<b>Polivinil klorid</b>	-CH <sub>2</sub> -CH(Cl)-	Amorfna	1,37 – 1,53	Izolacija kabela, crijeva za vodu, obuća, podne obloge
<b>Polistiren</b>	-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH=CH <sub>2</sub> -	Amorfna	1,04 – 1,06	Jednokratni pribor i posude za jelo, stiropor, toplinska izolacija
<b>Polietilen terftalat</b>	-O-C(=O)-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> - C(=O)-O-CH <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub>	Semi-kristalna	1,33 – 1,46	Boce za piće, spremnici za hranu, folije, flasteri, vlakna, materijali za punjenje

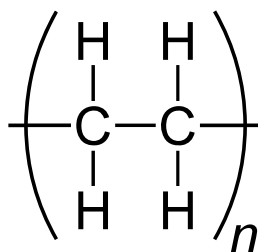
### 2.2.1. Polietilen

Polietilen karakteriziraju izvrsna žilavost, kemijska otpornost, električna izolacijska svojstva, apsorpcija vlage, nizak koeficijent trenja i jednostavnost obrade. Navedena svojstva ujedno su i razlozi zbog kojih PE trenutno predstavlja plastični materijal s najvećom potražnjom u svijetu. PE je termoplastični polimer koji se sastoji od dugih lanaca načinjenih od monomernih jedinica etilena. **Slika 2.5.** Kemijska struktura monomera . prikazuje kemijsku strukturu monomerne jedinice PE.



Ovisno o načinu polimerizacije i dobivenoj gustoći krajnjeg materijala, PE se klasificira u tri kategorije: polietilen niske (LDPE), srednje (MDPE) i visoke gustoće (HDPE), od kojih svaka ima različita termička, mehanička, kemijska, električna i optička svojstva.<sup>38</sup>

U Tablica 2.1. navedeno je da PE općenito pripada skupini semi-kristalnih polimernih materijala, te da mu se gustoća kreće u rasponu od 0,90 – 0,98 g/cm<sup>3</sup>. Budući da uz hidrofobne karakteristike ima gustoću manju od vode, čestice PE uobičajeno se mogu pronaći kako plutaju na površinama voda. Zbog širine proizvodnje i uporabe, PE pripada jednim od najčešćih onečišćivala vodenog okoliša.<sup>37</sup> Ovaj plastični materijal najčešće se upotrebljava za izradu vrećica, kartonskih obloga, folija, vanjskog namještaja, kanta za otpad, kemijskih spremnika, cijevi, te u pakiranju hrane.<sup>22</sup>

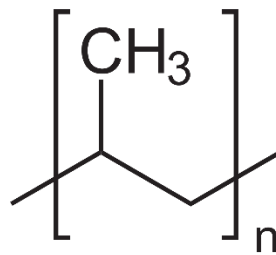


**Slika 2.5.** Kemijska struktura monomera PE<sup>39</sup>

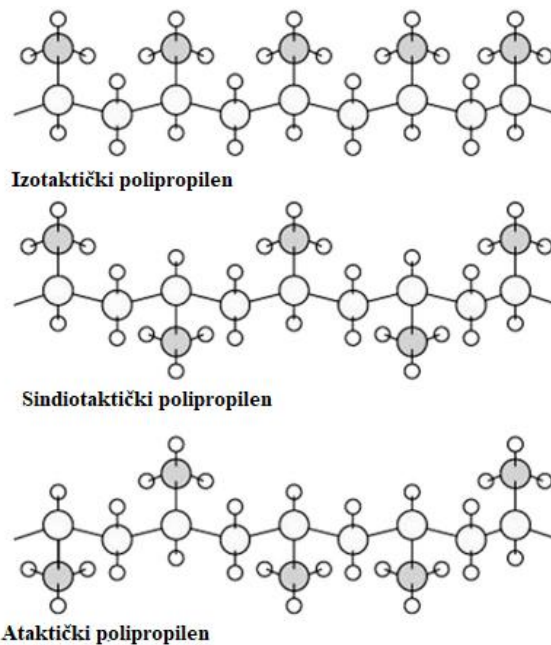
### 2.2.2. Polipropilen

Polipropilen je sintetička smola dobivena polimerizacijom propilena.<sup>38</sup> Ovaj polimerni materijal široko se primjenjuje u proizvodnji ambalaže, tekstila, užadi i raznim drugim aspektima s obzirom na njegov velik potencijal na području izolacijskih svojstava, sjaja, stabilnosti dimenzija i obradivosti.<sup>37,38</sup> Također se smatra jednim od najlakših i najsvestranijih polimernih materijala. Po mnogo čemu PP je sličan prethodno opisanom PE, posebice u pogledu njihovih električnih svojstava. Nadalje, svojstva PP-a uvelike ovise o molekulskoj masi, odnosno duljini polimernih lanaca, raspodjeli molekulske mase, stupnju kristalnosti, te vrsti i udjelu komonomera, ukoliko se isti koriste.<sup>38</sup> Slika 2.6. prikazuje kemijsku strukturu monomera PP-a, te je vidljivo kako se radi o asimetričnoj molekuli. Stoga prilikom polimerizacije može doći do formiranja tri osnovne lančane strukture, ovisno o položaju metilnih skupina: dvije s pravilnom strukturom (izotaktička i sindiotaktička), te ataktička s nepravilnom strukturom.<sup>38</sup> Navedene strukture prikazuje Slika 2.7. Komercijalni PP obično se priprema kao mješavina 75% izotaktičkog i 25% ataktičkog PP-a.

Potražnja za PP-om u konstantnom je porastu, zbog čega je upravo ova vrsta mikroplastike jedna od najčešće pronađenih u morskom okolišu.<sup>37</sup>



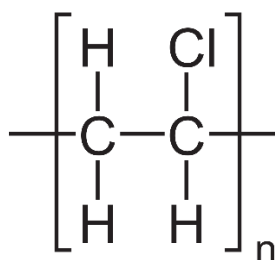
**Slika 2.6.** Kemijska struktura monomera PP-a<sup>40</sup>



**Slika 2.7.** Molekularne/lančane strukture PP-a<sup>38</sup>

### 2.2.3. Poli (vinil-klorid)

Poli (vinil-klorid) polimerni je materijal sastavljen od vinilnih monomernih skupina, koje na sebi imaju vezan po jedan atom klora kako prikazuje Slika 2.8.<sup>41</sup>

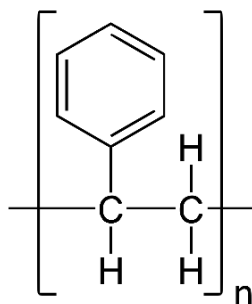


**Slika 2.8.** Kemijska struktura monomera PVC-a<sup>42</sup>

Bez aditiva PVC je krhka tvar bijele boje. Međutim, za komercijalnu primjenu proizvode se dva tipa PVC-a: kruti i fleksibilan. Kruti tip posebno je izdržljiv tvrdi materijal koji je otporan na kemijsku razgradnju i vanjske vremenske uvjete, iako na sobnoj temperaturi ima nisku udarnu otpornost. Plastificirani fleksibilni oblik PVC-a nastaje dodatkom ftalatnih plastifikatora tijekom proces proizvodnje sa svrhom omekšavanja polimernog materijala.<sup>37</sup> Ne plastificirani PVC koristi se za izradu vodovodnih cijevi, u građevinarstvu, automobilske industriji za izradu unutarnjih i vanjskih dijelova automobila i dr., dok primjene plastificiranog PVC-a podrazumijevaju izradu crijeva, izolaciju električnih kabela, medicinskih uređaja, elastičnih automobilskih dijelova, voodoporne odjeću itd.<sup>37,41</sup> Zbog širine njegove primjene nije čudo da je PVC jedan od najčešće korištenih termoplastičnih materijala. Nedavne procjene ukazuju da 12-25% ukupne proizvedene plastike u svijetu opada na upravo ovaj materijal, te da ga premašuju jedino polipropilen i polietilen. Međutim, on trenutno također predstavlja ekološki problem i zabrinjavajući materijal kada je riječ o ljudskom zdravlju, s obzirom na stvaranje i oslobađanje štetnih kemikalija tijekom njegovog životnog ciklusa.<sup>41</sup>

#### 2.2.4. Polistiren

Polistiren je aromatski polimer nastao polimerizacijom stirenskih monomernih jedinica kakvu prikazuje Slika 2.9. Stiren (vinilbenzen) čine etilen i benzen.<sup>43</sup>



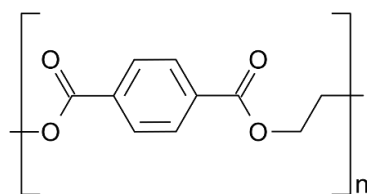
**Slika 2.9.** Kemijska struktura monomera PS-a<sup>43</sup>

PS je termoplastični polimer kojega karakterizira visoka prozirnost, izdržljivost i lako obojenje. Ovaj čvrsti materijal primjenjuje se za proizvodnju CD-ova, igračaka, četkica za zube, jednokratnog pribora i posuda za jelo, toplinsku izolaciju i dr. Također je vrlo značajan u proizvodnji stiropora, koji se dobiva brzim zagrijavanjem polistirenskih peleta uz dodatak sredstva za pjenjenje.<sup>37,43</sup> Različite međunarodne agencije nadziru sigurnost i toksičnost PS-a u proizvodima za svakodnevnu upotrebu. Oslobođanje stirenskih monomera u okoliš tijekom procesa taljenja ili polimerizacije posebno je važan aspekt tog nadzora.

Agencija za zaštitu okoliša (EPA) utvrdila je 300 ppm (1000 mg/m<sup>3</sup>) kao maksimalnu dopuštenu koncentraciju PS-a kojoj čovjek može biti izložen, bez kroničnih zdravstvenih posljedica. Ovaj materijal umjereno je termički stabilan, te se na temperaturama ispod 200°C ne događa gotovo nikakva razgradnja čistog PS-a. Izlaganje temperaturama iznad 330°C rezultira gotovo potpunom razgradnjom, pri čemu je glavni produkt stiren.<sup>43</sup> Ovaj produkt za morski okoliš u kojemu ga se često pronalazi, ali i čovjeka predstavlja posebnu opasnost, budući da su mu utvrđena onkogeno svojstva.<sup>37</sup> Pjenaste forme PS-a često u okolišu plutaju na vodenim površinama, dok se čvrsti PS s gustoćom nešto većom od gustoće vode (Tablica 2.1.) najčešće nalazi ispod površine.<sup>37</sup>

### 2.2.5. Poli (etilen-tereftalat)

Poli (etilen-tereftalat) jedan je od najšire korištenih polukristalnih termoplastičnih smola, te je jedini zasićeni polimerni materijal koji tvori vlakna i filmove od komercijalnog značaja. Primjenu pronalazi u tekstilnoj industriji za izradu sintetičkih vlakana, proizvodnju ambalaže, što uključuje posude za hranu i plastične boce, te mnoge druge proizvode.<sup>37,44</sup> PET ima dobra mehanička svojstva, toplinsko brtvljenje, izvrsna izolacijska svojstva za plinove poput kisika, ugljičnog dioksida, anhidrida, aromatičnih spojeva, dobru kemijsku otpornost, transparentnost, dimenzionalnu stabilnost, nisko upijanje vlage i dr.<sup>44</sup> Mnoštvo dobrih svojstava ide u prilog dramatičnom porastu uporabe ovoga materijala u posljednjih nekoliko desetljeća, a posebice do izražaja dolazi industrija plastičnih boca za koje je poznato da su redovita onečišćivala vodenog okoliša.<sup>37</sup> **Slika 2.10.** prikazuje kemijsku strukturu monomernu jedinicu PET-a.



**Slika 2.10.** Kemijska struktura monomera PET-a<sup>37</sup>

### 2.3. Mikroplastika u okolišu

Nakupljanje i fragmentacija plastike u okolišu jedna je od najistaknutijih i najdugotrajnijih promjena na površini našeg planeta. Unutar nekoliko desetljeća, otkako je započela masovna proizvodnja plastičnih proizvoda 50-ih godina prošlog stoljeća, ostatci plastičnih materijala nakupljaju se u kopnenim ekosustavima, oceanima, na obalama čak i najudaljenijih otoka, te morskim dubinama. Unatoč raširenom prepoznavanju problema, onečišćenje MP-om poput mnogih drugih antropogenih utjecaja na prirodne sustave još uvijek svakodnevno raste.<sup>33</sup> Zahvaljujući razvoju strožih zakona i propisa 1990. godine vezano uz odlaganje otpada te jačanja recikliranja plastičnih sirovina, količina plastičnog otpada koji ulazi u kopnene i morske sredine danas je donekle stabiliziran. Međutim, razgradnja već postojećeg plastičnog otpada u okolišu uzrok je ekološke pojave velikih količina mikroplastike.<sup>45</sup> MP se zbog svoje spore razgradnje u okolišu može generirati iz različitih izvora, odnosno mjesta, proizvoda ili ljudskih postupaka. Prilikom određivanja izvora u obzir je također važno uzeti prethodno opisanu podjelu na primarnu i sekundarnu mikroplastiku.<sup>46</sup> Tablica 2.2. prikazuje neke od glavnih izvora MP-e u okolišu, njihovu vrstu s obzirom na to radi li se o primarnoj ili sekundarnoj MP, te način unosa u okoliš.

**Tablica 2.2.** Glavni izvori, vrsta i način unosa MP-e u okoliš<sup>46</sup>

<b>IZVOR</b>	<b>NAČIN UNOSA U OKOLIŠ</b>	<b>VRSTA (primarna/sekundarna)</b>
<b>Industrijska proizvodnja</b>	vjetar, površinsko otjecanje	primarna
<b>Proizvodi za osobnu higijenu</b>	otpadne vode, kanalizacijski mulj	primarna
<b>Sintetička vlakna</b>	otpadne vode, kanalizacijski mulj	sekundarna
<b>Odlagališta otpada</b>	vjetar, površinsko otjecanje	sekundarna
<b>Graditeljstvo</b>	vjetar, površinsko otjecanje	sekundarna
<b>Abrazija guma</b>	površinsko otjecanje	sekundarna
<b>Luke, ribolov</b>	vjetar	sekundarna
<b>Sportski tereni</b>	vjetar, površinsko otjecanje	sekundarna

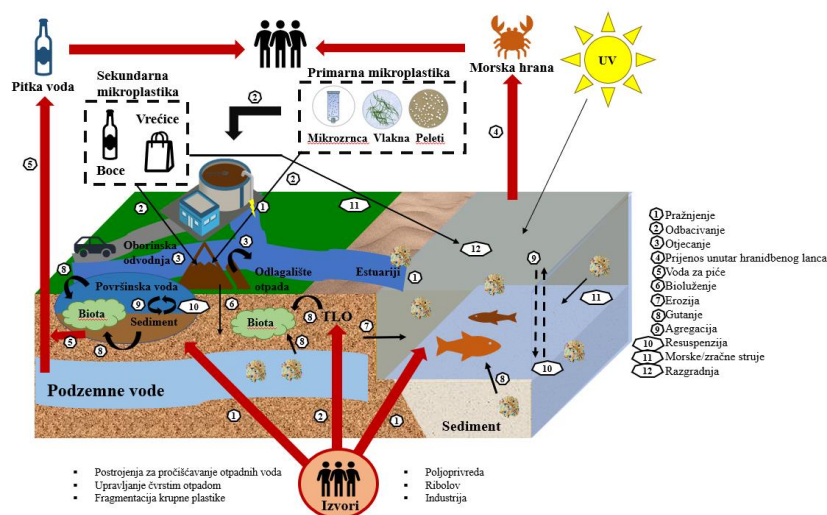
Također značajni putevi ulaska primarne i sekundarne MP-e u okoliš su postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda i primjena kanalizacijskog mulja. Velik broj postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda ima takozvani kombinirani kanalizacijski izljev, u kojemu uslijed obilnih padalina dolazi do pražnjenja budući da je dotok vode prevelik za regularno pročišćavanje.

U takvim slučajevima u podzemno vodno tijelo ispušta se mješavina kišnice i otpadne vode, pročišćena isključivo sedimentacijom.<sup>4</sup> Pretpostavka je da se zbog specifične veličine i gustoće, većina mikroplastičnih čestica neuspješno odvaja na ovakav način, te se nekontrolirano ispušta u okoliš. Nadalje, još veći problem onečišćenja MP-om predstavlja podatak da se samo oko 20% globalnih otpadnih voda pročišćava prije ispuštanja u prirodno vodeno tijelo.<sup>46</sup> Kanalizacijski mulj odnosi se na čvrsti materijal koji se filtrira iz otpadne vode tijekom procesa obrade zajedno s aktivnim muljem iz faze biološke obrade. On se kasnije može nanositi na polja kao gnojivo, odlagati na odlagalištima ili termički obrađivati. Korištenje kanalizacijskog mulja u poljoprivrednom sektoru u Europskoj uniji trenutno je regulirano jedino maksimalnim dopuštenim koncentracijama teških metala, dok za MP-u nisu utvrđena nikakva ograničenja. Stoga ne čudi procjena da se godišnje između 125 i 850 tona MP-e na milijun stanovnika ispusti u okoliš primjenom kanalizacijskog mulja na poljoprivredna zemljišta.<sup>46</sup>

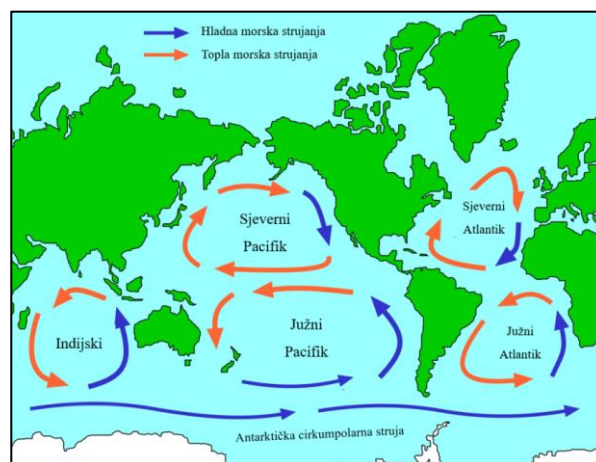
Nakon ulaska u okoliš, MP-a se distribuira na različite načine, te može imati mnoge transportne i transformacijske puteve<sup>45</sup>, što shematski prikazuje Slika 2.11. Transformacijski putevi MP-e u okolišu općenito se mogu podijeliti na vodene, kopnene i zračne. Osim navedenih okolišnih transporta, jednako je važan i onaj koji se odvija uz pomoć biote, odnosno svih živih organizama.<sup>46</sup> Čimbenici koji u vodenom okolišu određuju transport MP-e su površina i dubina vodenog tijela, strujanja vode i zraka, te gustoća i oblik plastičnih čestica. Prirodni sediment ima prosječnu gustoću u iznosu od  $2,65 \text{ kg/m}^3$ , dok čestice MP-e ovisno o vrsti mogu biti lakše (PE, PP) ili teže od vode (PS, PET, PVC), što za posljedicu ima plutanje ili sedimentaciju istih unutar vodenih tijela. One čestice koje plutaju bivaju nošene vodenim strujanjima, te rijekama dolaze do oceana ili se zadržavaju na barijerama poput brana. Što se tiče oblika, vjerojatnije je da će vlakna, fragmenti i nepravilne čestice biti povučene i zadržane sedimentom nego one sferičnog oblika. Nakon sedimentacije čestice u riječno korito, ona se može infiltrirati u prirodni sloj sedimenta ili biti ponovno remobilizirana u slučaju jačih protoka, primjerice tijekom poplava.<sup>32,45,46</sup> Shodno tome utvrđeno je kako sferične čestice milimetarske veličine unutar slatkovodnih sustava mogu putovati oko 200 km, dok čestice mikro i nanoplastike mogu doseći udaljenost i preko 900 km.<sup>47</sup>

U morske vodene sustave i oceane MP dolazi putem rijeka, obalnih ili morskih izvora podzemnih voda ili se može distribuirati s kopna putem morskih/zračnih strujanja i valova. Pod utjecajem toplih i hladnih morskih strujanja u svjetskim oceanima formiralo se pet takozvanih oceanskih vrtloga (Slika 2.12.) u kojima dolazi do akumulacije MP-e tijekom dužih vremenskih razdoblja.<sup>46,48</sup> Procjenjuje se da se ukupno plastično opterećenje u površinskom sloju oceana diljem svijeta kreće između 7000 i 35000 tona.<sup>45</sup>

Arktički led predstavlja još jedno značajno mjesto akumulacije, iz kojega otapanjem određene količine mikroplastičnog otpada također dopijevaju u oceane. Promjenom sadržaja soli i temperature morske vode, mijenja se i njezina gustoća, što isto tako pogoduje različitim kretanjima mikroplastičnih čestica unutar vodenog tijela, te pomicanju u dublje predjele. U morskim sedimentima MP je otkrivena do dubine od  $3,5 \pm 0,5$  cm, dok u obalnim područjima MP može biti privremeno pohranjena, ali se isto tako vratiti u morski okoliš putem valova, odnosno površinskog otjecanja ili vjetra.<sup>46</sup> Nadalje, prirodni procesi poput fotooksidacije, oksidacijske i hidrolitičke razgradnje, te biorazgradnje mogu snažno utjecati na sudbinu mikroplastike u vodenom okolišu. Oni potiču fragmentaciju plastičnog otpada na manje čestice i istovremeno mijenjaju svojstva i hidrodinamička ponašanja MP-e.<sup>45</sup>



Slika 2.11. Sudbina MP-e u okolišu<sup>45</sup>



Slika 2.12. Shematski prikaz pet svjetskih oceanskih vrtloga<sup>48</sup>

Tablica 2.3. prikazuje maksimalne koncentracije MP-e pronađene u različitim vodenim domenama okoliša.

**Tablica 2.3.** Maksimalne koncentracije MP-e pronađene u različitim vodenim sustavima okoliša<sup>46</sup>

Vodeni ekosustav	Naziv	Koncentracija MP-a u vodi
Rijeke	Los Angeles (SAD)	12 932 čestica/m <sup>3</sup>
	Rajna (Europa)	892 777 čestica/km <sup>2</sup>
Jezera	Three - Gorges – Dam (Kina)	12 611 čestica/m <sup>3</sup>
	Jezero Taihu (Kina)	6 800 000 čestica/km <sup>2</sup>
Oceani	Sjeveroistočni Pacifički	9 200 čestica/m <sup>3</sup>
	Izraelska obala na Sredozemnom moru	64 812 600 čestica/km <sup>2</sup>
Estuarij	Yangtze estuarij (Kina)	4 137 čestica/m <sup>3</sup>
Duboko more	Marijanska brazda (Tihi ocean)	13 510 čestica/m <sup>3</sup>
Polarni led	Arktička površinska voda	1,31 čestica/m <sup>3</sup>

Što se tiče zadržavanja na kopnu, mikroplastične čestice s većom gustoćom zadržavaju se u tlima, gdje mogu biti transportirane u dublje slojeve, a one s nešto nižom gustoćom podložnije su vjetru, površinskom otjecanju i dosezanju udaljenijih vodenih i kopnenih ekosustava. S druge strane, MP-e u ovom slučaju može poslužiti kao posrednik za transport nekih drugih bioakumulativnih i otrovnih tvari poput teških metala i organskih onečišćivala. Neki od spomenutih spojeva u mikroplastične se čestice namjerno dodaju tijekom proizvodnje, dok se druge na njihovoj površini mogu ne ciljano adsorbirati.<sup>45</sup>

Onečišćenje zraka MP-om ostvaruje se uglavnom djelovanjem vjetra, a kao neke od glavnih izvora onečišćenja valja istaknuti cestovnu prašinu, nastalu abrazijom guma i tekstilna vlakna (Tablica 2.2.). Čestice se na ovaj način mogu prenositi na velike udaljenosti i tako doprijeti i do najudaljenijih područja poput Arktika. Osim toga one se u atmosferi tijekom kišnih ili snježnih perioda mogu zajedno s padalinama vratiti u kopnene ili morske predjele.<sup>45</sup>

## 2.4. Toksikologija

Toksikologija je široko definirana kao znanost o otrovima, odnosno tvarima koje mogu imati ciljano ili slučajno štetno djelovanje na žive organizme. Međutim, riječ otrov u ovom kontekstu podrazumijeva sveobuhvatno proučavanje štetnih učinaka svih lijekova, kemijskih tvari, okolišnih onečišćivala poput pesticida, endokrinih disruptora, ksenobiotika i dr.<sup>49</sup>



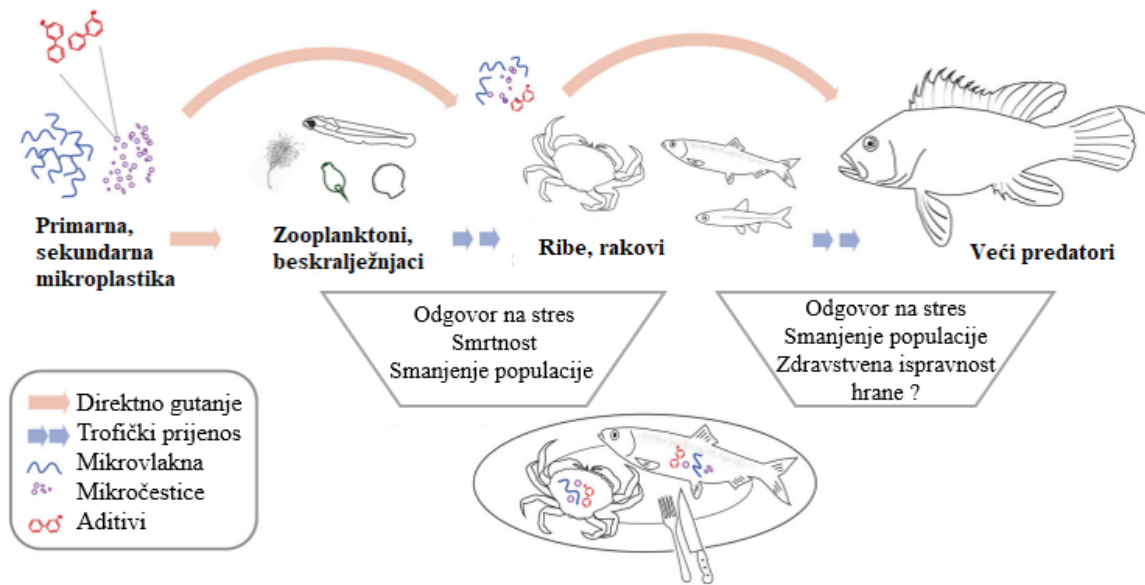
Toksikološka ispitivanja provode se sa svrhom karakterizacije potencijalno štetnih učinaka na zdravlje ljudi, životinja ili okoliša, zbog čega se ovo istraživačko područje smatra produženom rukom medicine, čije je dubinsko razumijevanje ključno za znanstvenike i liječnike diljem svijeta.<sup>49,50</sup>

Ekotoksikologija je suvremena znanstvena disciplina koja se definira kao poddisciplina toksikologije okoliša, te objedinjava znanja sa područja ekologije i toksikologije.<sup>51</sup> Za razliku od ljudske toksikologije kojoj je cilj istraživanja jedne vrste (npr. čovjeka) ili više vrsta (čovjek, kućni ljubimci ili stoka) zaštita na razini pojedinca, svrha ekotoksikoloških ispitivanja je zaštita autohtone flore i faune na razini populacija, zajednica i ekosustava. Predstavljenim znanstvenim područjima stoga se pristupa iz različitih perspektiva. Tako primjerice neke toksikološke bolesti koje se javljaju u niskoj frekvenciji poput karcinoma, neće biti važne u kontekstu ekotoksikologije. Međutim, toksikološki događaji koji rezultiraju mortalitetom i padom reprodukcije od najveće su važnosti za područje ekotoksikologije, budući da su izravno povezani s održavanjem populacije.<sup>51</sup> Nadalje, glavni izazov toksikologije predstavlja razumijevanje učinka neke štetne tvari dovoljno detaljno da omogući zaštitu svakog pojedinca čak i od kroničnih toksikoloških posljedica koje se rijetko javljaju. S druge strane, ekotoksikologija za cilj ima zaštitu svih ne ciljanih vrsta u okolišu.<sup>51</sup>

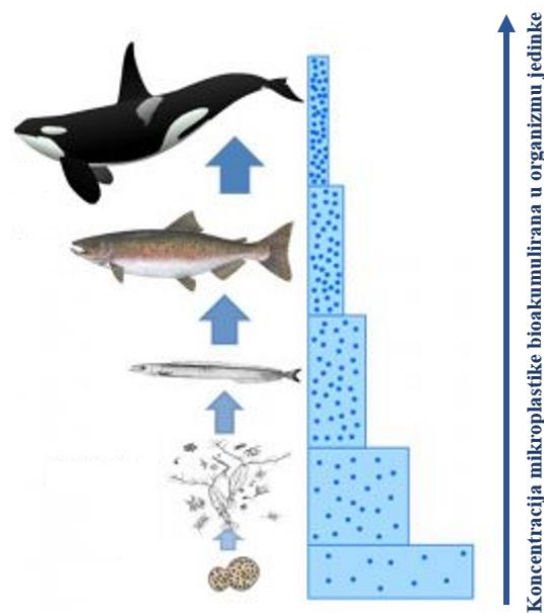
#### **2.4.1. Utjecaj mikroplastike na okolišne organizme**

Razmatrajući sudbinu MP u okolišu u obzir je također vrlo važno uzeti ulogu živoga svijeta. Ukupni utjecaj MP na okolišne organizme pod utjecajem je same biorasploživosti, koja u velikoj mjeri ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima poput veličine čestica i gustoće polimernog materijala. Smanjena veličina mikroplastičnih čestica omogućava izravno gutanje istih širokom rasponu organizama u nekom ekosustavu. Stoga se može izvesti zaključak da se potencijalna akumulacija i biorasploživost MP-e u hranidbenim lancima povećava s smanjenjem veličine čestica.<sup>52</sup> Niža trofička bića poput zooplanktona i beskralježnjaka koji žive u svim okolišnim segmentima, gutaju mikroplastične čestice budući da ih ne razlikuju od planktona kojima se hrane, te putem hranidbenog lanca ostvaraju trofički prijenos i bioakumulaciju istih unutar ostalih živih organizama.<sup>53</sup> Slika 2.13. dodatno pojašnjava prethodni navod, te prikazuje ulazak, kretanje i bioakumulaciju različitih vrsta mikroplastičnih čestica kroz hranidbeni lanac. Nadalje, štetni utjecaj MP-e povećava se kada niža trofička bića koja sadrže određenu koncentraciju bioakumulirane MP-e u svome organizmu postaju hrana životinjama u višim redovima hranidbenih lanaca poput ptica, gmazova, sisavaca i dr., prilikom čega dolazi do biomagnifikacije.

Biomagnifikacija je pojam koji označava akumulaciju određene štetne tvari kroz hranidbeni lanac, što na posljepku rezultira time da krajnji konzumenti u sebi bioakumuliraju i najveću koncentraciju štetnih tvari (Slika 2.14.). Upravo je biomagnifikacija jedan od razloga zbog kojega je pitanje onečišćenja MP-om vrlo važno ljudskom rodu, budući da je čovjek u velikom broju hranidbenih lanaca posljednji konzument.<sup>54</sup>



Slika 2.13. Shematski prikaz kretanja i bioakumulacije MP-e kroz hranidbeni lanac<sup>55</sup>



Slika 2.14. Shematski prikaz biomagnifikacije MP-e<sup>56</sup>

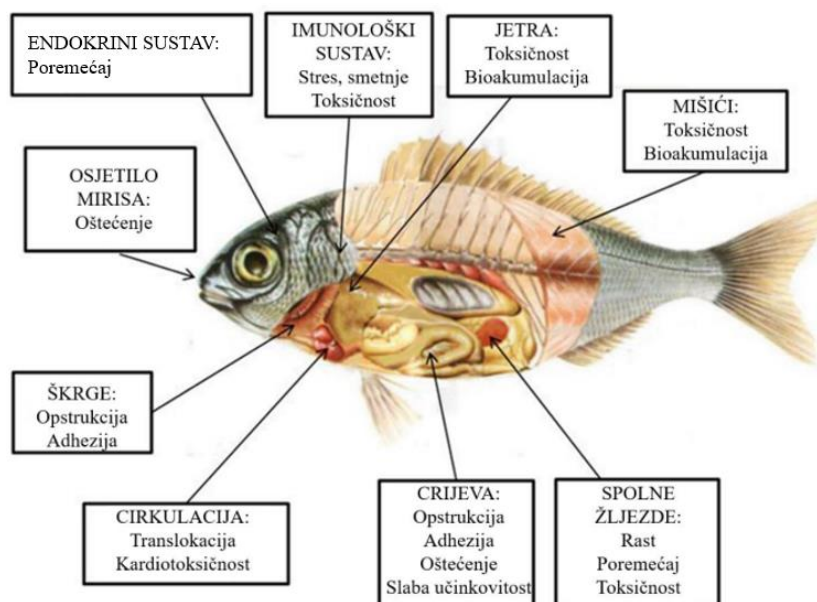
Shodno tome, različitim istraživanjima dokazana je prisutnost bioakumulirane MP-e u probavnom traktu, jetri, škragama, lizosomskom sustavu, ali i drugim tkivima i stanicama riba, morskih rakova, ptica, kornjača, kitova, morskih lavova i meduza.<sup>45</sup> MP u živim organizmima može predstavljati fizičku opasnost od unutarnje abrazije ili zatvaranja probavnog sustava, što na kraju dovodi do izgladnjivanja. Međutim, veću opasnost od one fizičke predstavlja povećanje bioraspoloživosti drugih onečišćujućih i toksičnih tvari iz okoliša adsorbiranih na površinu mikroplastičnih čestica.<sup>45,46</sup> Aditivi i monomeri, uključujući bisfenol A (BPA), te organotoksini i ftalati s utvrđenim biološki štetnim svojstvima poput reproduktivne toksičnosti, mutagenosti i karcinogenosti, koriste se za proizvodnju plastike. Stoga se gutanjem MP-e ti spojevi potencijalno mogu osloboditi od samog polimernog materijala i apsorbirati u organizam. Osim toga, plastika na sebe također može adsorbirati hidrofobne postojeće organske onečišćujuće tvari (POPs) od kojih su neki predstavnici diklordifeniltrikloretan (DDT), poliklorirani bifenili, policiklički aromatski ugljikovodici, dioksini i dr.<sup>55</sup> MP ove onečišćujuće tvari na sebe adsorbira u koncentracijama do milijun puta većim od okolnih voda, zahvaljujući velikom omjeru površine i volumena i hidrofobnoj prirodi.<sup>55</sup> Međutim, za okolišne organizme ovo vezivanje može biti vrlo nepovoljno i štetno, budući da je poznato da POPs-ovi čak i u vrlo niskim koncentracijama reda veličine ng/L imaju subletalne učinke na rast, reprodukciju i ponašanje živih jedinki.<sup>55</sup>

Tablica 2.4. daje uvid u otkrivene koncentracije i utjecaje pojedinih vrsta mikroplastičnih čestica na određene okolišne organizme.

**Tablica 2.4.** Koncentracije i utjecaj različitih vrsta MP-e na određene okolišne organizme<sup>28,54</sup>

Organizam	Vrsta MP-e	Koncentracija	Utjecaj
<b>Rak</b> ( <i>Calanus helgolandicus</i> , <i>C. cristatus</i> , <i>Euphasia pacifica</i> )	PS	75 čestica mL <sup>-1</sup>	Smanjeno hranjenje, reprodukcija, proizvodnja jajašaca
<b>Školjke</b> ( <i>Mytilus edulis</i> , <i>Crassostrea gigas</i> / <i>Macoma bathica</i> , <i>Mytilus trossulus</i> )	PS/PE	250 čestica mg L <sup>-1</sup>	Akumulacija u mekom tkivu
<b>Mikroalge</b>	PS	-	Smanjen rast
<b>Morska riba</b> ( <i>Pomatoschistus microps</i> , <i>Artemia nauplii</i> , <i>Danio rerio</i> , <i>Oryzias latipes</i> )	PS/PE	1,2×10 <sup>6</sup> čestica mg <sup>-1</sup>	Patološki stres, upala Jetre, oksidativni stres, nakupljanje lipida u jetri
<b>Kitovi</b> ( <i>Balaenoptera physalus</i> , <i>Mesoplodon mirus</i> , <i>Megaptera novaeangliae</i> )	PE/PP/PVC/PET	-	Povećanje toksikoloških efekata
<b>Zooplankton</b> ( <i>Centropages typicus</i> , <i>Daphnia magna</i> )	PS	400 mg L <sup>-1</sup>	Smanjeno hranjenje algi, imobilizacija
<b>Morske kornjače</b> ( <i>Caretta caretta</i> )	PP/PE	96,2% progutanih čestica činila je MP-a	Povećanje toksikoloških efekata

Nakon što se navedene štetne tvari adsorbirane na površinu čestica MP-e desorbiraju u organizmu, slijedi njihova translokacija u krvožilni sustav, crijevni epitel, tkiva i organe poput jetre, škrge, mišića i spolnih žlijezda. Tamo se potom ostvaruje njihov toksični učinak koji može manifestirati kao fiziološki stres, morfološke abnormalnosti, imobilizacija, neurotoksičnost, oksidativna oštećenja, poremećaji enzimske regulacije, smanjena stopa rasta, promijenjen imunološki odgovor, genotoksičnost te mortalitet.<sup>57</sup> Tako se primjerice teški metali, poput srebra, nakupljaju u mozgu i mišićnom tkivu, uzrokujući neurotoksičnost, oksidativna oštećenja i enzimsku disregulaciju. S druge strane, bioakumulirani fenantren i njegovi nusproizvodi toksični su za zglobne sustave u kojima mogu uzrokovati imobilizaciju.<sup>57</sup> Slika 2.15. prikazuje opisane štetne učinke koje MP može imati na različite organske sustave živih organizama.



Slika 2.15. Toksični učinci mikroplastike na organske sustave riba<sup>58</sup>

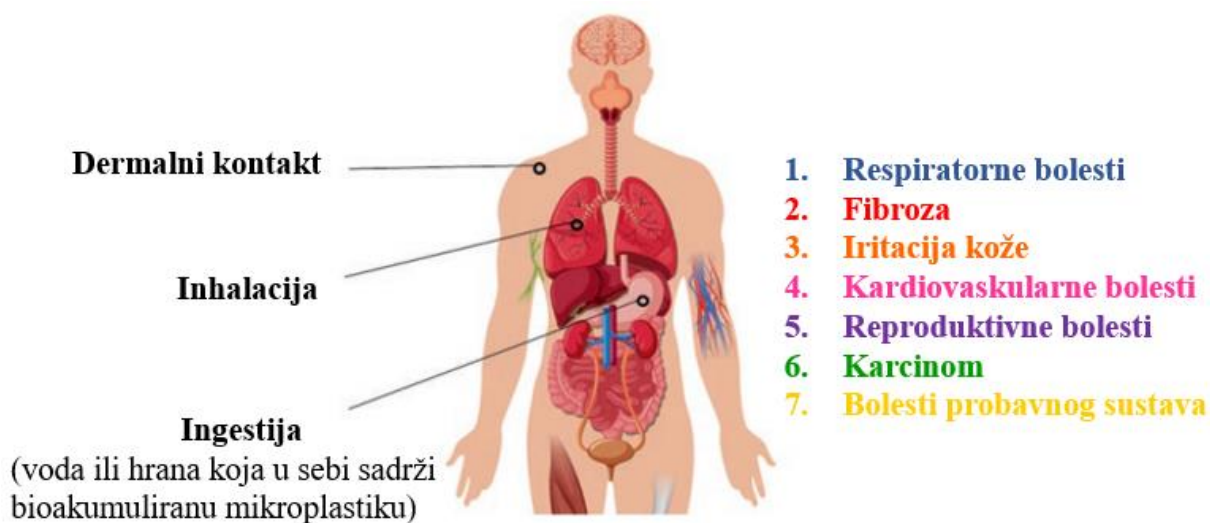
#### 2.4.2. Utjecaj mikroplastike na čovjeka

Najznačajniji putevi izlaganja čovjeka štetnim utjecajima MP-e jesu dermalni, inhalacijski, te putem pitke vode ili hranidbenog lanca, konzumacijom živih organizama koji u sebi sadrže bioakumulirane mikroplastične čestice, od čega najveći značaj imaju ribe i školjke.<sup>57</sup> Procijenjeno je da prosječan stanovnik Europe godišnje u sebe unese čak i do 11 000 čestica MP-e, konzumacijom ribe i drugih morskih plodova.<sup>54</sup> Nadalje, oko 700 čestica MP-e (uglavnom PET i PE)/kg otkriveno je u 15 marki komercijalnih morskih soli. Stoga nije

neobično da je nedavnim studijama prisutnost 9 različitih vrsta MP-e dokazana u uzorcima ljudske stolice, što je potvrdilo njezinu prisutnost u ljudskom organizmu.<sup>57</sup>

MP u tijelu čovjeka može prodrijeti kroz dišne puteve i pluća, u kojima potom može izazvati kronične ili akutne upale. Neka istraživanja opisala su i kancerogena svojstva plastičnih mikrovlakana na plućne stanice.<sup>57</sup> Također je dokazano da se toksičan utjecaj MP-e na dišni sustav može očitovati kroz pojavu astme, difuzne intersticijalne fibroze, ekstrinzičnog alergijskog alveolitisa, upalne i fibrozne promjene u bronhijalnom i peribronhijalnom tkivu (kronični bronhitis) te lezija interalveolarnih septa. Izloženost zraku onečišćenog mikroplastičnim česticama kod trudnica, za posljedicu može imati povećanu osjetljivost i upalu dišnih putova u novorođenčadi.<sup>24</sup> Osim toga, mikroplastične čestice se mogu translocirati iz stanica do različitih organskih sustava poput limfnog i krvožilnog, te posljedično imati neizravan utjecaj na imunološki sustav.<sup>57</sup> Njihovo premještanje kroz organizam u sekundarne ciljane organe uvelike ovisi o samom površinskom naboju, hidrofobnosti i površinskoj funkcionalizaciji samih mikroplastičnih čestica. Tako je dokazano da mikročestice PE mogu translocirati u limfne čvorove, te se u nekim slučajevima pronaći u slezeni i jetri<sup>24</sup>, dok je za PS otkriveno kako može izazvati visoku proizvodnju reaktivnih kisikovih vrsta, posljedično uzrokujući oksidativni stres u moždanim i epitelnim ljudskim stanicama.<sup>54</sup> Također je dokazano da izlaganje MP-i dovodi do poremećaja staničnih procesa i tkiva u situacijama kada su slomljeni zglobovi koljena ili kuka pacijenata zamijenjeni plastičnim implantatima.<sup>45</sup> Mikroplastične čestice često su vrlo otporne na biorazgradnju, odnosno uništenje *in vivo*, zbog čega se dugo zadržavaju u organizmu dok na posljetku ne budu uklonjene putem gastrointestinalnog trakta, urina, cerebrospinalnom tekućinom, žuči ili mlijekom kod dojilja.<sup>24</sup> Međutim, osim samog štetnog utjecaja MP-e na čovjeka zdravstveni rizik i opasnost predstavljaju i prethodno opisane štetne tvari, koje se adsorbiraju na površinu mikroplastičnih čestica ili nalaze u njihovom sastavu, a kasnije u organizmu otpuštaju i djeluju vrlo toksično. Shodno tome, dugotrajna konzumacija vode onečišćene plastifikatorima i ftalatom, na razinama iznad maksimalne dozvoljene granice Američke agencije za zaštitu okoliša (USEPA) u iznosu od < 6 µg/L za posljedicu može imati jetrene i reproduktivne komplikacije.<sup>57</sup> Dermalni put izlaganja mikroplastičnim česticama također se često dovodi u korelaciju s utjecajem plastičnih monomernih jedinica, ftalata, endokrinih disruptora i bisfenola A (BFA) na ljudsko zdravlje. MP u kontaktu s kožom predstavlja manje relevantan put izloženosti s obzirom na veličinu čestica, zbog čega u ovom pogledu utjecaj nanoplastike ima veći značaj. Plastične mikro i nanočestice kroz kožu mogu prodrijeti putem tkanina, prašine, vode, te proizvoda za osobnu

njegu.<sup>24</sup> Slika 2.16. prikazuje opisane puteve izlaganja i štetne utjecaje MP-e na zdravlje čovjeka.



**Slika 2.16.** Putevi izlaganja i štetni utjecaji mikroplastike na ljudsko zdravlje<sup>24</sup>

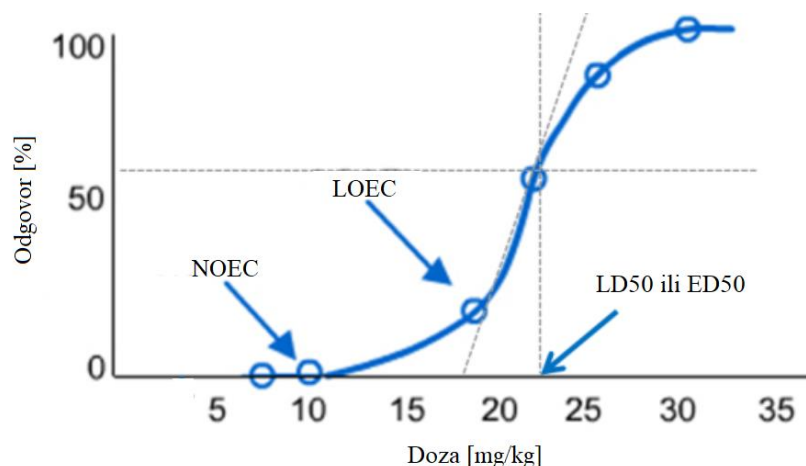
Zasad ne postoji dovoljan broj studija koje su ispitale potencijalne toksične učinke okolišno prisutnih čestica MP-e na ljudsko zdravlje. Stoga je u sklopu novijih istraživanja potrebno opširnije proučiti sve procese kojima plastične čestice u okolišu podliježu, njihovo kretanje kroz okolišne segmente i hranidbenu mrežu, te direktan utjecaj na humane stanice i medicinska stanja koja se u ljudskih pacijenata mogu razviti uslijed izlaganja ovim onečišćivalima. Nedostatak čvrstih dokaza da plastika i njezini sitniji fragmenti dovode do izravnih štetnih učinaka na ljude može pogodovati kontinuiranoj proizvodnji, potrošnji i odbacivanju plastičnog otpada u okoliš.<sup>57</sup>

### 2.4.3. Testovi toksičnosti

Tehnološki i znanstveni napredak doveo je do povećanog znanja o uzgoju različitih životinjskih vrsta i provođenju eksperimenata na istima, što se naziva *in vivo* istraživanjima. *In vivo* toksikološka ispitivanja predstavljaju tradicionalan pristup, koji je do danas sastavni dio osiguranja kvalitete i učinkovitosti farmaceutskih proizvoda, cjepiva i različitih bioloških proizvoda. Osim toga, *in vivo* ispitivanja znanstvenicima su omogućila dubinsko razumijevanje fiziologije, anatomije, molekularne i stanične biologije.<sup>49</sup> Ovaj pristup svoj korijen ima u alatima i tehnikama koje su bile dostupne prije nekoliko desetljeća, a temelji se na pretpostavci da su štetni učinci vidljivi pri primjeni visokih doza na životinjskim ispitnim organizmima relevantni za različite scenarije ljudske izloženosti, čak i pri mnogo nižim koncentracijama i

drugačijim putevima izlaganja. Osim glodavaca, za ispitivanje štetnih učinaka na ljudsko zdravlje kao ispitni organizmi često su korištene i veće životinje poput zečeva, pasa i primata. U kontekstu ispitivanja za zaštitu okoliša s ciljem određivanja učinaka na više taksonomskih razina, testiranje se obično provodi na algama, bakterijama, biljkama, beskralježnjacima, ribama, te na insektima (npr. pčelama), crvima, vodozemcima i pticama.<sup>50</sup> Međutim, sa svrhom uspostavljanja ravnoteže između životinjske etike i žrtvovanja životinja neophodnog za postizanje znanstvenih i medicinskih napredaka, usvojene su brojne političke smjernice u pogledu dobrobiti životinja od cjelokupne znanstvene i medicinske zajednice.<sup>49</sup> Shodno tome razvijene su druge istraživačke metode, poput ispitivanja *in vitro*. Toksikologija *in vitro* testiranja temelji na provođenju eksperimenata na dijelovima tkiva, izoliranim organima, izoliranim primarnim staničnim kulturama, staničnim linijama, pa čak i substaničnim frakcijama mitohondrija i membrana. Osim dobrobiti životinja, ovakav način toksikoloških ispitivanja nosi broj prednosti poput vremenske i novčane uštede, jednostavnosti eksperimentalnog postavljanja i dr.<sup>49</sup>

Ključni parametar *in vivo* i *in vitro* toksikoloških ispitivanja je modeliranje takozvane krivulje *doza-odgovor* (Slika 2.17.). Ova krivulja predstavlja odnos između veličine odgovora na toksično djelovanje neke štetne tvari i opsega izlaganja istoj, te je važna za utvrđivanje deskriptora doza.<sup>59</sup> Neki od deskriptora doza koji se uobičajeno koriste u toksikološkim ispitivanjima, te za klasifikaciju opasnosti i procjenu rizika su: letalna doza koja izazva smrt kod 50% populacije (LD<sub>50</sub>), efektivna doza koja je izazvala učinak na 50% populacije (ED<sub>50</sub>), najviša koncentracija tvari bez vidljivog štetnog učinka (NOEC), najniža koncentracija tvari s vidljivim štetnim učinkom (LOEC) i dr.<sup>60</sup> Međutim određivanje nekih od navedenih deskriptora doza poput LD<sub>50</sub>, zahtjeva provođenje *in vivo* istraživanja, te se u modernije vrijeme vrlo često zamjenjuje s onima do čijeg se iznosa dolazi *in vitro* testovima. Primjer jednog takvog deskriptora je koncentracija štetne tvari koja inhibira 50% stanične populacije (IC<sub>50</sub>).<sup>49,60</sup> Opisani deskriptori doza prikazani su na Slika 2.17.



**Slika 2.17.** Općeniti prikaz krivulje *doza-odgovor* s naznačenim parametrima<sup>60</sup>

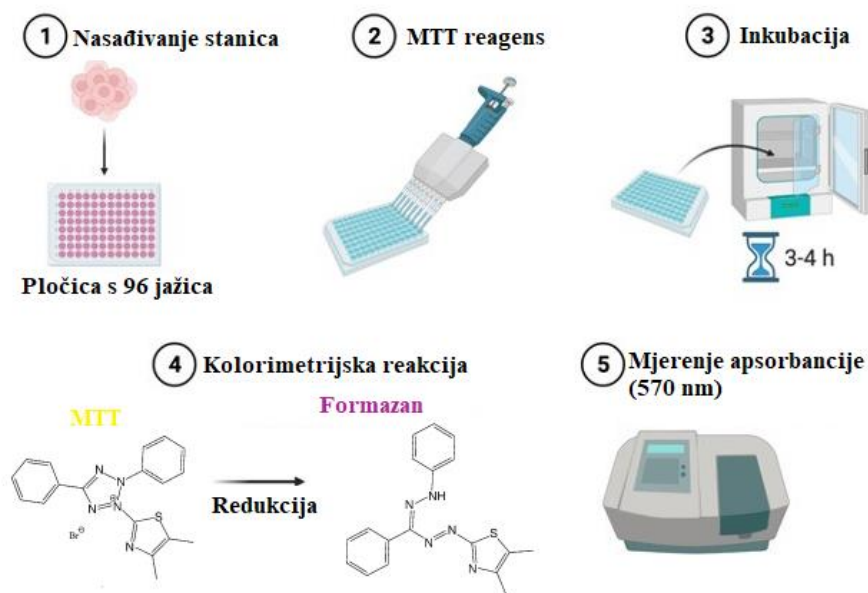
Najšire korištenu *in vitro* metodu predstavlja ona sa staničnim kulturama. Eukariotske stanice sisavaca mogu se lako uzgajati i širiti kao suspenzijske ili adherentne kulture. Tehnike rada sa staničnim kulturama uključuju rast izoliranih stanica životinjskog ili ljudskog porijekla izvan tijela živih organizama, odnosno na staklenom ili plastičnom posuđu u vlažnim inkubatorima opskrbljenim ugljikovim dioksidom i kisikom prema potrebi.<sup>49</sup> Stanice koje se na ovaj način uzgajaju mogu se općenito podijeliti na dvije vrste: primarne i immortalizirane stanične kulture. Kada je riječ o primarnoj staničnoj kulturi radi se o stanicama sakupljenima iz svježih životinjskih tkiva. Međutim, primarne kulture teško je održavati, budući da imaju visoku metaboličku te nisku proliferacijsku (umnažajuću) stopu, sklone su onečišćenju te zahtijevaju stručnost u rukovanju. Ipak, one predstavljaju kemijski osjetljiviji *in vitro* modelni sustav zbog čega daju rezultate sličnije onima dobivenim *in vivo* ispitivanjima.<sup>49</sup> Immortalizirane stanične linije izvorno su primarne stanice, na koje je namjerno primijenjena genetska modifikacija sa svrhom nadjačavanja nedostataka primarnih staničnih kultura. Uvođenje onkogena u staničnu kulturu omogućuje brzu proliferaciju stanica i otpornost na diferencijacije. Međutim, genetskom manipulacijom mijenjaju se izvorna svojstva zbog čega se dobiveni odgovor s ovim tipom stanica može znatno razlikovati od onoga dobivenog *in vivo* ispitivanjima. Stoga se ovaj tip staničnih kultura široko koristi za jednostavnije toksikološke studije.<sup>49</sup>

#### 2.4.3.1. Test redukcije tetrazolijeve soli (MTT)

MTT test pripada *in vitro* studijama i koristi se za utvrđivanje stanične metaboličke aktivnosti kao pokazatelja vitalnosti, proliferacije i citotoksičnosti. Ovaj kolorimetrijski test temelji se na redukciji žute tetrazolijeve soli (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid ili MTT) u ljubičaste kristale formazana putem metabolički aktivnih stanica.<sup>61</sup> Do



promjene boje dolazi budući da žive stanice sadrže enzime oksidoreduktaze (mitohondrijalne sukcinat dehidrogenaze) ovisne o NAD(P)H, koji reduciraju MTT u formazan. Potom se kristali formazana otapaju u pogodnom organskom otapalu poput DMSO-a, a rezultirajuća otopina kvantificira se mjerenjem apsorbancije na 500-600 nm pomoću spektrofotometra. Što je otopina tamnija i mjerenjem daje veće iznose apsorbancije, to je veći broj metabolički aktivnih, odnosno živih stanica.<sup>62,63</sup> **Slika 2.18.** shematski prikazuje opisani princip i tijek MTT testa.



**Slika 2.18.** Shematski prikaz tijeka MTT testa<sup>64</sup>

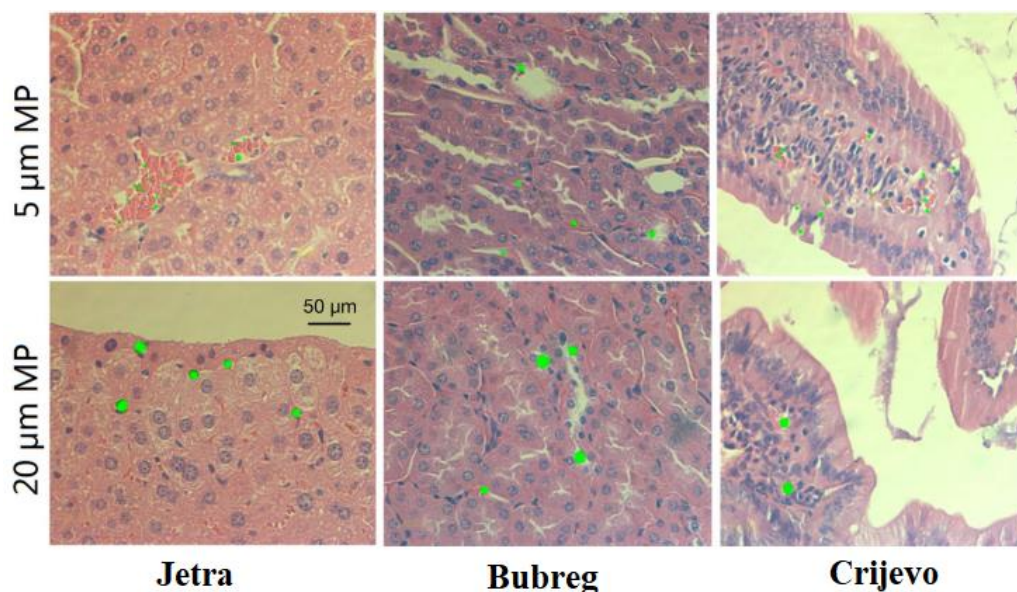
Prednost ovog kvantitativnog *in vitro* testa je brzo i praktično rukovanje velikim brojem uzoraka. Primjenjuje se za više različitih namjena, a neke od njih su: kvantifikacija i određivanje održivosti stanica, mjerenje proliferacije stanica kao odgovor na faktore rasta, citokine i hranjive tvari, mjerenje citotoksičnosti te proučavanje aktivacije stanica.<sup>62</sup> Primjerice, prilikom utvrđivanja citotoksičnosti stanice se u svojoj fazi ekspanzijskog rasta izlažu nekoj štetnoj, odnosno potencijalno citotoksičnoj tvari, te se nakon određenog vremena izlaganja provodi MTT test, kojim se na opisani način utvrđuje broj preživjelih stanica.<sup>64</sup>

#### 2.4.4. *In vivo* ispitivanje toksičnosti mikroplastike

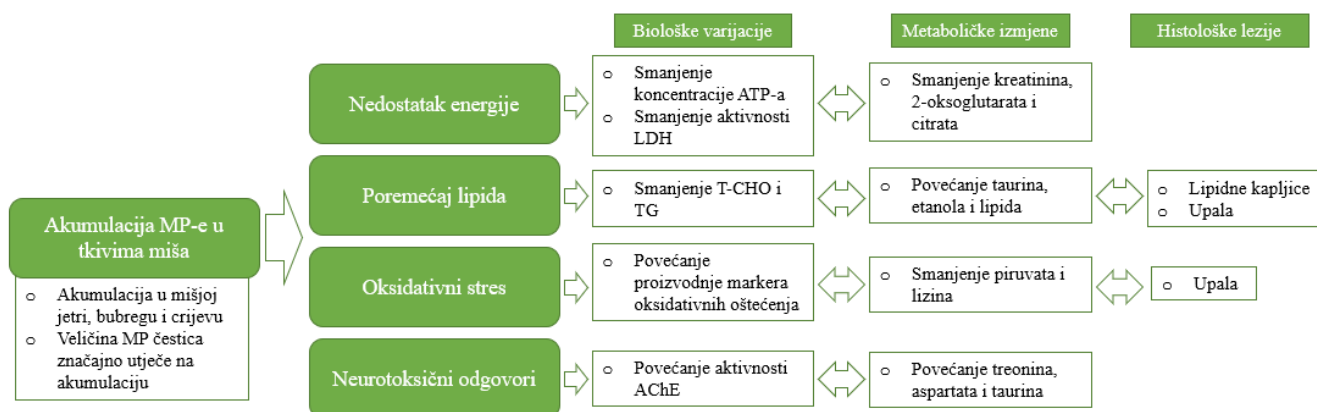
Dosadašnja istraživanja o toksičnim učincima MP-e pretežito su se usredotočila na vodene organizme, te je utvrđeno kako MP u tkivima živih organizama može imati brojne štetne učinke poput fizičkih ozljeda, smanjenja aktivnosti hranjenja, inhibicije rasta i razvoja, nedostatka energije, imunoloških odgovora, razvoja oksidativnog stresa, neurotoksičnih odgovora, metaboličkih poremećaja i genotoksičnosti. Međutim, opširnije studije o nakupljanju čestica MP-e u tkivima sisavaca i posljedičnom negativnom utjecaju zasad nedostaju.<sup>65</sup> Štoviše,

budući da su ljudski geni sličniji onima drugih sisavaca nego vodenih organizama, podaci o akumulaciji MP-e u tkivima sisavaca neophodni su za procjenu rizika koju ova okolišna onečišćivala imaju na zdravlje čovjeka.<sup>66</sup> Stoga je u nastavku rada predstavljen dio dosadašnjih saznanja na području *in vivo* ispitivanja toksičnosti MP-e na miševima kao ispitnim organizmima.

*In vivo* ispitivanja na miševima provode se na način da se ispitne organizme određenom koncentracijom i veličinom čestica MP-e izlaže oralnom gavažom, odnosno hranjenjem. Stoga je akumulacija MP-e u probavnom sustavu najvjerojatnija. Međutim, također je utvrđeno kako se putem krvožilnog sustava čestice MP-e mogu transportirati u druga tjelesna tkiva ispitnih organizama.<sup>65</sup> Potvrdu o navedenom transportu i akumulaciji predstavlja Slika 2.19., na kojoj je vidljivo zaostajanje fluorescentno označenih čestica MP-e (PS) dviju veličina (5  $\mu\text{m}$  i 20  $\mu\text{m}$ ) u mišjem tkivu jetre, bubrega i crijeva. Osim toga, istraživanjem je utvrđeno kako je raspodjela MP-e u tkivima djelomično određena veličinom čestica, pa dok se veće čestice (20  $\mu\text{m}$ ) jednoliko raspoređuju po tkivima, one manje veličine (5  $\mu\text{m}$ ) pokazuju veću akumulaciju u crijevima. Isto tako, utvrđeno je kako čestice manje veličine akumuliraju u znatno većim koncentracijama. Stoga se može zaključiti da su akumulacija i distribucija u tkiva u obrnutoj korelaciji s veličinom čestica.<sup>65</sup> Što se tiče utjecaja na zahvaćena tkiva, uočeno je da čestice MP-e uzrokuju poremećaj energetskeg metabolizma na način da smanjuju koncentraciju ATP-a i naglo povećavaju aktivnosti LDH u jetri. Aktivnost koja potvrđuje prethodni navod je povećan unos hrane u organizam tretiran visokim dozama MP-e, uz smanjenu relativnu težinu jetre. Nakupljanje MP-e u tkivima također je uzrokovalo poremećaj metabolizma lipida, što se očitovalo kao značajno smanjenje ukupnog kolesterola (T-CHO) i razine triglicerida (TG), te nakupljanje lipidnih kapljica u jetri. Lipidne kapljice imaju važnu ulogu u regulaciji unutarstanične pohrane lipida i metabolizmu lipida, te predstavljaju često uočen fenotip u upalnim stanjima. Nadalje, izloženost MP-i je u tkivima miša izazvala povećanu proizvodnju osjetljivih markera za procjenu ranih oksidativnih oštećenja. Svi ti enzimi odgovorni su za eliminaciju različitih reaktivnih kisikovih vrsta (ROS). Shodno tome, uočene su i promjene u proizvodnji metabolita koji djeluju kao endogeni antioksidansi i prirodno štite organizam od različitih toksičnih tvari. Kao dokaz neurotoksičnog djelovanja mikroplastičnih čestica PS-a u jetri je dokazana aktivnost najčešćeg biomarkera neurotoksičnosti (AChE), te poremećaji u proizvodnji metabolita koji djeluju kao neurotransmisijske tvari.<sup>65</sup> Slika 2.20. shematski prikazuje opisane toksične učinke mikroplastičnih čestica polistirena na miševima, te potencijalno druge sisavce, uključujući i čovjeka.

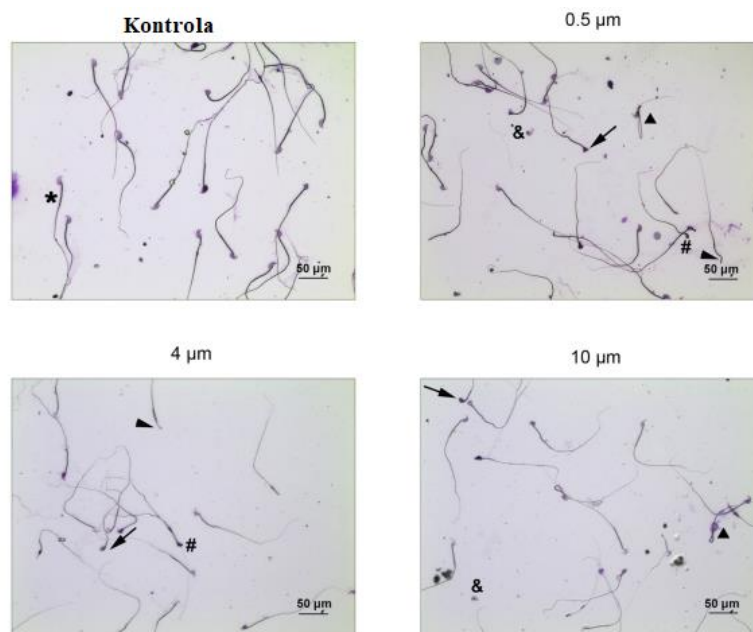


**Slika 2.19.** Akumulacija čestica MP-e različitih veličina u tkivima miša nakon 28 dana<sup>65</sup>



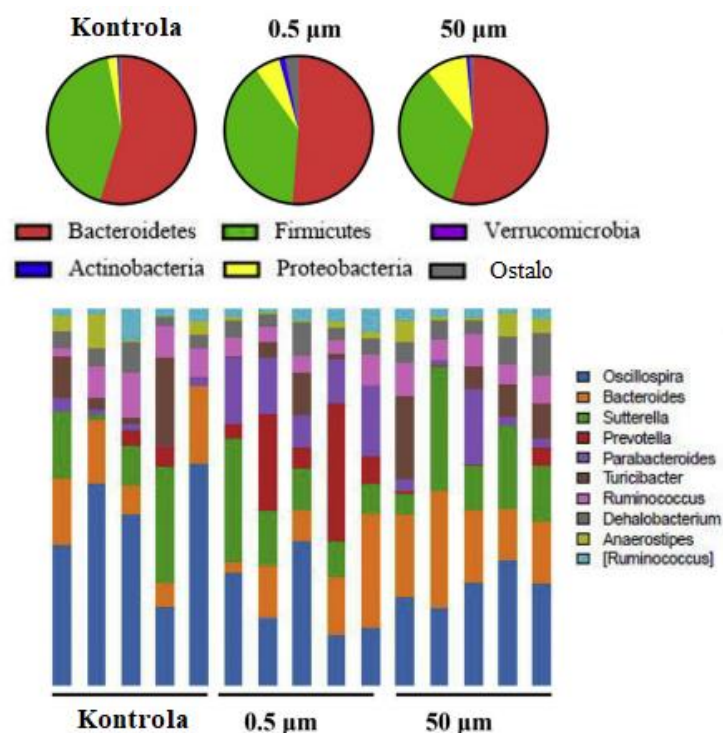
**Slika 2.20.** Shematski prikaz *in vivo* toksičnih učinaka MP-e na miševе<sup>65</sup>

Za mikroplastične čestice PS-a također je utvrđeno da uzrokuju reproduktivnu toksičnost u miševa.<sup>66,67,68</sup> U muških jedinki došlo je smanjenja kvalitete i povećanja stope abnormalnosti sperme<sup>67</sup>, što prikazuje Slika 2.21. Uslijed izlaganja PS-MP smanjuje se razina testosterona te dolazi do poremećaja takozvane krvno-testisne barijere, koja predstavlja posebnu mikrookolinu u tijelu muških jedinki miševa za proizvodnju sperme. Osim toga, dokazano je da MP uzrokuje i upalu testisa što također negativno djeluje na spermatogenezu.<sup>66,68</sup> Isto tako uočeno smanjenje tjelesne težine testnih organizama dovedeno je u korelaciju s veličinom mikroplastičnih čestica. Shodno tomu, utvrđeno je kako se veće čestice teže uklanjaju iz organizma, posljedično opterećujući gastrointestinalni trakt, što utječe na apsorpciju hrane i rezultira smanjenjem težine.<sup>67</sup>



**Slika 2.21.** Utjecaj PS čestice MP-e na muške spolne stanice miševa: morfologija zdravog spermija (\*), gubitak akrosoma (strelica), cefalija (mala glava) (#), acefalija (bez glave) (crni vrhovi strelica), cervikalni pregib (trokut) i spermiji bez repa (&)<sup>67</sup>

Osim reproduktivne toksičnosti, *in vivo* istraživanjima na miševima potvrđena je i toksičnost MP-e na probavni sustav.<sup>69,70</sup> Mikrobiološki sastav crijeva ima vrlo važnu ulogu u formiranju metabolizma organizma, te posljedično regulaciju tjelesne težine. Pod utjecajem MP-e, konkretnije PS-a<sup>69</sup> i PE-a<sup>70</sup>, dolazi do značajne promjene u mikrobiološkom sastavu crijeva, što utječe na metabolizam i zdravlje dotičnog ispitnog organizma. Tako je primjerice otkriveno da PS značajno smanjuje brojnost *Firmicutes* bakterijske kulture, koja je odgovorna za apsorpciju hranjivih tvari i korelira s razvojem pretilosti. Još neki ključni crijevni mikroorganizmi značajno mijenjaju koncentraciju poput: *Oscillospira*, koju se povezuje s mršavošću, zdravljem i stvaranjem sekundarnih žučnih kiselina, *Prevotella* koja je povezana s mikrobnom patogenezi reumatoidnog artritisa, *Ruminococcus* koji može biti povezan s morbidnom pretilošću i dr.<sup>69</sup> **Slika 2.22.** prikazuje opisane promjene u mikrobiološkom sastavu crijeva miševa uzrokovane utjecajem dviju veličina čestica PS MP-e u odnosu na kontrolu (netretirane organizme).



**Slika 2.22.** Promjena u mikrobiološkom sastavu crijeva miševa uslijed izlaganja PS-MP različitim veličinama čestica<sup>69</sup>

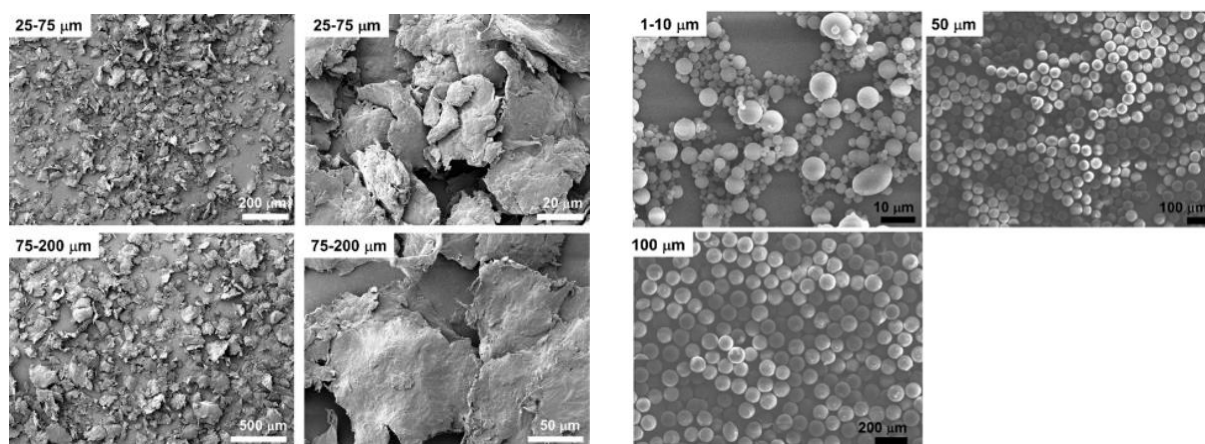
Nadalje, opisana disbioza crijevnih mikroorganizama inducirana mikroplastičnim česticama PS-a također može dovesti do poremećaja metabolizma lipida u jetri zasad nepoznatim, indirektnim putevima.<sup>69</sup> Isto tako, veći poremećaji u crijevnoj mikroekologiji na posljertku mogu rezultirati razvojem upalnih procesa i drugih imunoloških odgovora, te utjecati na urođeni i adaptivni imunitet.<sup>70</sup>

#### 2.4.5. *In vitro* ispitivanje toksičnosti mikroplastike na staničnim kulturama porijeklom iz čovjeka

Prethodno opisanim *in vivo* istraživanjima na miševima dokazano je propuštanje i apsorpcija plastičnih čestica u tkivima živih organizama, kao i njihov toksičan učinak na iste. To je dalo dobru podlogu za provođenje daljnjih *in vitro* istraživanja i ispitivanja toksičnosti mikroplastičnih čestica na humanim staničnim kulturama. Odlučujuću prepreku za sustavno propuštanje oralno unesenih tvari u ljudski organizam predstavlja crijevna stjenka. S jedne strane njezin upijajući dio smješten u tankom crijevu sadrži velik broj enterocita koji omogućavaju učinkovit unos hranjivih tvari, a s druge strane sastoji se od čvrstog proteoglikanskog sloja koji predstavlja zaštitnu barijeru za organizam.<sup>71</sup>

Plastične su čestice, za razliku od metalnih, kemijski prilično inertne zbog čega se njihovi toksični potencijali ne manifestiraju kroz stvaranje reaktivnih komponenata, već unutarstaničnim interakcijama sa samom plastičnom česticom. Pri tome je vrlo važno uzeti u obzir veličinu mikroplastične čestice odnosno njezin promjer, budući da je to ograničavajući faktor za ulazak u stanicu relativno male veličine. Shodno tome, pretpostavlja se da stanice imaju apsorpcijsku sposobnost za frakcije MP-e veličine ispod 10  $\mu\text{m}$ .<sup>71</sup> PP, PE i PVC vrste MP-e imaju relativno ujednačenu raspodjelu veličine čestica, dok je PET MP polidisperznija. Neujednačenost u raspodjeli veličine čestica, odnosno prisustvo većih čestica MP-e u toksikološkim ispitivanjima poput prethodno opisanog MTT testa mogu dati prividno pogrešne zaključke o toksičnosti MP-e. Razlog tomu je što smanjenje vitalnosti staničnih kultura u prisustvu većih čestica neće biti posljedica intracelularnih efekata, budući da su čestice jednostavno prevelike da uđu u stanicu, već će dolaziti do izvanstaničnog preopterećenja što jednako tako dovodi do smanjenja preživljenja stanica.<sup>71</sup> Tako je provedenim MTT testovima<sup>71</sup> utvrđena citotoksičnost PE-a i PVC-a u ekstremno visokim koncentracijama ( $>75$  mg/mL) na stanične linije Caco-2 i HepG2, koje predstavljaju standardni model za ispitivanje epitela crijeva. Za iste stanice PP i PET nisu se pokazali toksičnima.<sup>71</sup> Pojava toksičnih efekata PS-a na Caco-2 stanice uvelike je ovisila o primijenjenoj veličini čestica MP.<sup>72</sup> Mikroplastične čestice PS-a veličine 5  $\mu\text{m}$  u korelaciji s nanočesticama PS-a veličine 100 nm pokazale su manju toksičnost prema staničnoj kulturi Caco-2. Toksični učinci u ovom su se slučaju očitovali kao oštećenje monosloja Caco-2 stanica i ekspresija gena (GPx i OXSR1) povezanih s razvojem oksidativnog stresa u stanicama. Ostvarivanje većeg toksičnog potencijala nanočestica polistirena prema monosloju Caco-2 najvjerojatnije je posljedica lakšeg ulaska i transporta plastičnih čestica manjih veličina u ispitne stanice.<sup>72</sup> Nadalje, citotoksičnost polistirena ispitana je i na humanim stanicama dermalnih fibroblasta (HDF), mononuklearnim stanicama periferne krvi (PBMC) i staničnoj liniji ljudskih mastocita (HMC-1).<sup>73</sup> Stanice dermalnih fibroblasta predstavljaju prevladavajuće stanice u stromalnom tkivu, koje ima važnu ulogu u ranim procesima zacjeljivanja te pruža zaštitnu barijeru apsorpciji PS čestica. Stanice mastocita imunološke su stanice povezane s ekspresijom histamina, triptaze i heparina, čime daju odgovor na pitanje osjetljivosti ljudskog imunološkog sustava uslijed izlaganja PS mikročesticama. Slično tomu, utjecaj PS mikročestica na ljudski imunološki sustav može se pratiti i ponašanjem izoliranih stanica periferne krvi ekspresijom citokina.<sup>73</sup> Utvrđeno je kako u koncentracijama manjim od 0,5 mg/mL 3  $\mu\text{m}$  PS čestice nisu imale citotoksičan utjecaj na HDF ili PBMC stanične linije. Međutim, HDF stanicama tretiranim 3  $\mu\text{m}$  PS mikroplastikom u koncentraciji od 1 mg/mL preživljenje se smanjilo na značajnih 40%, iz čega se može zaključiti da PS u

visokim koncentracijama može potencijalno uzrokovati oštećenja kože.<sup>73</sup> Nadalje, provedena su i istraživanja u kojima se osim veličine i koncentracije čestica MP-e ispitivao utjecaj oblika čestice.<sup>74</sup> Shodno tome, utvrđeno je kako PE visoke gustoće, veličine čestica u rasponu od 1 do 100  $\mu\text{m}$ , te koncentracijama do 1 mg/mL ne izaziva toksični učinak na stanice humanih perifernih mononukleara (PBMC). Dok je s druge strane, PE niske gustoće veličine čestica 25-75  $\mu\text{m}$  i 75-200  $\mu\text{m}$  u koncentracijama između 0,25 mg/mL i 0,5 mg/mL uzrokovao smanjenje preživljenja istih stanica na 65%, odnosno 82%.<sup>74</sup> Ovdje je također vidljiv jači citotoksični učinak PE mikročestica manjeg raspona veličina (25-75  $\mu\text{m}$ ), kako je već prethodno opisano. Dokazano veća citotoksičnost PE niske gustoće može biti uzrokovana izravnim oštećenjima do kojih dolazi u kontaktu sa stanicama zbog oblika, odnosno znatno veće oštine rubova ove vrste plastike (Slika 2.23.) u odnosu na PE visoke gustoće čije čestice karakterizira glatka površina (Slika 2.23.).<sup>74</sup>



**Slika 2.23.** Mikrofotografija mikročestica PE: niske gustoće (lijevo) i visoke gustoće (desno)<sup>74</sup>

Još jednim istraživanjem<sup>75</sup> utvrđen je citotoksični učinak PS mikročestica veličine 10  $\mu\text{m}$  i koncentracije 10 mg/mL na humane cerebralne (T98G) i epitelne stanice vrata maternice (HeLa), koji se očitovao u razvoju reaktivnih kisikovih vrsta (ROS) u istima.<sup>75</sup> Nadalje, za mikročestice PP promjera manjeg od 20  $\mu\text{m}$  u koncentraciji od 1 mg/mL dokazano je smanjenje preživljenja HDF humane stanične linije na 80%, dok čestice iste vrste plastike u rasponu veličina od 25 do 200  $\mu\text{m}$  ne pokazuju citotoksičan učinak. Stoga se može potvrditi prethodan navod o korelaciji toksičnosti plastičnih mikročestica s njihovom veličinom, budući da manje čestice imaju veću ukupnu površinu u odnosu na jednak volumen, koja ometa rast stanica.<sup>76</sup>

Toksičnost mikroplastičnih čestica PS-a na humani respiratorni sustav ispitana je pomoću stanične linije plućnih epitelih stanica BEAS-2B.<sup>77</sup> Nakon 24 sata kontakta ove stanične linije s PS-om dolazi do značajnog smanjenja u postotku preživjelih stanica pri koncentraciji od 1 mg/mL, dok se nakon 48 sati citotoksični učinak očituje već pri koncentracijama većim od 0,01 mg/mL.<sup>77</sup> Prilikom izlaganja BEAS-2B stanica visokim koncentracijama PS-a također dolazi do stvaranja reaktivnih kisikovih vrsta koje prevladavaju kapacitet staničnih antioksidativnih enzima. Takvo okruženje u plućnim epitelnim stanicama uzrokuje poremećaje međustaničnih proteina i oksidativni stres, što predstavlja ključne faktore za patogenezu plućnih bolesti.<sup>77</sup>

Tablica 2.5. prikazuje sve rezultate opisanih toksikoloških *in vitro* ispitivanja na humanim staničnim linijama.

**Tablica 2.5.** *In vitro* toksikološka ispitivanja na humanim staničnim linijama

Vrsta MP-e	Vrsta stanica	Veličina MP-a	Koncentracija MP-a [mg/mL]	Vrijeme izloženosti [h]	Rezultati istraživanja	Izvor
PE	HepG2 (crijevni epitel)	Polidisperzna	>75	24	Smanjenje preživljenja od 20% do 60%	71
PVC	Caco-2 HepG2 (crijevni epitel)	Polidisperzna	>75	24	Smanjenje preživljenja od 20% do 60%	71
PS	Caco-2 (crijevni epitel)	5 µm	20	96	-	72
		100 nm			Oštećenje monosloja, ekspresija ROS gena	
PS	HDF (dermalni fibroblasti)	3 µm	1	16	Smanjenje preživljenja na 40%	73
PE (niske gustoće)	HDF (dermalni fibroblasti)	25-75 µm	1	24	Smanjenje preživljenja na 78,8%	74
		75-200 µm			Smanjenje preživljenja na 61,7%	
PE (niske gustoće)	PBMC (stanice periferne krvi)	25-75 µm	0,25-0,5	24	Smanjenje preživljenja na 65%	74
		75-200 µm			Smanjenje preživljenja na 82%	
PS	T98G (cerebralne stanice)	10 µm	10	24	Razvoj ROS	75
PS	HeLa (epitelne stanice)	10 µm	10	24	Razvoj ROS	75
PP	HDF (dermalni fibroblasti)	<20 µm	1	48	Smanjenje preživljenja na 80%	76
PS	BEAS-2B (plućni epitel)	1-3 µm	1	24	Smanjenje preživljenja na 65%	77
			>0,01	48	Smanjenje preživljenja na 60%-70%	



## 2.5. Dizajn eksperimenta

Dizajn eksperimenta je statistički kemometrijski alat sa svrhom modeliranja i analize utjecaja nezavisnih procesnih varijabli eksperimenta na zavisnu varijablu, odnosno varijablu odgovora. Varijabla odgovora funkcija je spomenutih nezavisnih varijabli.<sup>78,79</sup> Međutim, uključene varijable često su podložne eksperimentalnim pogreškama, što rezultira šumom u konačnom rezultatu. Dizajn eksperimenta nudi različite tehnike koje omogućavaju analizu podataka odgovarajućim statističkim metodama i posljedično provođenje eksperimenta na što učinkovitiji način. Osnovni principi statističkih metoda u dizajnu eksperimenta su replikacija, randomizacija i blokiranje. Replikacija je ponavljanje eksperimenta koja za svrhu ima dobivanje preciznijeg rezultata i procjenu eksperimentalne pogreške, odnosno standardne devijacije uzorka. Randomizacija se odnosi na nasumični redoslijed u kojem će se izvoditi eksperimenti, te omogućava da uvjeti jednoga pokusa neće ovisi o uvjetima drugoga. Blokiranje za cilj ima izolaciju poznatog sustavnog učinak pristranosti i sprječavanje da isti prikrije ostale učinke eksperimenta. Na taj se način smanjuju izvori varijabilnosti i poboljšava se preciznost eksperimenta.<sup>79</sup> Za dizajn eksperimenta na početku je važno utvrditi zavisnu varijablu, kao parametar koji najbolje opisuje djelovanje ispitivanog sustava kao cjeline. Isto tako potrebno je odrediti i sve nezavisne varijable, poznate pod nazivom faktori dizajna ( $k$ ) te ograničen broj vrijednosti koje oni mogu poprimiti, što se naziva razinom ( $L$ ). Složenost određenog eksperimenta ovisit će o broju faktora dizajna ( $k$ ) i razina ( $L$ ).<sup>79</sup>

### 2.5.1. Potpuni faktorski plan

Potpuni faktorski plan je najčešće korištena strategija dizajna eksperimenta, koja funkcionira na način da stvara eksperimentalne točke koristeći sve moguće kombinacije faktora u svakom provedenom ili ponovljenom pokusu.<sup>78,79</sup> Točke eksperimentalnog dizajna u cjelovitom faktorskom dizajnu su vrhovi hiperkocke u  $n$ -dimenzijskom prostoru koje definiraju minimalne i maksimalne vrijednosti svakog faktora.<sup>78</sup> U svom najjednostavnijem obliku, punom faktorijalu na dvije razine, postoji  $k$  faktora i dvije razine ( $L$ ) po faktoru. Broj uzoraka ovisi o ukupnim mogućim kombinacijama faktora, te se računa prema izrazu:  $N(L, k) = L^k$ . Dvije razine nazivaju se visokom ("h" ili "+1") i niskom ("l" ili "-1"). Središnja točka je uzorak u kojem su svi parametri imaju vrijednost koja je prosjek njihove niske i visoke razine, te joj se pripisuje vrijednost "0".<sup>79</sup> Eksperimentalno dobiveni rezultati na posljatku se obrađuju i grafički prikazuju, za što se često koristi metoda odzivnih površina (eng. *Response Surface Methodology*, RSM) s ciljem određivanja optimalnih uvjeta procesa i sustava.<sup>78,79</sup>

### 2.5.2. ANOVA (Metoda analize varijance)

Metoda analize varijance ili skraćeno ANOVA je statistička analiza kojom se uspoređuju aritmetičke sredine više uzoraka. Određuje se postoji li značajna razlika između aritmetičkih sredina više testiranih populacija na temelju provedenog F-testa, a samim time značajnost eksperimentalnih rezultata.<sup>80</sup> Stoga se postavljaju dvije hipoteze, nulta i alternativna. Nulta hipoteza tvrdi da su dvije aritmetičke sredine jednake, a alternativna da se razlikuju. Ovim testom provodi se analiza utjecaja jedne ili više nezavisnih varijabli na zavisnu. Nezavisne varijable još se nazivaju i faktorima, pa postoje jednofaktorska, dvofaktorska i višefaktorska analiza varijance.<sup>80</sup> U slučaju jednofaktorske ANOVA-e postoji samo jedna nezavisna varijabla.<sup>81</sup> Dvofaktorska analiza varijance predstavlja proširenje jednofaktorske analize, kod koje se ispituje djelovanje zavisnih faktora na numeričku vrijednost nezavisne varijable pri čemu uzorci moraju biti iz normalno distribuiranih populacija s jednakim varijancama. U ovaj model ANOVA-e također je moguće uključiti efekt interakcije koji se predočuje umnoškom dva faktora.<sup>82</sup> Višefaktorska ANOVA primjenu pronalazi u slučaju postojanja više nezavisnih varijabli u sustavu.<sup>81</sup>

### 3. Eksperimentalni dio

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Mikroplastika

Za ispitivanje toksičnosti mikroplastike na humane stanične linije iz zdravog (WI-38) i tumorskog tkiva (H1299 i A549) pluća koristio se polimerni materijal polistiren. Mikroplastične čestice PS-a dobivene su usitnjavanjem granula navedene vrste plastike, bez dodanih aditiva. Korištene granule PS-a prikazuje Slika 3.1.

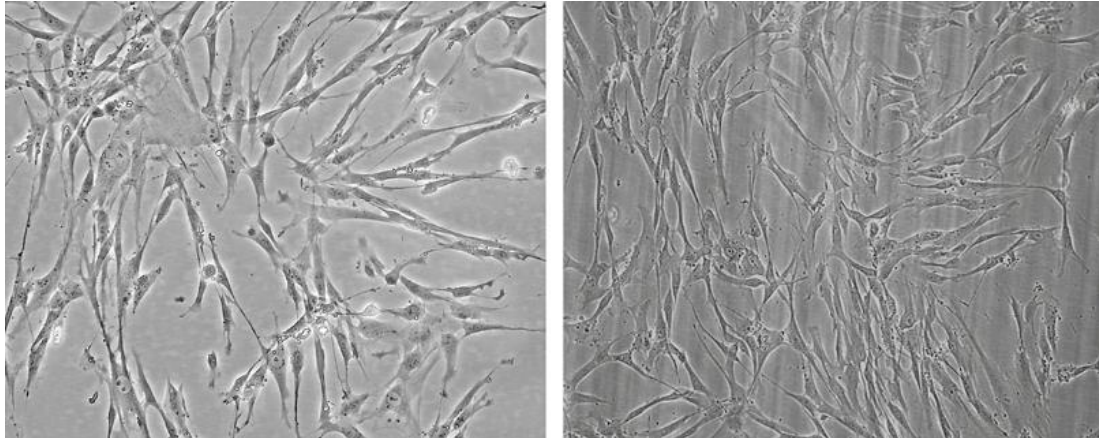


**Slika 3.1.** Granulirana plastika PS bez aditiva koja se koristila za dobivanje MP-e

##### 3.1.2. Testni stanični modeli

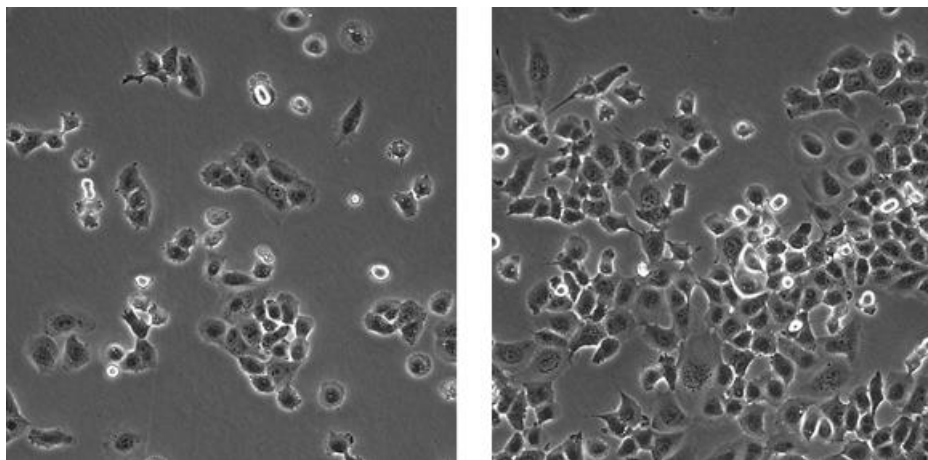
**WI-38** prva je humana diploidna stanična linija koja se koristi u pripremi cjevica. WI-38 stanice izolirane su iz plućnog tkiva tromjesečnog ženskog embrija. Mogu se koristiti kao domaćini transfekcije te u testiranju virusicida. Ove stanice imaju konačni životni vijek od  $50 \pm 10$  udvostručenja populacije s vremenom udvostručenja od 24 sata.<sup>83</sup> Mikroskopski prikaz stanične linije predstavlja Slika 3.2.

Za uzgoj stanica korišten je MEM (Minimum Essential Medium Eagle, Sigma-Aldrich, SAD) s L-glutaminom, natrijevim hidrogenkarbonatom i EBSS (Earle's Balanced Salt Solution s kalcijevim i magnezijevim solima). Originalnom pakiranju MEM-a dodaje se fetalni goveđi serum (FBS, Capricorn Scientific, Njemačka) do konačne koncentracije 10 %. DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1x, Lonza, Švicarska) korišten je za ispiranje stanica. Tripsin (Sigma-Aldrich, SAD) je korišten za odvajanje stanica od podloge. DPBS korišten je za razrjeđivanje alikvota stanica prilikom brojanja.



**Slika 3.2.** Mikrofotografija stanične kulture WI-38 niske gustoće (lijevo) i visoke gustoće (desno)<sup>83</sup>

**H1299** stanična je linija metastatskog tumora pluća dobivena iz uzorka biopsije limfnog čvora 43-godišnjeg muškarca koji je prethodno primio terapiju zračenjem. Stanice imaju homozigotnu parcijalnu deleciju gena za *p53* te zbog toga lako proliferiraju.<sup>84</sup> Mikroskopski prikaz stanične linije predstavlja Slika 3.3.

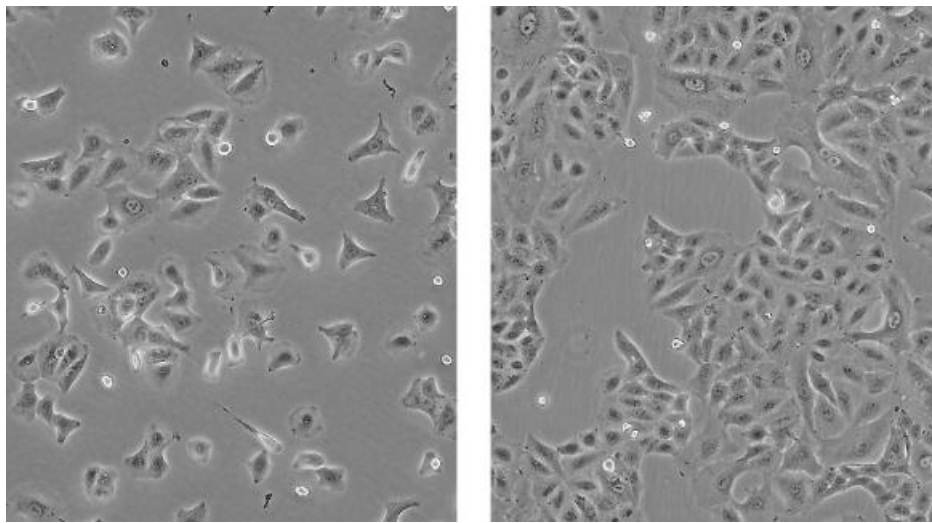


**Slika 3.3.** Mikrofotografija stanične kulture H1299 niske gustoće (lijevo) i visoke gustoće (desno)<sup>84</sup>

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich, SAD) s L-glutaminom, natrijevim hidrogenkarbonatom i glukozom koncentracije u iznosu od 4500 mg/L korišten je za uzgoj stanica H1299. Fetalni goveđi serum (FBS, Capricorn Scientific, Njemačka) dodaje se originalnom pakiranju DMEM-a do konačne koncentracije 10 %. DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1x, Lonza, Švicarska) korišten je za ispiranje stanica. Trypsin (Sigma-Aldrich,

SAD) je korišten za odvajanje stanica od podloge. DPBS korišten je za razrjeđivanje alikvota stanica prilikom brojanja.

Stanice **A549** izolirane su iz plućnog tkiva 58-godišnjeg bijelca a karcinomom pluća, te se koriste u istraživanjima karcinoma, imunoonkologiji i toksikologiji. One predstavljaju ljudsku staničnu liniju s hipotriploidnom kromosomskom aberacijom (odstupanje od normalnog broja kromosoma koje iznosi  $2n=46$  za somatske ljudske stanice) s modalnim brojem kromosoma u iznosu od 66.<sup>85</sup> Mikroskopski prikaz stanične linije predstavlja Slika 3.4. Postupak uzgoja, pripreme te postupanja sa navedenom staničnom linijom tijekom eksperimenta provedeno je na prethodno opisan način za staničnu liniju H1299.



**Slika 3.4.** Mikrofotografija stanične kulture A549 niske gustoće (lijevo) i visoke gustoće (desno)<sup>85</sup>

### 3.1.3. Mediji i kemikalije

- Tetrahidrofuran (THF) otapalo za pripremu otopina MP-a (Acros Organics, USA).
- Dimetil sulfoksid (DMSO, Kemika, Hrvatska).
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich, SAD) kao medij za uzgoj stanične kulture H1299.
- Minimum Essential Medium Eagle (MEM, Sigma-Aldrich, SAD) kao medij za uzgoj stanične kulture WI-38.
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1x (DPBS, Lonza, Švicarska) za ispiranje stanica.
- Tripsin (Sigma-Aldrich, SAD) za odvajanje stanica od podloge.

- Fetalni goveđi serum (FBS, Capricorn Scientific, Njemačka) za obogaćivanje s različitim faktorima rasta koji nisu prisutni u originalnom sastavu medija za uzgoj stanica (DMEM i MEM).
- Etanol 70% za sterilizaciju radnog prostora i pribora prije početka provođenja eksperimenata.
- MTT (Sigma-Aldrich, SAD) (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid za provođenje MTT testa.

### 3.2. Mjerni instrumenti i oprema

- Kriomlin (Retsch GmbH, CryoMill, Njemačka) za dobivanje praškastog uzorka MP-a iz granula PS-a.
- Analitička vaga (Sartorius AG, Njemačka) za vaganje mikroplastike.
- Uređaj za trešenje sita (W. S. Tyler RX-86-1 Sieve shaker, USA) i sita istog proizvođača veličina pora 50, 80, 100, 125, 160 i 200  $\mu\text{m}$  za prosijavanje MP-e.
- Plastične boce za uzgoj stanica (T-75; TPP, Švicarska), Petrijeve zdjelice, tubice za centrifugiranje, pločice s 96 bunarčića (TPP, Švicarska).
- Inkubator Thermo Scientific HERACELL vios 160i (Thermo Fisher, SAD).
- Invertni mikroskop.
- Brojač stanica Beckman Coulter Z2 Counter & Analyzer (Beckman Coulter, SAD).
- Vorteks IKA(R) GENIUS 3 (IKA, Japan).
- Mikrotitarski čitač pločica Thermo Labsystem Multiskan EX (Thermo Fisher, SAD).
- Centrifuga Thermo Scientific Heraeus Pico 21 Centrifuge (Thermo Fisher, SAD).

### 3.3. Metode rada

#### 3.3.1. Priprema mikroplastike

U svrhu određivanja toksičnosti MP-a za humane stanice iz zdravog (WI38 - humane stanice plućnih fibroblasta) odnosno tumorskog tkiva (H1299 - humane stanice izvedene iz metastaza adenokarcinoma pluća i A549 – humane stanice karcinoma pluća) korištena je plastika PS. Kako bi se dobile čestice mikrometarskih razmjera veličina (MP) (5 mm-1  $\mu\text{m}$ ), granule PS-a usitnjene su u kriomlinu (Slika 3.5.) pomoću tekućeg dušika na radnoj temperaturi od -196 °C. Na svaki uzorak plastike primijenjeno je 8 ciklusa usitnjavanja pri frekvenciji od 25 Hz. Dobiven je bijeli praškasti uzorak (Slika 3.6.).



**Slika 3.5.** Kriomlin s tekućim dušikom kao radnim plinom korišten za dobivanje MP



**Slika 3.6.** Uzorak dobivene MP PS-a

Kako bi se dobile tri različite raspodjele veličina MP čestica korištene u toksikološkom ispitivanju, bijeli praškasti uzorak PS-a mehanički je prosijan sitom (Slika 3.7.) veličine pora 50 i 80  $\mu\text{m}$  (za dobivanje veličina MP čestica 50-100  $\mu\text{m}$ ); 100, 125 i 160  $\mu\text{m}$  (za dobivanje veličina MP čestica 100-200  $\mu\text{m}$ ); 200  $\mu\text{m}$  (za dobivanje veličina MP čestica >200  $\mu\text{m}$ ).



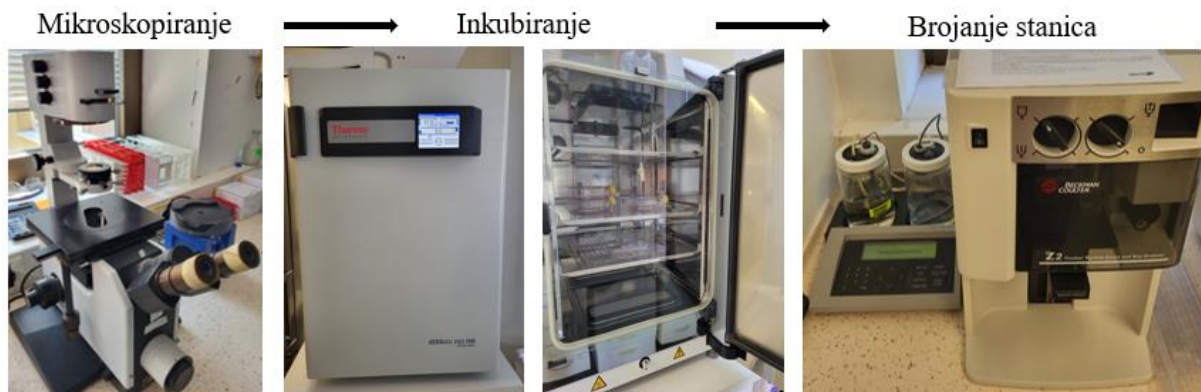
**Slika 3.7.** Mehaničko sito korišteno za dobivanje MP-a određene raspodjele veličine čestica

### 3.3.2. Rad sa staničnim kulturama

Odmrzavanje stanica WI-38 odnosno H1299 i A549, prethodno zamrznutih u mediju s 5% DMSO-a rađeno je prema standardnom protokolu. U kriogenutubu sa stanicama dodan je 1 mL MEM odnosno DMEM medija s 10% FBS-a sobne temperature. Stanice su resuspendirane u mediju i prebačene u plastičnu tubicu (1 ml) za centrifugiranje s dodatnim 1 mL MEM-a odnosno DMEM-a, te centrifugirane 5 min pri brzini 300 x g. Nakon uklanjanja supernatanta, talog je resuspendiran u 10 mL MEM-a/DMEM-a s 10% FBS-om te je sadržaj tubice prebačen u plastičnu bocu T75 za uzgoj stanica. Stanice su uzgajane u inkubatoru na 37°C s 5% CO<sub>2</sub>. Konfluentnost i morfologija stanica provjeravani su svakodnevno pomoću invertnog mikroskopa.

Stanice su u svrhu očuvanja konfluentnosti, presađivane svaka tri dana. Prilikom presađivanja stanicama je uklonjen medij, isprane su u 3 mL DPBS-a i dodan im je 1 mL tripsina kako bi se odvojile od površine. Tripsin je enzim koji cijepa peptidnu vezu nakon lizina i arginina na C terminusu, te na taj način narušava izvanstanični matriks stanica i omogućava njihovo odvajanje od podloge. Stanice su inkubirane u tripsinu 4 minute u inkubatoru. Potom je stanicama dodano 9 mL kompletiranog medija kako bi se inaktiviralo djelovanje tripsina. Stanice su resuspendirane i 1 mL suspenzije prebačen je u novu plastičnu bocu za uzgoj stanica u koju je prethodno dodano 9 mL MEM-a odnosno DMEM-a s 10% FBS-a.

Nasađivanje točno određenog broja stanica, za potrebe pokusa, rađeno je tako što su nakon inaktivacije tripsina stanice prebačene u plastičnu tubu od 15 mL. Alikvot od 100 µL stanične suspenzije pomiješan je s 9,9 mL Assay Diluent-a u plastičnoj kiveti, te su zatim stanice izbrojane pomoću uređaja Beckman Coulter Z2 Counter & Analyzer. Opisani tijek rada sa staničnim kulturama prikazuje Slika 3.8.



**Slika 3.8.** Postupak rada sa staničnim kulturama



Prije početka analiza potrebno je nasaditi jednak broj stanica po bunarčiću kako bi u svakom praćenom uvjetu bio jednak broj stanica. Stoga je na pločicu s 96 jažica nasadeno 10000 stanica WI-38, 5000 stanica H1299, te 7500 stanica A549 u 90  $\mu\text{L}$  medija po jažici.

### 3.3.3. Priprema radnih otopina mikroplastike i tretiranje staničnih kultura

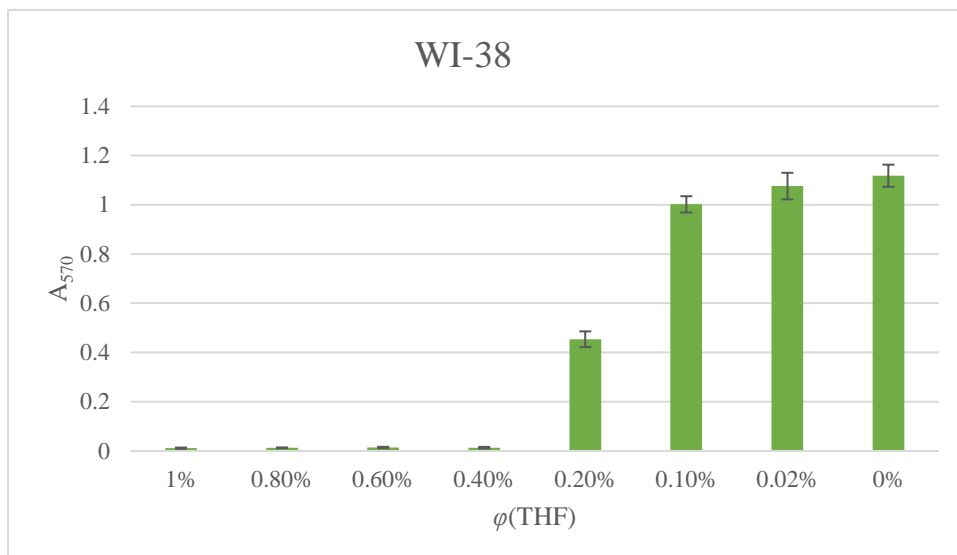
Prve otopine PS-a koncentracije 1 mg/mL pripremljene su na način da je na analitičkoj vagi odvagano po 50 mg PS-a za sva tri raspona veličina čestica (50-100  $\mu\text{m}$ , 100-200  $\mu\text{m}$  i >200  $\mu\text{m}$ ). Odvage PS-a prenesene su u odmjerne tikvice volumena 50 mL, te su do oznake nadopunjene otapalom (THF).

Zatim se za pojedinu staničnu liniju određivala optimalna koncentracija radnih otopina, odnosno optimalni konstantni volumni udio ( $\varphi$ ) THF-a na 100  $\mu\text{L}$  radnih otopina u svim praćenim uvjetima. To je provedeno na način da je određen volumen THF-a razrijeđen 10 puta u mediju za stanice (MEM-u, odnosno DMEM-u), te su dobivene stock otopine volumnih udjela THF-a navedenih u Tablica 3.1. Nadalje je stanicama dodano po 10  $\mu\text{L}$  pripremljenih stock otopina, čime je postignuto dodatno razrjeđenje od 10 puta kako također prikazuje Tablica 3.1.

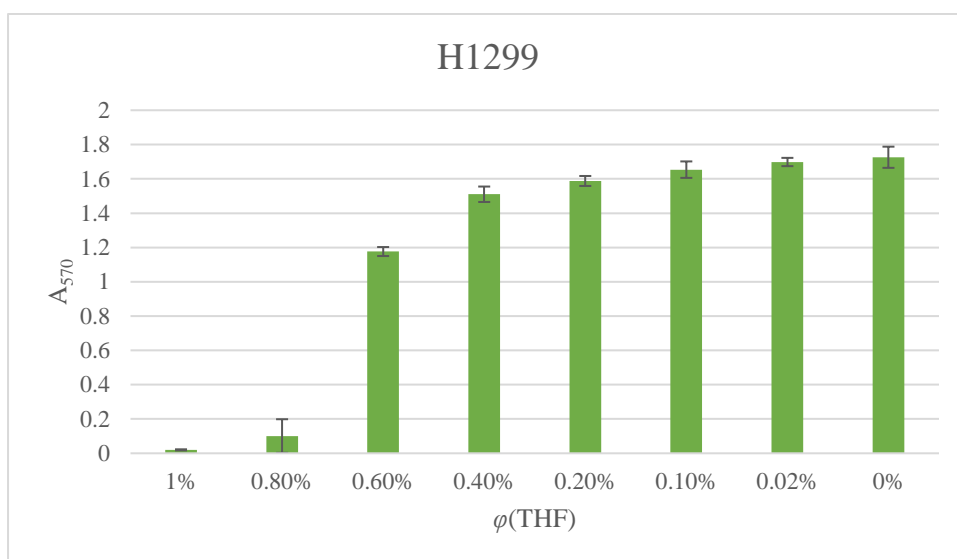
**Tablica 3.1.** Podaci za utvrđivanje optimalnih koncentracija radnih otopina mikroplastike

$V$ (MEM/DMEM) / $\mu\text{L}$	$V$ (THF) / $\mu\text{L}$	$\varphi$ (THF-a u stock otopinama) / %	$\varphi$ (THF-a sa stanicama) / %
450	50	10	<b>1</b>
460	40	8	<b>0,8</b>
470	30	6	<b>0,6</b>
480	20	4	<b>0,4</b>
490	10	2	<b>0,2</b>
495	5	1	<b>0,1</b>
499	1	0,2	<b>0,02</b>

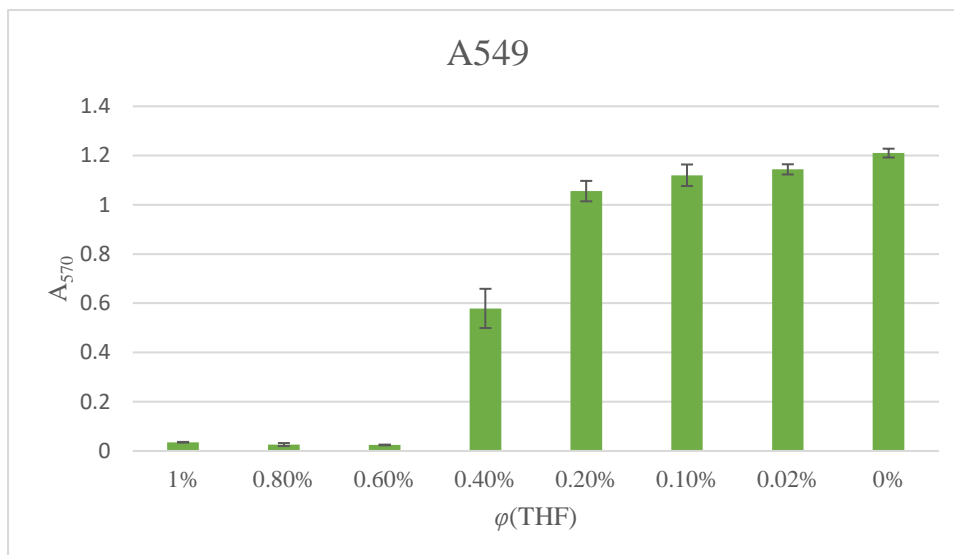
Sve tri stanične linije su potom inkubirane 72 sata na 37 °C s 5 % CO<sub>2</sub>, te je proveden MTT test opisan u sljedećem poglavlju kako bi se dobile titracijske krivulje za određivanje optimalne koncentracije radnih otopina. Iz dobivenih titracijskih krivulja (Slika 3.9., Slika 3.10., Slika 3.11.) određeno je da će stalni optimalni volumni udjeli THF-a iznositi: 0,10% za staničnu liniju WI-38, 0,17% za staničnu liniju H1299 te 0,20% za staničnu liniju A549.



**Slika 3.9.** Titracijska krivulja za staničnu liniju WI-38 (Prikazana je srednja vrijednost izmjerenih apsorbancija s označenom standardnom devijacijom)



**Slika 3.10.** Titracijska krivulja za staničnu liniju H1299 (Prikazana je srednja vrijednost izmjerenih apsorbancija s označenom standardnom devijacijom)

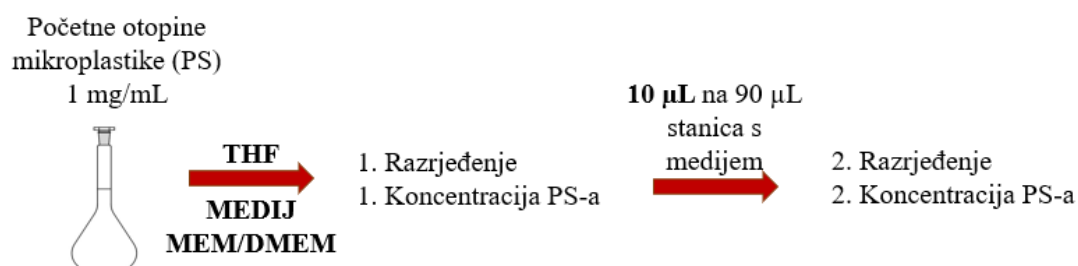


**Slika 3.11.** Titracijska krivulja za staničnu liniju A549 (Prikazana je srednja vrijednost izmjerenih apsorbancija s označenom standardnom devijacijom)

Prema tome su pripremljene radne otopine mikroplastike PS-a kako prikazuje Tablica 3.2. Prve otopine PS-a razrijeđene su u mediju za stanice (MEM-u, odnosno DMEM-u), a potom je stanicama dodano po 10  $\mu\text{L}$  pripremljenih radnih otopina, čime je postignuto dodatno razrjeđenje od 10 puta. Stanice su potom inkubirane 24, 48 i 72 sata na 37 °C s 5 %  $\text{CO}_2$ . **Slika 3.12.** dodatno prikazuje opisani postupak pripreme radnih otopina PS-a i tretiranje staničnih kultura pripremljenim otopinama.

**Tablica 3.2.** Podaci za pripremu radnih otopina i konačne koncentracije istih

Stanična kultura	1. razrjeđenje / x	1. koncentracija PS-a / $\mu\text{g/mL}$	2. razrjeđenje / x	2. koncentracija PS-a / $\mu\text{g/mL}$	$\phi$ (THF-a) / %
WI-38	100	10,00	500	1,000	0,10
	150	6,67	1500	0,667	
	200	5,00	2000	0,500	
H1299	60	16,70	600	1,670	0,17
	80	12,50	800	1,250	
	100	10,00	1000	1,000	
A549	50	20,00	500	2,000	0,20
	100	10,00	1000	1,000	
	150	6,67	1500	0,667	



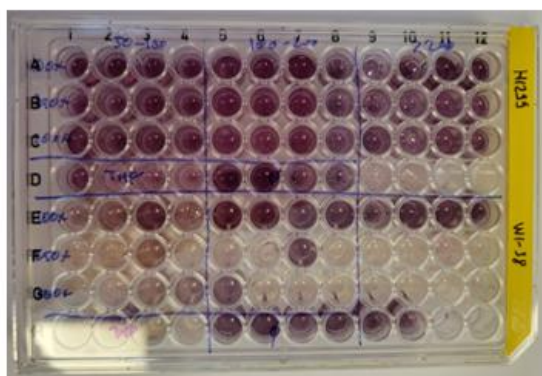
**Slika 3.12.** Shematski prikaz postupka pripreme radnih otopina PS-a i tretiranja staničnih kultura pripremljenim otopinama

### 3.3.4. Određivanje utjecaja THF-a / mikroplastike na preživljenje stanične kulture

Stanice su izvađene iz inkubatora nakon čega im je uklonjen medij, te je dodano 30 µL 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolij bromida (MTT), koncentracije 5 mg/ml. Dodano je i 30 µL MTT-a u dvije prazne jažice koje služe kao slijepa proba. Stanice su zatim inkubirane četiri sata u inkubatoru nakon čega im je dodano 150 µL DMSO-a koji funkcionira kao otapalo za kristale formazana. Stanice su potom blago protresene 10 min kako bi se pospješilo otapanje kristala. Nakon toga izmjerena je apsorbancija pri 570 nm na spektrofotometru s mogućnošću očitavanja mikrotitarskih pločica uz program Ascent / MTT SHAKE S.E.E. Slika 3.13. prikazuje opisani tijek MTT testa koji je korišten u preliminarnom ispitivanju za dobivanje titracijskih krivulja iz kojih su određene optimalne koncentracije radnih otopina, odnosno volumni udjeli THF-a.

Na istovjetan način provedeni su i MTT testovi za utvrđivanje utjecaja mikroplastike na preživljenje određenih staničnih kultura, a početni uvjeti eksperimenata dani su u Tablica 3.3.

Stanična kultura pripravljena za MTT test



Mjerenje apsorbancije pri 570 nm



**Slika 3.13.** Shematski prikaz postupka određivanja utjecaja PS-a na preživljavanje staničnih kultura

### 3.3.5. Statistička analiza

Eksperiment je rađen s tri biološke replike pojedine stanične linije, svaki uvjet je rađen u tehničkom kvadruplikatu (4 jažice).

Statistička analiza rezultata rađena je pomoću studentovog t-testa u Programu GraphPad Prism 8.2.1. Statistički značajne vrijednosti prikazane su na grafovima (Slika 4.1., Slika 4.2., Slika 4.3.) zvjezdicama, gdje jedna zvjezdica (\*) označava vrijednosti  $P < 0,05$ , dvije zvjezdice (\*\*) vrijednosti  $P < 0,01$  i tri zvjezdice (\*\*\*)  $P < 0,001$ .

Primjenom potpunog faktorskog dizajna programskog alata Desing Expert 7.1.5. određeni su uvjeti eksperimenta u kojima je postignuto minimalno preživljenje testnih staničnih linija, odnosno uvjeti pri kojima je ispitana mikroplastika ostvarila najštetniji utjecaj. Za statističku analizu eksperimenta primijenjene su tri razine testnih procesnih parametara na tri razine (-1, 0 i 1), kao što prikazuje Tablica 3.4. Promatrana su tri numerička faktora: vrijeme izlaganja, koncentracija otopina mikroplastike i veličina čestica PS-a. Kao odziv modela uzeto je relativno preživljenje stanica normalizirano na netretirane uvjete, a korišten je kvadratični model. Također je u sklopu statističke analize provedena i analiza varijance ANOVA za procjenu signifikantnosti triju ispitanih modela (za svaku staničnu kulturu), odnosno sposobnosti modela za opisivanje varijabilnosti podataka.

**Tablica 3.3.** Uvjeti za određivanje utjecaja PS-a na preživljavanje staničnih kultura prema punom faktorskom planu

Vrsta stanične kulture	Veličina čestica PS-a / $\mu\text{m}$	Konačna koncentracija PS-a / $\mu\text{g/mL}$	Vrijeme izlaganja / h
<b>WI-38</b>	50-100	1,000	24
			48
			72
		0,667	24
			48
			72
	>200	0,500	24
			48
			72
		1,000	24
			48
			72
		0,667	24
			48
			72
0,500	24		
	48		
	72		
<b>H1299</b>	50-100	1,670	24
			48
			72
		1,250	24
			48
			72
	>200	1,000	24
			48
			72
		1,670	24
			48
			72
		1,250	24
			48
			72
1,000	24		
	48		
	72		
50-100	1,670	24	
		48	
		72	
	1,250	24	
		48	
		72	
1,000	24		
	48		
	72		
<b>A549</b>	50-100	2,000	24
			48
			72
		1,000	24
			48
			72
	0,667	24	
		48	
		72	

			72
		2,000	24
			48
			72
	100-200	1,000	24
			48
			72
		0,667	24
			48
			72
		2,000	24
			48
			72
	>200	1,000	24
			48
			72
		0,667	24
			48
			72

**Tablica 3.4.** Razine testiranih procesnih parametara

PROCESNI PARAMETAR		RAZINA		
<b>STANIČNI ORGANIZAM WI-38</b>				
<b>Numerički</b>		-1	0	1
<b><i>t</i> / h</b>		24	48	72
<b><math>\gamma</math> (PS-a) / <math>\mu\text{g/mL}</math></b>		0,5	0,67	1
<b>Veličina čestica (PS-a) / <math>\mu\text{m}</math></b>		50	125	200
<b>STANIČNI ORGANIZAM H1299</b>				
<b>Numerički</b>		-1	0	1
<b><i>t</i> / h</b>		24	48	72
<b><math>\gamma</math> (PS-a) / <math>\mu\text{g/mL}</math></b>		1	1,25	1,67
<b>Veličina čestica (PS-a) / <math>\mu\text{m}</math></b>		50	125	200
<b>STANIČNI ORGANIZAM A549</b>				
<b>Numerički</b>		-1	0	1
<b><i>t</i> / h</b>		24	48	72
<b><math>\gamma</math> (PS-a) / <math>\mu\text{g/mL}</math></b>		0,67	1	2
<b>Veličina čestica (PS-a) / <math>\mu\text{m}</math></b>		50	125	200

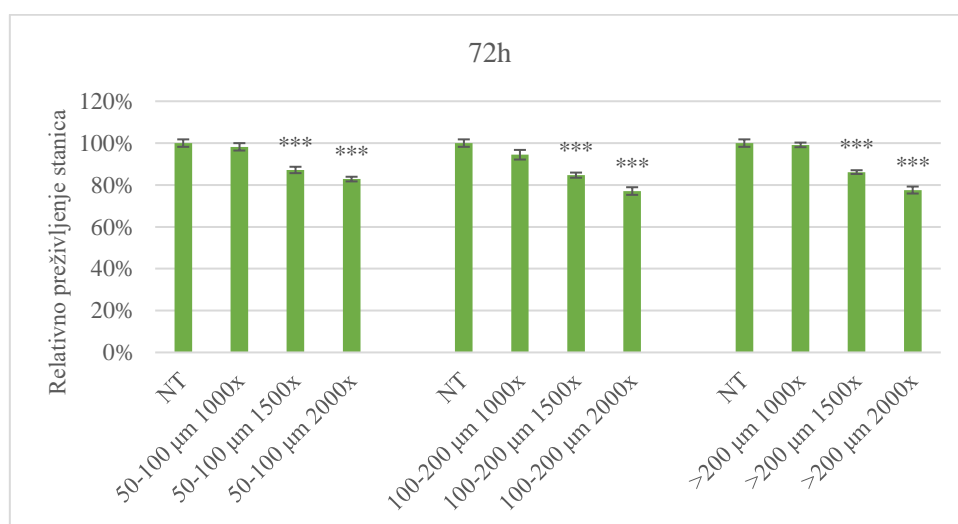
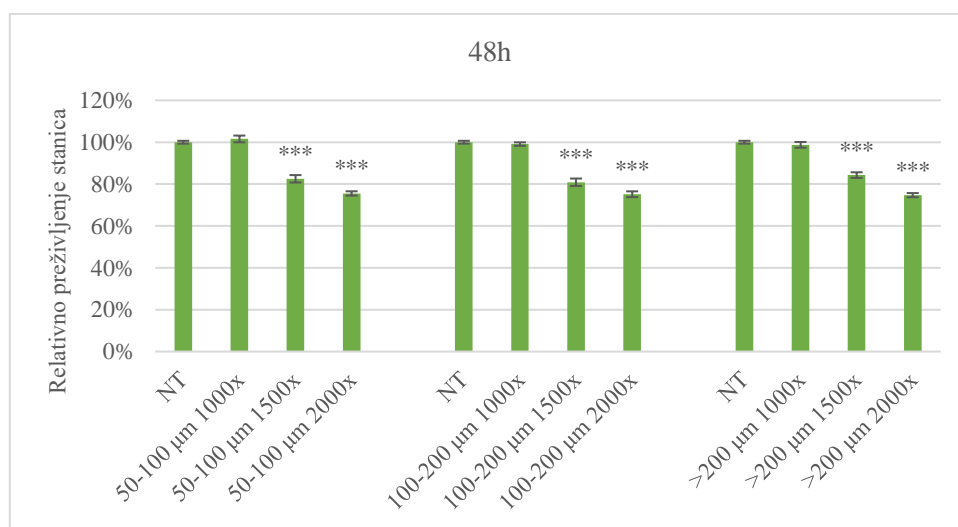
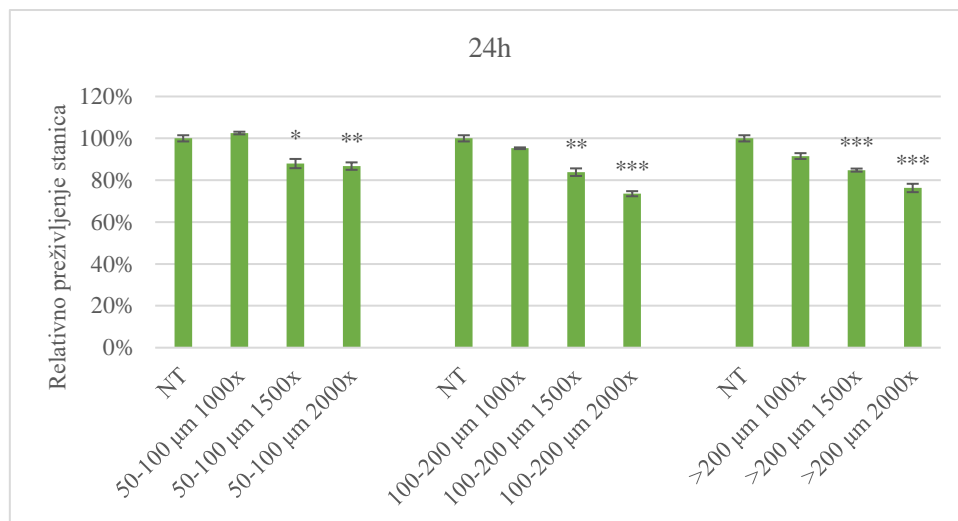
## 4. Rezultati i rasprava

Proizvodnja i upotreba plastike je od polovine prošlog stoljeća u konstantnom porastu zahvaljujući jedinstvenim svojstvima i cjenovnoj prihvatljivosti plastičnih materijala. Međutim, pretjerano i neodrživo korištenje te loše gospodarenje plastičnim otpadom dovelo je do rastućeg ekološkog problema modernog doba.<sup>1,8</sup> Izlaganje plastičnog otpada okolišnim uvjetima dovodi do fragmentacije na sitnije čestice koju se naziva mikroplastikom, a čije kretanje unutar ekosustava i konačan učinak na ljudsko zdravlje zasad još uvijek nisu dovoljno istraženi.<sup>5</sup> Stoga se sve češće postavlja pitanje štetnosti mikroplastičnih čestica s kojima čovjek dolazi u kontakt putem različitih okolišnih domena, a koje su u fiziološkim uvjetima temperature i pH vrijednosti podložne daljnjoj fragmentaciji i transportu do svih unutarnjih organa.<sup>86</sup> U ovom radu ispitan je učinak mikročestica plastike polistirena na proliferaciju/preživljenje humanih stanica u ovisnosti o rasponu veličina čestica, koncentraciji otopina mikroplastike i vremenu izlaganja. Istraživanje je provedeno na trima humanim plućnim staničnim linijama od kojih je jedna zdravog porijekla (WI-38), dok su preostale dvije tumorskog (H1299 i A549). Način provedbe ovih pokusa i praćeni parametri opisani su u poglavlju 3 – *eksperimentalni dio*.

### 4.1. MTT test

MTT testovi provedeni su s tri biološke replike pojedine stanične linije, pri čemu je za svaku staničnu liniju odabrana jedna reprezentativna replika za 24, 48 i 72 sata. Rezultati dobiveni MTT testovima prikazani su kao relativno preživljenje stanica (%) normalizirano na netretirane uvjete, kako bi se olakšano predstavio učinak isključivo PS-a na preživljenje staničnih linija odnosno kako bi se iz konačnih rezultata oduzeo učinak otapala (THF-a) na preživljenje istih. Dobivene rezultate predstavlja Slika 4.1. (za staničnu liniju WI-38), Slika 4.2. (za staničnu liniju H1299) i Slika 4.3. (za staničnu liniju A549).





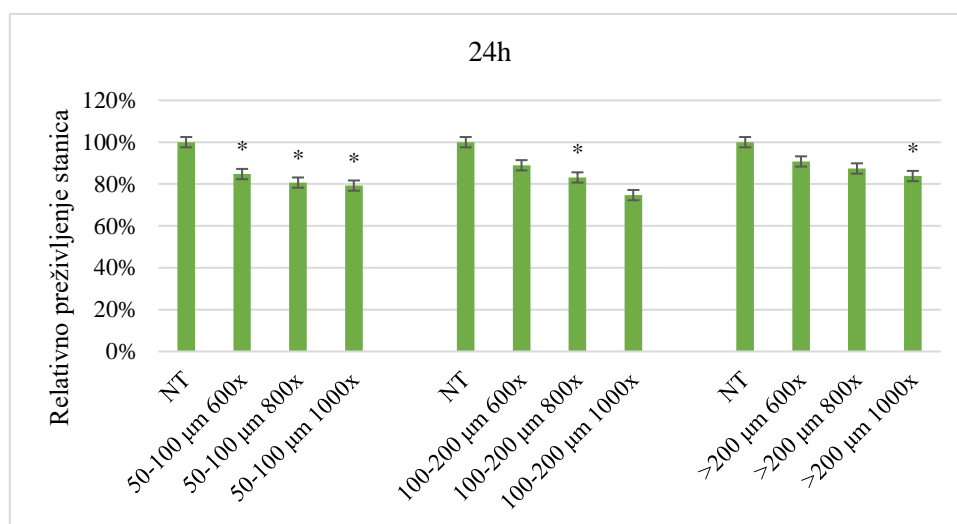
**Slika 4.1.** Rezultati MTT testa (relativnog preživljenja) za staničnu liniju WI-38 (NT – netretirani uvjet; raspodjela veličina čestica PS-a: 50 – 100 μm, 100 – 200 μm, >200 μm; razrjeđenje početne otopine PS-a: 1000x, 1500x, 2000x)

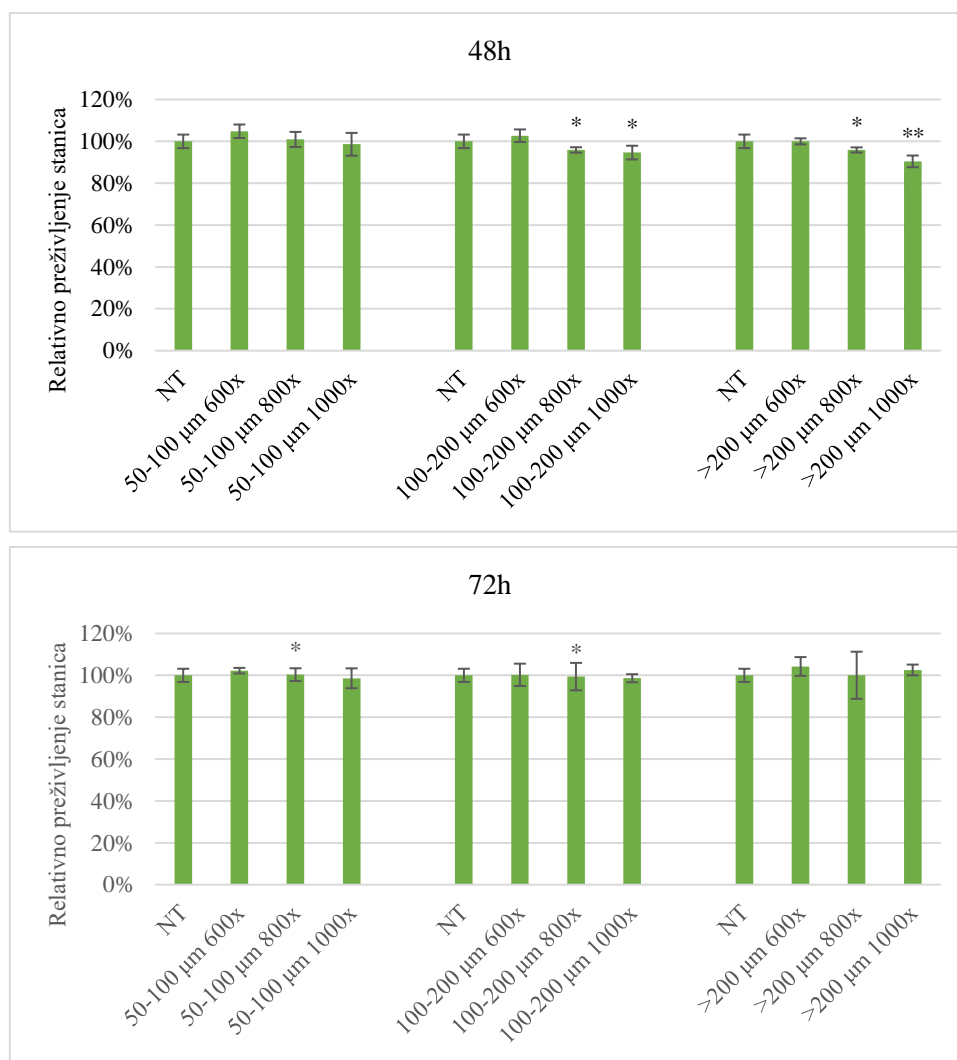
Prema rezultatima MTT testa za staničnu liniju WI-38 prikazanim na Slika 4.1. vidljivo je kako vrijeme izlaganja staničnih kultura otopini PS-a nije ostvarilo presudan utjecaj na preživljenje. Ovaj navod potvrđuje isti trend preživljenja za sva tri vremena izlaganja (24 h, 48 h i 72 h) otopini PS-a.

Za sve tri raspodjele veličina čestica mikroplastike također se primjećuje sličan trend preživljenja stanične kulture. Međutim, preživljenje nakon 24 sata smanjuje se s porastom raspona veličina čestica, odnosno za sve tri koncentracije za raspon veličina 50 - 100  $\mu\text{m}$  preživljenje je veće u odnosu na raspone veličina 100 – 200  $\mu\text{m}$  i >200  $\mu\text{m}$ . Ovaj efekt vidljivo je najizraženiji za najmanju koncentraciju 0,5  $\mu\text{g/mL}$  (razrjeđenje 2000x), gdje preživljenje za raspon veličina 50 - 100  $\mu\text{m}$  iznosi 87%, dok u usporedbi preživljenje za raspon veličina 100 – 200  $\mu\text{m}$  iznosi 74%. Očekivani rezultat bio bi proporcionalan odnos smanjenja preživljenja sa smanjenjem veličine čestica mikroplastike.<sup>72,74</sup> Međutim, prilikom interpretacije rezultata u obzir valja uzeti i veličinu samih stanica koja je značajno manja od 50  $\mu\text{m}$  zbog čega mehanički prodor PS mikročestica, kojima se raspolagalo u provođenju ovog eksperimenta, u stanicu jednostavno nije moguć. Kako je već prethodno navedeno u poglavlju 2.4.5. - *in vitro* ispitivanje toksičnosti mikroplastike na humanim staničnim kulturama, pretpostavlja se da stanice zbog vlastite veličine općenito imaju apsorpcijsku sposobnost za frakcije mikroplastike veličine ispod 10  $\mu\text{m}$ .<sup>71,87</sup> Stoga se sa izvjesnom sigurnošću može pretpostaviti da preživljenje stanica u ovom istraživanju u kojemu se najmanja primijenjena veličina čestica PS-a kretala u rasponu od 50-100  $\mu\text{m}$ , nije posljedica intracelularnih efekata mikroplastike na ispitne stanične linije. Drugim riječima, u uvjetima provedenog eksperimenta i raspoloživom rasponu veličina čestica mikroplastike, nije bilo moguće ispitati citotoksičnost PS-a u pravom smislu. Međutim, uočeni trend smanjenja preživljenja zdrave stanične kulture WI-38 s povećanjem veličine čestica PS-a moguće je potkrijepiti drugim objašnjenjem koje obrnuto proporcionalan odnos smanjenja preživljenja stanične linije s povećanjem veličine čestica PS-a temelji na izvanstraničnom preopterećenju.<sup>71</sup> Dakle veće čestice mikroplastike pri istim koncentracijama uzrokovat će intenzivnije vanjsko opterećenje na stanice i dovesti do njihovog odumiranja. U literaturi<sup>87</sup> se ovaj efekt učinka mikroplastike na stanicu navodi pod pojmom fizička toksičnost.

Koncentracija otopina PS-a kojima su stanice tretirane također pokazuje utjecaj na preživljenje istih. Pri tome je vidljivo kako su najmanje preživljenje imale stanice tretirane otopinama najvećeg razrjeđenja (2000x) odnosno otopinama koncentracije 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . Najmanje preživljenje iznosilo je 74%, dok su preživljenja pri najvećoj koncentraciji od 1  $\mu\text{g/mL}$  bila vrlo bliska onima netretiranih staničnih kultura. Na to se nadovezuju i rezultati provedene statističke analize, odnosno studentovog t-testa kojima je na grafovima prikazana

značajnost rezultata. Vidljivo je da preživljenja za najmanje razrjeđenje (1000x) odnosno najveću koncentraciju nisu označena kao statistički značajni rezultati. S druge strane za sva preživljenja pri koncentracijama 0,5 µg/mL i 0,67 µg/mL određeno je da se statistički značajno razlikuju u odnosu na netretirane stanice. Manje preživljenje stanica pri nižim koncentracijama otopina PS-a predstavlja neočekivan rezultat.<sup>74,77</sup> Međutim, takav trend moguće je objasniti formiranjem aglomerata hidrofobnih mikroplastičnih čestica pri većim koncentracijama koji posljedično smanjuju mogućnost kontakta mikroplastike sa stanicom i onemogućavaju manifestaciju bilo kakvih štetnih učinaka u pogledu smanjenja preživljenja.<sup>87</sup> Spomenuti aglomerati formiraju se pomoću slabih elektrostatskih van der Waalsovih sila između čestica mikroplastike. Zahvaljujući postojanju intrinzičnih sila mikroplastične čestice bivaju jače privučene međusobno nego na stanice s kojima dolaze u kontakt, te posljedično imaju smanjen utjecaj na iste.<sup>88</sup>





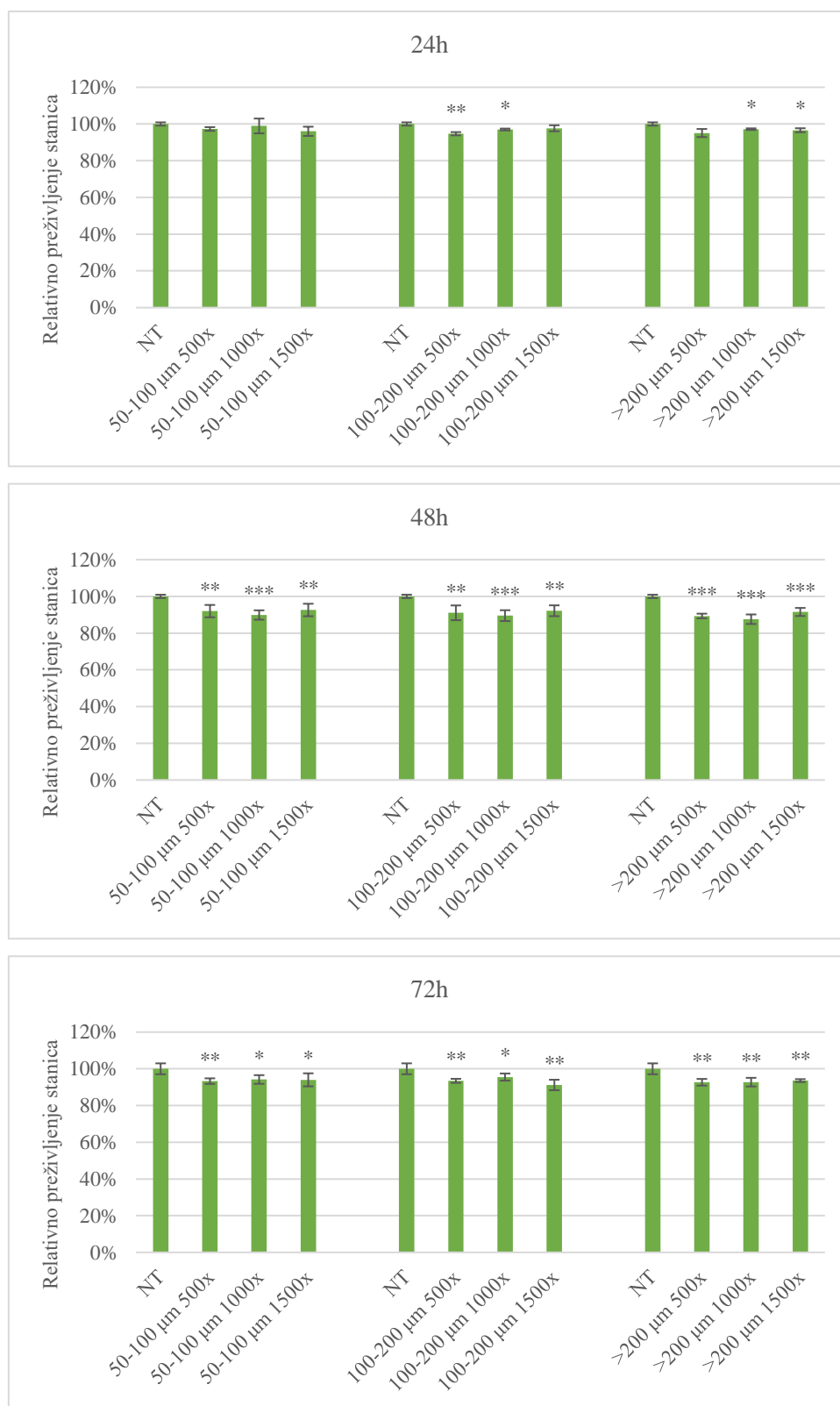
**Slika 4.2.** Rezultati MTT testa (relativnog preživljenja) za staničnu liniju H1299 (NT – netretirani uvjet; raspodjela veličina čestica PS-a: 50 – 100 µm, 100 – 200 µm, >200 µm; razrjeđenje početne otopine PS-a: 1000x, 1500x, 2000x)

Rezultati MTT testa prikazani na Slika 4.2. pokazuju kako je na preživljenje stanične linije H1299 vrijeme izlaganja mikroplastici imalo značajan utjecaj. Odnosno, na grafovima je vidljivo kako nakon 24 sata dolazi do primjetnog smanjenja u relativnom preživljenju ispitane stanične linije, pri čemu je minimalno relativno preživljenje iznosilo 75%. S druge strane, nakon 48 može se uočiti tek vrlo slab trend pada relativnog preživljenja stanica, a nakon 72 sata nije vidljiv nikakav učinak. Prema literaturnim podacima moglo se pretpostaviti da će se postotak relativnog preživljenja stanica smanjivati s povećanjem vremena izlaganja.<sup>77</sup> Međutim, dobiveni rezultati koji su potvrdili najveću štetnost PS-a na staničnu liniju H1299 nakon 24 sata, odnosno najkraćeg kontaktnog vremena mogu se objasniti prilagodbom ove stanične kulture na postavljene eksperimentalne uvjete.<sup>86</sup>

Budući da se radi o tumorskoj staničnoj kulturi koja je značajno otpornija u odnosu na zdravu kakva je prethodno opisana WI-38, moguće je da tumorske stanice nakon izvjesnog vremena razvijaju određene prilagodbe zbog kojih posljedično ne dolazi do pada u relativnom preživljenju. Štoviše, najnovijim istraživanjem dokazano je i kako izlaganje tumorskih stanica mikročesticama PS-a dovodi do povećanja proliferacije, odnosno bujanja malignih stanica umnožavanjem.<sup>86</sup>

Raspodjela veličine čestica PS-a na ovu staničnu liniju nije pokazala značajan utjecaj u smislu smanjenja postotka preživjelih stanica, budući da se za sva tri veličinska raspona u sva tri vremena izlaganja ponavlja približno jednak trend. Ipak, najizraženiji utjecaj veličine čestica PS-a na preživljenje stanične linije H1299 vidljiv je na 48 sati gdje preživljenje za raspodjelu veličina 50 - 100  $\mu\text{m}$  iznosi 99%, 100 – 200  $\mu\text{m}$  iznosi 95%, a  $>200$   $\mu\text{m}$  iznosi 90%. Trend smanjenja preživljenja s povećanjem veličine čestica i objašnjenje za ovakav rezultat prethodno je opisano za staničnu kulturu WI-38, te vrijedi i u ovom slučaju. Osim toga, još jedno moguće objašnjenje za obrnuto proporcionalan odnos smanjenja preživljenja stanica s povećanjem veličine čestica mikroplastike je kompenzacija dvaju efekata. Naime, ako se promatraju sustavi pri istim koncentracijama čestica PS-a izvjesno je da će u sustavu gdje veličina čestica iznosi 50 - 100  $\mu\text{m}$  ukupan broj čestica mikroplastike biti veći nego u sustavu s veličinom čestica  $>200$   $\mu\text{m}$ , budući da će veće čestice zauzimati veći volumen te će njihov ukupan broj konačno biti manji.<sup>89</sup> Stoga će u sustavu s većim ukupnim brojem čestica (veličinski raspon 50 - 100  $\mu\text{m}$ ) lakše dolaziti do formiranja aglomerata, koji posljedično onemogućavaju učinak mikroplastike na stanicu.<sup>88</sup>

Utjecaj koncentracije otopina mikroplastike očitovano kao smanjenje preživljenja stanične linije H1299 najizraženije je pri najvećim razrjeđenjima otopina (1000x) kada je konačna koncentracija iznosila 1  $\mu\text{g/mL}$ . Rezultati studentovog t-testa prikazani na grafovima, također potkrjepljuju tu tvrdnju i prikazuju značajnost rezultata upravo za niže koncentracije (1 i 1,25  $\mu\text{g/mL}$ ). Ovakav trend preživljenja stanične linije u ovisnosti o koncentraciji otopina PS-a također je prethodno uočen za staničnu kulturu WI-38, gdje je priloženo i moguće objašnjenje koje se može primijeniti i za staničnu kulturu H1299.



**Slika 4.3.** Rezultati MTT testa (relativnog preživljenja) za staničnu liniju A549 (NT – netretirani uvjet; raspodjela veličina čestica PS-a: 50 – 100 μm, 100 – 200 μm, >200 μm; razrjeđenje početne otopine PS-a: 1000x, 1500x, 2000x)

Slika 4.3. prikazuje rezultate provedenog MTT testa za tumorsku staničnu liniju A549. Iz predstavljenih grafova i istaknutih rezultata statističke analize za signifikantnost pojedinih procesnih parametara vidljivo je da vrijeme ima utjecaj, budući da se preživljenje stanične linije smanjivalo s vremenom izlaganja otopini PS-a. Nakon 24 sata gotovo da i nije bilo smanjenja u relativnom preživljenju stanica, dok je do najvećeg odumiranja u odnosu na netretirane stanice došlo nakon 48 sati. Ovaj navod potvrđuje i statistička analiza u sklopu koje se na grafovima vidi da su statistički najznačajniji rezultati upravo za provedbu MTT testa nakon 48 sati. Test proveden nakon 72 sata pokazao je nešto manje značajan pad u relativnom preživljenju ispitne stanične kulture, što se može pojasniti već prethodno spomenutim efektom prilagodbe tumorskih stanica nakon izvjesnog vremena. Vrijeme prilagodbe se prema dobivenim rezultatima evidentno razlikuje ovisno o staničnoj liniji koja se ispituje.

Raspodjela veličine čestica PS-a na ovu tumorsku staničnu liniju, kao ni na H1299, nije pokazala značajan utjecaj u smislu smanjenja postotka preživjelih stanica, što je vidljivo iz sličnosti trendova sva tri veličinska raspona. Ovakvi rezultati slažu se i s literaturnim podacima istraživanja provedenog na istoj staničnoj liniji s veličinom mikroplastičnih čestica PS-a u iznosu od 1  $\mu\text{m}$  i 10  $\mu\text{m}$  gdje nisu uočene značajnije razlike u relativnom preživljenju.<sup>89</sup>

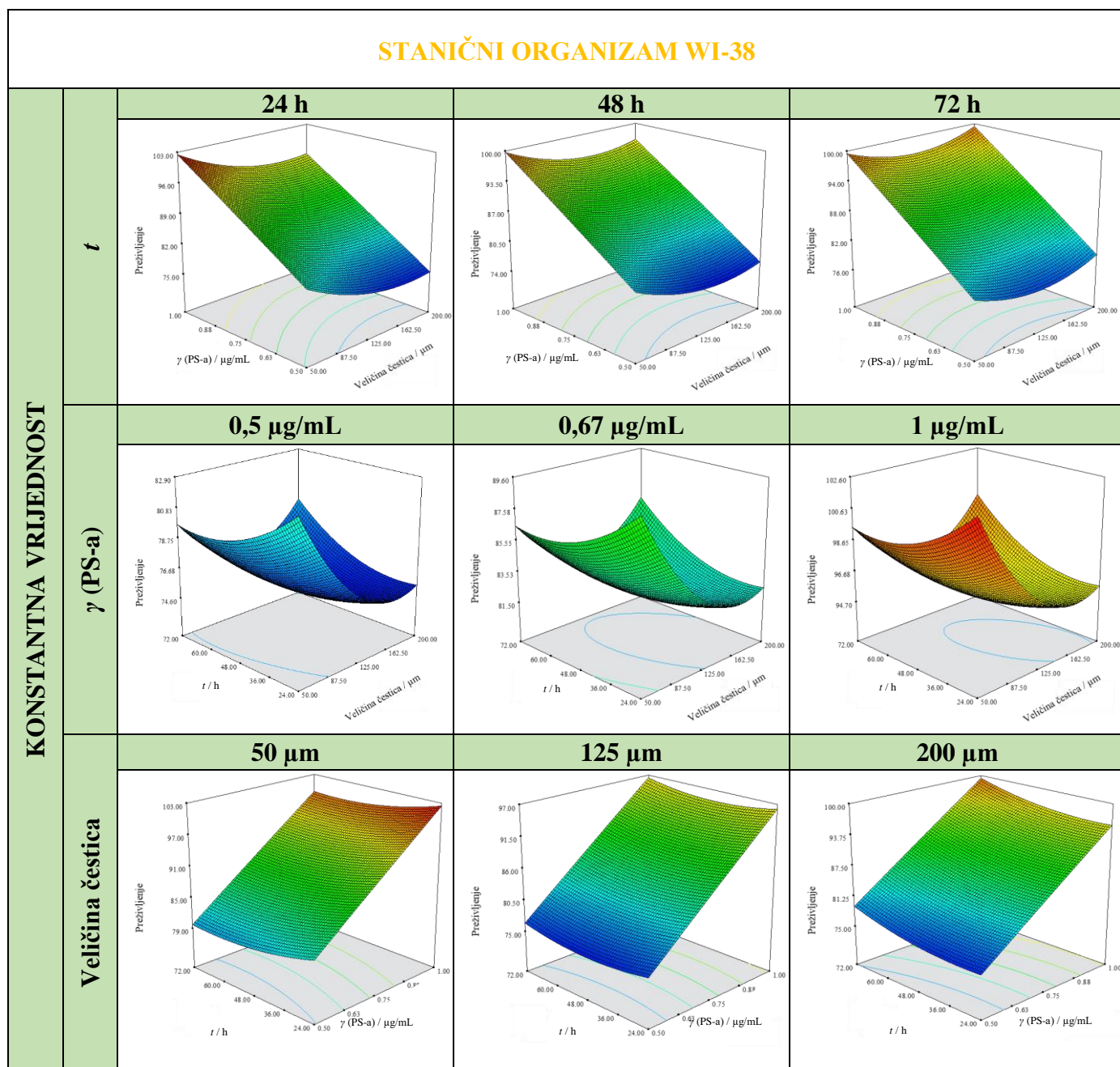
Koncentracije otopina mikroplastike na relativno preživljenje stanične kulture A549 nisu imale značajan utjecaj, budući da nema pretjerane razlike u signifikantnosti rezultata kada se uspoređuju primijenjene različite koncentracije za iste raspodjele veličina čestica u istom vremenu izlaganja.

## 4.2. Potpuni faktorski dizajn

Programski alat Desing Expert 7.1.5. korišten je u svrhu određivanja eksperimentalnih uvjeta kojima je postignuto minimalno preživljenje testnih staničnih linija, odnosno uvjeta pri kojima mikroplastika PS ostvaruje najštetniji utjecaj na stanične linije WI-38, H1299 i A549. U programu je primijenjen puni faktorski plan eksperimenta na tri razine testnih procesnih parametara (-1, 0 i 1). Promatran je utjecaj vremena izlaganja, koncentracije otopina mikroplastike i veličine čestica PS-a, a kao odziv modela uzeta su relativna preživljenja stanica normalizirana na netretirane uvjete.

Tablica 4.1., Tablica 4.2. i Tablica 4.3. predstavljaju dobivene trodimenzionalne prikaze odzivnih površina za preživljenje ispitnih staničnih kultura pod utjecajem mikroplastike PS-a. Za svaku staničnu kultura predstavljena su tri seta trodimenzionalnih prikaza. Prvi set prikazuje utjecaj koncentracije otopina i veličine čestica PS-a pri konstantnim vrijednostima vremena izlaganja.

**Tablica 4.1.** Trodimenzionalni grafički prikaz odzivnih površina za preživljenje stanične linije WI-38 pod utjecajem PS-a

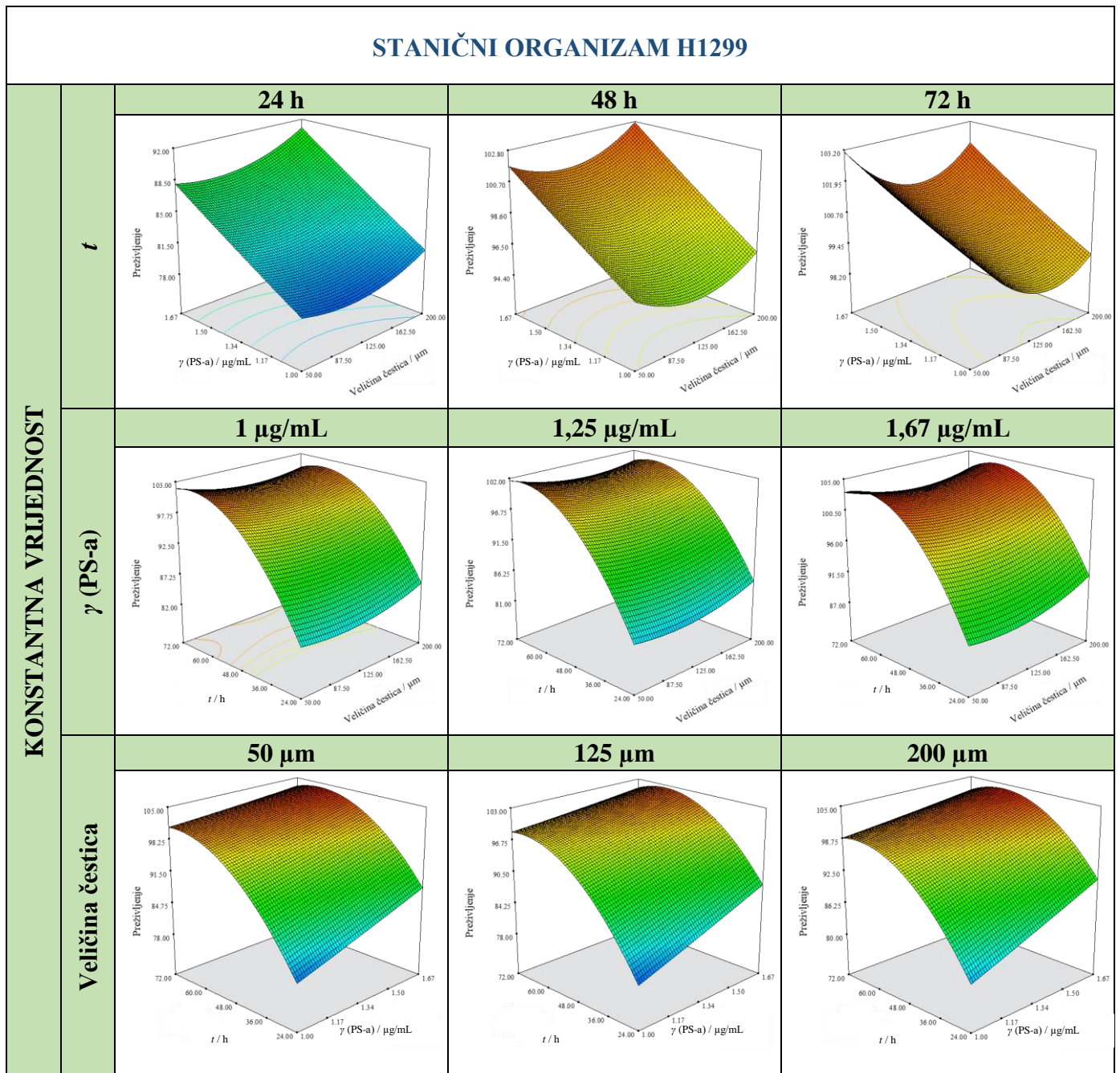


Drugi set prikazuje utjecaj veličine čestica PS-a i vremena izlaganja pri konstantnim vrijednostima koncentracija otopina PS-a. Na posljetku, treći set grafičkih prikaza daje utjecaj koncentracije otopina PS-a i vremena izlaganja pri konstantnim vrijednostima veličine čestica PS-a. Crvena boja na trodimenzionalnim prikazima odzivnih površina označava područja vrijednosti procesnih parametara koja su imala najmanji utjecaj na smanjenje relativnog preživljenja staničnih linija, odnosno uvjete pri kojima nije dolazilo do značajnog odumiranja

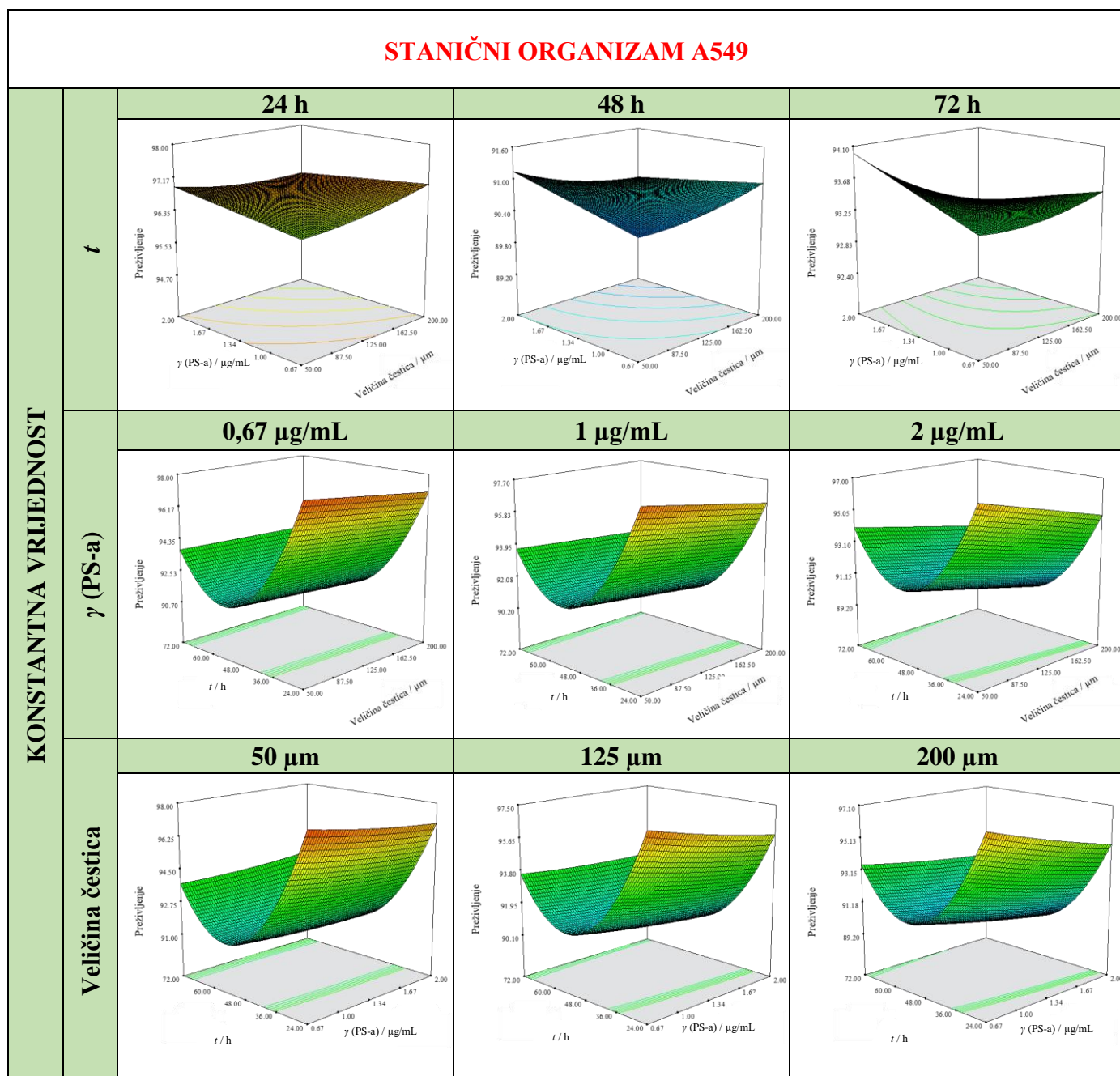


staničnih linija. S druge strane, plava boja označava područja vrijednosti procesnih parametara koja su najviše utjecala na smanjenje preživljenja ispitnih staničnih kultura, odnosno predstavlja uvjete koji su imali najštetniji učinak na preživljenje.

**Tablica 4.2.** Trodimenzionalni grafički prikaz odzivnih površina za preživljenje stanične linije H1299 pod utjecajem PS-a



**Tablica 4.3.** Trodimenzionalni grafički prikaz odzivnih površina za preživljenje stanične linije A549 pod utjecajem PS-a



Prema Tablica 4.1. može se zaključiti da vrijeme izlaganja stanica otopinama PS-a nije imalo značajan utjecaj na preživljenje stanične kulture, što se najbolje vidi iz prvog seta grafičkih prikaza koji međusobno, za sva tri vremena (24 h, 48 h i 72 h) u velikoj mjeri nalikuju jedan drugome. Ipak, sa istog seta grafova vidljivo je kako su uvjeti niske koncentracije (0,5  $\mu\text{g/mL}$ ) i veličine čestica od 100 do 200  $\mu\text{m}$  imale najštetniji učinak na preživljenje. U prilog tome, srednjim setom grafičkih prikaza najjasnije je izražen utjecaj koncentracije, te je vidljivo

da je upravo najniža koncentracija u iznosu od 0,5  $\mu\text{g/mL}$  uzrokovala najveće odumiranje stanica, budući da je 3D graf za navedenu koncentraciju u potpunosti plave boje. Takav izgled grafa može se prokomentirati izostavljanjem najvjerojatnije signifikantnog faktora s grafičkog prikaza, koji je u ovom slučaju koncentracija. Nadalje, do najmanjeg relativnog preživljenja zdrave stanične linije WI-38 dolazi pri uvjetima kada su stanice tretirane otopinama PS-a u rasponu 100 - 200  $\mu\text{m}$ , budući da je na posljednjem setu grafova najintenzivnije plavo obojenje uočeno upravo za taj veličinski razred i dakako pri najnižoj koncentraciji od 0,5  $\mu\text{g/mL}$ .

Tablica 4.2. može se potvrditi značajan utjecaj vremena izlaganja na preživljenje stanične linije H1299, te da je upravo vrijeme izlaganja PS-u od 24 sata uzrokovalo najštetniji učinak u pogledu smanjenja preživljenja. Iz istog seta grafičkih prikaza vidljivo je da smanjenom preživljenju ispitne stanične linije pogoduju uvjeti srednjih veličina čestica PS-a, te što nižih koncentracija. Iz drugog seta grafičkih prikaza može se potvrditi prethodan navod da najniža primijenjena koncentracija u iznosu od 1  $\mu\text{g/mL}$  ima najštetniji utjecaj u vidu preživljenja. Također je vrlo jasno vidljivo da stanice najviše odumiru nakon 24 sata, dok je o utjecaju veličine čestica vrlo teško donijeti ikakav zaključak prema izgledu grafova. Nadalje, s obzirom na sličnost između grafičkih prikaza posljednjeg seta Tablica 4.2. jasno je da veličina čestica PS-a na ovu staničnu kulturu nije imala značajan utjecaj. Ipak, pri veličini od 125  $\mu\text{m}$  vidljivo je nešto intenzivnije plavo obojenje pri uvjetima vremena od 24 sata i koncentraciji od 1  $\mu\text{g/mL}$ .

Tablica 4.3. jasno prikazuje koji procesni parametar je imao najznačajniji utjecaj na smanjenje preživljenja stanične kulture A549, budući da prvi set grafova izgledom uvelike odstupa od ostala dva. Ugibanje grafova drugog i trećeg seta pri vremenu izlaganja stanica mikroplastici u iznosu od 48 sati potvrđuje postizanje najštetnijeg učinka, dok je o utjecaju koncentracije i veličine čestica teško donijeti bilo kakav zaključak, budući da se evidentno ne radi o značajnim faktorima. Međutim, iz blagog nagiba grafova prikazanim drugim setom prema veličini čestica u iznosu od 200  $\mu\text{m}$ , te nešto intenzivnijem plavom obojenju grafa koji označava tu veličinu na posljednjem setu može se zaključiti da je ona uzrokovala najveće odumiranje stanica. Isto tako se dolazi do zaključka da 2  $\mu\text{g/mL}$  predstavlja uvjet za najmanje preživljenje ove stanične linije.

### **4.3. Statistička analiza prema ANOVA-i**

Primjenom potpunog faktorskog dizajna i programskog alata Desing Expert 7.1.5. određeni su uvjeti eksperimenta u kojima je mikroplastika ostvarila najštetniji utjecaj na testne

stanične kulture što je za posljedicu imalo minimalno preživljenje istih, kao što je opisano u poglavlju 3.3.5 – *statistička analiza*.

**Tablica 4.4.** Jednadžbe i statistički podaci za modele trodimenzionalnih odzivnih površina dobivenih za testove preživljenja staničnih linija pod utjecajem PS-a

Stanični organizam	Jednadžba modela	Statistički podaci			Utjecajni faktor modela (bazirano na $p$ vrijednosti)	Utjecajni procesni parametri
		$R^2$	$R^2_{adj}$	$p^*$		
WI-38	$Preživljenje = 85,17 - 1,82*A + 10,00*B + 0,17*C + 0,12*AB + 1,67*AC + 0,000*BC + 2,94*A^2 - 0,099*B^2 + 1,28*C^2$	0,9381	0,9053	<0,0001	A, B, $A^2$	Veličina čestica PS-a, $\gamma$ (PS-a)
H1299	$Preživljenje = 97,49 + 0,24*A + 3,11*B + 8,30*C + 0,25*AB - 0,92*AC - 1,74*BC + 1,56*A^2 + 0,11*B^2 - 6,11*C^2$	0,9195	0,8769	<0,0001	B, C, $C^2$	$\gamma$ (PS-a), vrijeme
A549	$Preživljenje = 90,61 - 0,61*A - 0,50*B - 1,62*C - 0,32*AB + 0,17*AC + 0,31*BC + 0,000*A^2 + 0,11*B^2 + 4,33*C^2$	0,8292	0,7387	<0,0001	C, $C^2$	vrijeme

\* $p < 0,05$  – smatraju se signifikantnima; A: veličina čestica PS-a ( $\mu\text{m}$ ); B:  $\gamma$  (PS-a) ( $\mu\text{g/mL}$ ); C: vrijeme (h)

Tablica 4.4. prikazuje statističke podatke dobivene analizom varijance (ANOVA-e) za procjenu signifikantnosti triju ispitanih modela, utjecajne procesne parametre svakog pojedinog modela, te polinome koji predstavljaju matematičke modele za predviđanje ponašanja promatranih sustava. Prema literaturi, svi modeli i/ili članovi modela su signifikantni ukoliko im je vrijednost  $p$  (pogreška modela) manja od 0,05.<sup>90</sup> U Tablica 4.4. može se vidjeti da za sve dobivene modele  $p$  iznosi manje od 0,05 prema čemu se može zaključiti da su svi modeli signifikantni odnosno značajni. Regresijski koeficijent ( $R^2$ ) je pokazatelj slaganja eksperimentalnih i modelom predviđenih podataka te u idealnom slučaju iznosi 1. Visoki regresijski koeficijenti ( $R^2$ ) u kombinaciji s visokim korigiranim regresijskim koeficijentima ( $R^2_{adj}$ ) ukazuju na dobar odabir modela prilikom analize. U ovome radu, svi modeli opisuju između 70 do 90 % prikazanih podataka s mogućim niskim postotkom pogreške modela što

ukazuje na prihvatljiv odabir modela. Utjecajni procesni parametri triju postavljenih modela također su određeni na temelju pojedinih  $p$  vrijednosti kako je navedeno u opisu Tablica 4.4. Prema tome je ustanovljeno da su utjecajni procesni parametri prvog modela za staničnu kulturu WI-38 veličina čestica PS-a i koncentracija otopina, drugog modela za staničnu kulturu H1299 koncentracija otopina i vrijeme izlaganja, te trećeg modela za staničnu kulturu A549 isključivo vrijeme izlaganja. Dobivene vrijednosti ukazuju da svaki ispitani model, odnosno svaka stanična linija ima zasebne utjecajne procesne parametre. Međutim, ono što valja istaknuti je ponavljanje koncentracije kao utjecajnog procesnog parametra za staničnu liniju WI-38 i H1299, te vremena za H1299 i A549. Iz toga se može izvesti zaključak da je u ovom radu najmanji utjecaj na preživljenje ispitnih staničnih linija pokazala veličina čestica. To može biti pojašnjeno nemogućnošću usitnjavanja mikroplastike do raspodjele veličine čestica koja bi bila kompetentna za provođenje ispitivanja o citotoksičnosti PS-a, te ostvarenju signifikantnijih rezultata u vidu smanjenja preživljenja staničnih linija. Stoga se za provođenje budućih istraživanja sugerira upotreba čestica PS-a manje raspodjele veličine.

**Tablica 4.5.** Optimalni uvjeti za minimalno preživljenje staničnih kultura pod utjecajem PS-a

Stanični organizam	Veličina čestica PS-a ( $\mu\text{m}$ )	$\gamma$ (PS-a) ( $\mu\text{g/mL}$ )	Vrijeme (h)	Preživljenje (%)
WI-38	157,01	0,50	39,74	74,63
H1299	103,11	1,00	24,00	78,20
A549	200,00	2,00	51,17	89,22

U Tablica 4.5. se nalaze konačno dobiveni uvjeti promatranih procesnih parametara pri kojima se prema provedenim eksperimentima ostvarilo minimalno preživljenje staničnih kultura pod utjecajem otopina mikroplastike PS-a. Za staničnu liniju WI-38 optimalni uvjeti pri kojima je preživljenje iznosilo 74,63% bili su: veličina čestica PS-a 157,01  $\mu\text{m}$ , koncentracija otopina PS-a 0,50  $\mu\text{g/mL}$  i vrijeme 39,74 sata. Za staničnu liniju H1299 optimalni uvjeti pri kojima je preživljenje iznosilo 78,20% bili su: veličina čestica PS-a 103,11  $\mu\text{m}$ , koncentracija otopina PS-a 1,00  $\mu\text{g/mL}$  i vrijeme 24 sata. Za staničnu liniju A549 optimalni uvjeti pri kojima je preživljenje iznosilo 89,22% bili su: veličina čestica PS-a 200  $\mu\text{m}$ , koncentracija otopina PS-a 2,00  $\mu\text{g/mL}$  i vrijeme 51,17 sata. Iz predstavljenog se može zaključiti da je općenito veličina čestica u rasponu 100-200  $\mu\text{m}$  pokazala najštetniji utjecaj što se može objasniti prethodno opisanim dvama efektima. Jedan je vezan uz ograničavajuću veličinu samih stanica za prodor PS mikročestica, zbog čega štetniji utjecaj na stanice imaju veće čestice PS-a koje uzrokuju

intenzivnije izvanstanično opterećenje i time dovode do odumiranja istih.<sup>71,87</sup> Drugi je pak vezan uz kompenzaciju većeg ukupnog broja čestica manje veličine u istom volumenu u odnosu na veće čestice, što pogoduje olakšanom stvaranju agregata koji onemogućavaju učinak mikroplastike na stanicu.<sup>88,89</sup> Za stanične linije WI-38 i H1299 niže koncentracije otopina PS-a pokazale su štetniji utjecaj na preživljenje što se pojasnilo formiranjem aglomerata hidrofobnih mikroplastičnih čestica pri većim koncentracijama, koji za posljedicu imaju otežano djelovanje na stanične kulture u smislu smanjenja preživljenja.<sup>87</sup> Optimalno vrijeme za postizanje najštetnijeg učinka razlikovalo se ovisno o ispitnoj staničnoj kulturi. Za tumorske stanične linije H1299 i A549 dobiveno optimalno vrijeme izlaganja može se objasniti vremenom potrebnim za prilagodbu stanica postavljenim eksperimentalnim uvjetima, prije kojega se postiže minimalno preživljenje.<sup>86</sup> Dok za zdravu staničnu liniju WI-38 vrijeme nije predstavljalo značajan procesni parametar, budući da su stanice preosjetljive da uspostave prilagodbu na eksperimentalne uvjete, te se približno jednako odumiranje stanica postizalo pri sva tri vremena, a kao optimalno je navedeno 39,74.

S obzirom na sve navedeno, može se zaključiti da su potrebna daljnja istraživanja kako bi se ispitale dodatne vrijednosti postavljenih procesnih parametara, najviše u pogledu smanjenja raspodjele veličine čestica PS-a. Također uključivanjem novih procesnih parametara poput oblika i morfološke analize mikroplastičnih čestica, kao i praćenja drugih rezultata osim relativnog preživljenja stanica stekao bi se detaljniji uvid u štetne učinke koje PS mikroplastika može imati na humane plućne stanične linije i ljudsko zdravlje općenito.

## 5. Zaključak

Plastika je od polovine prošlog stoljeća do danas postala jedan od najšire primjenjivanih materijala zahvaljujući svojim jedinstvenim svojstvima i ekonomskoj prihvatljivosti. Međutim, konstantan porast proizvodnje, te pretjerano i neodrživo korištenje i loše gospodarenje plastičnim otpadom stvorilo je rastući ekološki problem modernog doba. U novije vrijeme, velik broj znanstvenih istraživanja usmjerio se prema mikroplastici, koja nastaje kao posljedica fragmentacije plastičnog otpada na sitnije čestice uslijed okolišnih uvjeta. Problem kretanja mikroplastike u okolišu, te integracije u različite ekosustave i konačnog utjecaja na čovjeka i njegovo zdravlje zasad još uvijek predstavlja nedovoljno istraženo područje.

Cilj istraživanja bio je ispitati učinak mikročestica polistirena na humane plućne stanične linije zdravog (WI-38) i tumorskog porijekla (H1299 i A549) u ovisnosti o rasponu veličina čestica, koncentraciji otopina mikroplastike i vremenu izlaganja. Programom Desing Expert 7.1.5. određeni su eksperimentalni uvjeti kojima je postignut najštetniji učinak mikroplastike na ispitne stanične linije, odnosno uvjeti pri kojima je relativno preživljenje stanica bilo najniže. Nakon provedenih eksperimenata može se donijeti zaključak da štetan učinak mikroplastike PS-a na ispitne stanične linije u pogledu smanjenja relativnog preživljenja postoji.

Za staničnu liniju WI-38 minimalno preživljenje (74,63%) ostvareno je pri uvjetima: 157,01  $\mu\text{m}$  (veličina čestica PS-a), 0,50  $\mu\text{g/mL}$  (koncentracija otopina PS-a) i 39,74 sata (vrijeme izlaganja). Stanična linija H1299 najniže preživljenje (78,20%) ima pri uvjetima: 103,11  $\mu\text{m}$  (veličina čestica PS-a), 1,00  $\mu\text{g/mL}$  (koncentracija otopina PS-a) i 24 sata (vrijeme izlaganja). Na posljetku, stanična linija A549 najmanje preživljenje (89,22%) ostvarila je pri sljedećim uvjetima: 200  $\mu\text{m}$  (veličina čestica PS-a), 2,00  $\mu\text{g/mL}$  (koncentracija otopina PS-a) i 51,17 sata (vrijeme izlaganja). Prema tome se donosi zaključak da je općenito koncentracija u rasponu 100-200  $\mu\text{m}$  imala najštetniji učinak, najvjerojatnije zbog izvanstaničnog opterećenja i stvaranja agregata sitnijih čestica PS-a. Niže koncentracije otopina pokazale su štetniji učinak na stanične linije WI-38 i H1299, što se objasnilo formiranjem aglomerata pri većim koncentracijama. Dok je najštetnije vrijeme izlaganja mikroplastičnim česticama variralo ovisno o vrsti ispitne stanične kulture, a za tumorske stanice pretpostavljeno ovisilo o prilagodbi stanica na postavljene eksperimentalne uvjete.

Na kraju se može zaključiti da je na ovom području potrebno provesti daljnja istraživanja kako bi se šire ispitali eksperimentalni uvjeti, najviše u pogledu smanjenja veličine čestica PS-a, te stekao opsežniji uvid u štetne učinke koje mikroplastika može imati na ljudsko zdravlje.

## 6. Literatura

- (1) Xia W, Rao Q, Deng X, Chen J, Xie P (2020) Rainfall Is a Significant Environmental Factor of Microplastic Pollution in Inland Waters. *Sci Total Environ* 732:139065.
- (2) Roser, H. R. and M. Hannah Ritchie and Max Roser (2018) - “Mental Health”. Published Online at OurWorldInData.Org. Retrieved from: ‘<https://Ourworldindata.Org/Mental-Health>’ [Online Resource]. *Ment. Health (Lond)*.
- (3) Xu, C.; Zhang, B.; Gu, C.; Shen, C.; Yin, S.; Aamir, M.; Li, F. Are We Underestimating the Sources of Microplastic Pollution in Terrestrial Environment? *J. Hazard. Mater.* 2020, 400, 123228.
- (4) Rocha-Santos, T.; Duarte, A. C. A Critical Overview of the Analytical Approaches to the Occurrence, the Fate and the Behavior of Microplastics in the Environment. *TrAC - Trends Anal. Chem.* (2015), 65, 47–53.
- (5) Dehghani, S.; Moore, F.; Akhbarizadeh, R. Microplastic Pollution in Deposited Urban Dust, Tehran Metropolis, Iran. *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2017), 24 (25), 20360–20371.
- (6) Leal Filho, W.; Saari, U.; Fedoruk, M.; Iital, A.; Moora, H.; Klöga, M.; Voronova, V. An Overview of the Problems Posed by Plastic Products and the Role of Extended Producer Responsibility in Europe. *J. Clean. Prod.* (2019), 214, 550–558.
- (7) Horton, A. A.; Walton, A.; Spurgeon, D. J.; Lahive, E.; Svendsen, C. Microplastics in Freshwater and Terrestrial Environments: Evaluating the Current Understanding to Identify the Knowledge Gaps and Future Research Priorities. *Sci. Total Environ.* (2017), 586, 127–141.
- (8) Merga, L. B.; Redondo-Hasselerharm, P. E.; Van den Brink, P. J.; Koelmans, A. A. Distribution of Microplastic and Small Macroplastic Particles across Four Fish Species and Sediment in an African Lake. *Sci. Total Environ.* (2020), 741, 140527.
- (9) Weinstein, J. E.; Crocker, B. K.; Gray, A. D. From Macroplastic to Microplastic: Degradation of High-Density Polyethylene, Polypropylene, and Polystyrene in a Salt Marsh Habitat. *Environ. Toxicol. Chem.* (2016), 35 (7), 1632–1640.
- (10) Klein, M.; Fischer, E. K. Microplastic Abundance in Atmospheric Deposition within the Metropolitan Area of Hamburg, Germany. *Sci. Total Environ.* (2019), 685, 96–103.
- (11) Wright, Stephanie; Mudway, I. (2019). The Ins and Outs of Microplastics. *Annals of Internal Medicine*, 171(7), 514–. *Proc. Natl. Acad. Sci.*
- (12) Xia, W.; Rao, Q.; Deng, X.; Chen, J.; Xie, P. Rainfall Is a Significant Environmental Factor of Microplastic Pollution in Inland Waters. *Sci. Total Environ.* (2020), 732,



- 139065.
- (13) Rodrigues, M. O.; Abrantes, N.; Gonçalves, F. J. M.; Nogueira, H.; Marques, J. C.; Gonçalves, A. M. M. Spatial and Temporal Distribution of Microplastics in Water and Sediments of a Freshwater System (Antuã River, Portugal). *Sci. Total Environ.* (2018), *633*, 1549–1559.
  - (14) Wang, Y.; Wang, X.; Li, Y.; Li, J.; Liu, Y.; Xia, S.; Zhao, J. Effects of Exposure of Polyethylene Microplastics to Air, Water and Soil on Their Adsorption Behaviors for Copper and Tetracycline. *Chem. Eng. J.* (2021), *404*, 126412.
  - (15) Gaston, E.; Woo, M.; Steele, C.; Sukumaran, S.; Anderson, S. *Microplastics Differ Between Indoor and Outdoor Air Masses: Insights from Multiple Microscopy Methodologies*; (2020); Vol. 74.
  - (16) Piehl, S.; Leibner, A.; Löder, M. G. J.; Dris, R.; Bogner, C.; Laforsch, C. Identification and Quantification of Macro- and Microplastics on an Agricultural Farmland. *Sci. Rep.* (2018), *8* (1), 1–9.
  - (17) Peng X, Chen M, Chen S, Dasgupta S, Xu H, Ta K et Al (2018) Microplastics Contaminate the Deepest Part of the World’s Ocean. *Geochem Perspect Lett* 9:1– 5.
  - (18) Peeken, I.; Primpke, S.; Beyer, B.; Gütermann, J.; Katlein, C.; Krumpfen, T.; Bergmann, M.; Hehemann, L.; Gerdt, G. Arctic Sea Ice Is an Important Temporal Sink and Means of Transport for Microplastic. *Nat. Commun.* (2018), *9*.
  - (19) Barboza, L. G. A.; Dick Vethaak, A.; Lavorante, B. R. B. O.; Lundebye, A. K.; Guilhermino, L. Marine Microplastic Debris: An Emerging Issue for Food Security, Food Safety and Human Health. *Mar. Pollut. Bull.* (2018), *133*, 336–348.
  - (20) Mason, S. A.; Welch, V. G.; Neratko, J. Synthetic Polymer Contamination in Bottled Water. *Front. Chem.* (2018)
  - (21) Galloway, T. S.; Cole, M.; Lewis, C. Interactions of Microplastic Debris throughout the Marine Ecosystem. *Nat. Ecol. Evol.* (2017), *1* (5), 1–8.
  - (22) Crawford, C. B.; Quinn, B. Plastic Production, Waste and Legislation. *Microplastic Pollut.* (2017), *306*, 39–56.
  - (23) Muenmee, S.; Chiemchaisri, W.; Chiemchaisri, C. Microbial Consortium Involving Biological Methane Oxidation in Relation to the Biodegradation of Waste Plastics in a Solid Waste Disposal Open Dump Site. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* (2015), *102*, 172–181.
  - (24) Hashmi, M. Z.; Strezov, V. *Emerging Contaminants and Associated Treatment Technologies Series Editors.*

- (25) Thompson, R. C.; Olson, Y.; Mitchell, R. P.; Davis, A.; Rowland, S. J.; John, A. W. G.; McGonigle, D.; Russell, A. E. Lost at Sea: Where Is All the Plastic? *Science* (80- ). (2004), 304 (5672), 838.
- (26) Buchanan, J. B. Pollution by Synthetic : Fibres Oiled Birds in Holland. *Mar. Pollut. Bull.* (1971), 2, 23.
- (27) Koelmans, A. A., Besseling, E., & Shim, W. J. Marine Anthropogenic Litter. *Mar. Anthropog. Litter* (2015), 1–447.
- (28) Auta, H. S.; Emenike, C. U.; Fauziah, S. H. Distribution and Importance of Microplastics in the Marine Environment A Review of the Sources, Fate, Effects, and Potential Solutions. *Environ. Int.* (2017), 102, 165–176.
- (29) Crawford, C. B.; Quinn, B. Microplastics, Standardisation and Spatial Distribution. *Microplastic Pollut.* (2017), 101–130.
- (30) Castañeda, R. A.; Avlijas, S.; Anouk Simard, M.; Ricciardi, A. Microplastic Pollution in St. Lawrence River Sediments. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* (2014), 71 (12), 1767–1771.
- (31) Cole, M.; Lindeque, P.; Halsband, C.; Galloway, T. S. Microplastics as Contaminants in the Marine Environment: A Review. *Mar. Pollut. Bull.* (2011), 62 (12), 2588–2597.
- (32) Andrady, A. L. Microplastics in the Marine Environment. *Mar. Pollut. Bull.* (2011), 62 (8), 1596–1605.
- (33) Barnes, D. K. A.; Galgani, F.; Thompson, R. C.; Barlaz, M. Accumulation and Fragmentation of Plastic Debris in Global Environments. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* (2009), 364 (1526), 1985–1998.
- (34) Andrady, A. L. The Plastic in Microplastics: A Review. *Mar. Pollut. Bull.* (2017), 119 (1), 12–22.
- (35) Booth, A. Torbjørn Nguyen Master ' s Thesis Evaluation of Environmental Conditions on the Sorption of PAHs onto Synthetic and Natural Fibres. (2019)
- (36) Geyer, R.; Jambeck, J. R.; Law, K. L. Production, Use, and Fate of All Plastics Ever Made. *Sci. Adv.* (2017), 3 (7), 25–29.
- (37) Crawford, C. B.; Quinn, B. *Physiochemical Properties and Degradation*; (2017).
- (38) Agboola, O.; Sadiku, R.; Mokrani, T.; Amer, I.; Imoru, O. *Polyolefins and the Environment*; (2017).
- (39) <https://www.printed-tapes.com/en/polyethylene-as-the-material-for-marking-tapes;> pristup stranici 27. travnja 2022.
- (40) [https://commons.wikimedia.org/wiki/file:polypropylen.svg;](https://commons.wikimedia.org/wiki/file:polypropylen.svg) pristup stranici 27. travnja 2022.

- (41) Turner, A.; Filella, M. Polyvinyl Chloride in Consumer and Environmental Plastics, with a Particular Focus on Metal-Based Additives. *Environ. Sci. Process. Impacts* (2021), 23 (9), 1376–1384.
- (42) [https://simple.wikipedia.org/wiki/polyvinyl\\_chloride](https://simple.wikipedia.org/wiki/polyvinyl_chloride); pristup stranici 27. travnja 2022.
- (43) Kik, K.; Bukowska, B.; Sicińska, P. Polystyrene Nanoparticles: Sources, Occurrence in the Environment, Distribution in Tissues, Accumulation and Toxicity to Various Organisms. *Environ. Pollut.* (2020), 262.
- (44) Mandal, S.; Dey, A. PET Chemistry. *Recycl. Polyethyl. Terephthalate Bottles* (2019), 1–22.
- (45) Wu, P.; Huang, J.; Zheng, Y.; Yang, Y.; Zhang, Y.; He, F.; Chen, H.; Quan, G.; Yan, J.; Li, T.; Gao, B. Environmental Occurrences, Fate, and Impacts of Microplastics. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* (2019), 109612.
- (46) Waldschläger, K.; Lechthaler, S.; Stauch, G.; Schüttrumpf, H. The Way of Microplastic through the Environment – Application of the Source-Pathway-Receptor Model (Review). *Sci. Total Environ.* (2020), 713, 136584.
- (47) Besseling, E.; Quik, J. T. K.; Sun, M.; Koelmans, A. A. Fate of Nano- and Microplastic in Freshwater Systems: A Modeling Study. *Environ. Pollut.* (2017), 220, 540–548.
- (48) <https://www.sciencelearn.org.nz/resources/691-ocean-motion>; pristup stranici 4. svibnja 2022.
- (49) Singh, S.; Khanna, V. K.; Pant, A. B. *Development of In Vitro Toxicology: A Historic Story*; Elsevier Inc., (2018).
- (50) Worth, A. P. *Types of Toxicity and Applications of Toxicity Testing*; Elsevier Inc., (2018).
- (51) Belden, J. *Introduction to Ecotoxicology*; INC, (2020).
- (52) Wright, S. L.; Thompson, R. C.; Galloway, T. S. The Physical Impacts of Microplastics on Marine Organisms: A Review. *Environ. Pollut.* (2013), 178, 483–492.
- (53) Collignon, A.; Hecq, J. H.; Glagani, F.; Voisin, P.; Collard, F.; Goffart, A. Neustonic Microplastic and Zooplankton in the North Western Mediterranean Sea. *Mar. Pollut. Bull.* (2012), 64 (4), 861–864.
- (54) Wang, W.; Gao, H.; Jin, S.; Li, R.; Na, G. The Ecotoxicological Effects of Microplastics on Aquatic Food Web, from Primary Producer to Human: A Review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* (2019), 110–117.
- (55) Baechler, B. R.; Stienbarger, C. D.; Horn, D. A.; Joseph, J.; Taylor, A. R.; Granek, E. F.; Brander, S. M. Microplastic Occurrence and Effects in Commercially Harvested North American Finfish and Shellfish: Current Knowledge and Future Directions. *Limnol.*

- Oceanogr. Lett.* (2020), 5 (1), 113–136.
- (56) <https://earthhero.com/what-are-microplastics/>; pristup stranici 5. svibnja 2022.
- (57) Amelia, T. S. M.; Khalik, W. M. A. W. M.; Ong, M. C.; Shao, Y. T.; Pan, H. J.; Bhubalan, K. Marine Microplastics as Vectors of Major Ocean Pollutants and Its Hazards to the Marine Ecosystem and Humans. *Prog. Earth Planet. Sci.* (2021), 8 (1).
- (58) Espinosa, C.; Esteban, M. Á.; Cuesta, A. Microplastics in Aquatic Environments and Their Toxicological Implications for Fish. *Licens. InTech* (2016), 113–145.
- (59) Pope, C. N.; Schlenk, D.; Baud, F. J. History and Basic Concepts of Toxicology. *An Introd. to Interdiscip. Toxicol.* (2020), 3–15.
- (60) [http://www.chemsafetypro.com/topics/CRA/toxicology\\_dose\\_descriptors.html](http://www.chemsafetypro.com/topics/CRA/toxicology_dose_descriptors.html); pristup stranici 11. svibnja 2022.
- (61) Grela, E.; Kozłowska, J.; Grabowiecka, A. Current Methodology of MTT Assay in Bacteria – A Review. *Acta Histochem.* (2018), 120 (4), 303–311.
- (62) <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/technical-documents/protocol/cell-culture-and-cell-culture-analysis/cell-counting-and-health-analysis/cell-proliferation-kit-i-mtt>; pristup stranici 12. svibnja 2022.
- (63) Ali-boucetta, H.; Al-jamal, K. T. Chapter 19 Cytotoxic Assessment of Carbon Nanotube Interaction. (2011), 299–312.
- (64) <https://researchtweet.com/mtt-assay-protocol-for-cell-viability/>; pristup stranici 12. svibnja 2022.
- (65) Deng, Y.; Zhang, Y.; Lemos, B.; Ren, H. Tissue Accumulation of Microplastics in Mice and Biomarker Responses Suggest Widespread Health Risks of Exposure. *Sci. Rep.* (2017), 1–10.
- (66) Hou, B.; Wang, F.; Liu, T.; Wang, Z. Reproductive Toxicity of Polystyrene Microplastics: In Vivo Experimental Study on Testicular Toxicity in Mice. *J. Hazard. Mater.* (2021), 405.
- (67) Jin, H.; Ma, T.; Sha, X.; Liu, Z.; Zhou, Y.; Meng, X.; Chen, Y.; Han, X.; Ding, J. Polystyrene Microplastics Induced Male Reproductive Toxicity in Mice. *J. Hazard. Mater.* (2021), 401.
- (68) Xie, X.; Deng, T.; Duan, J.; Xie, J.; Yuan, J.; Chen, M. Exposure to Polystyrene Microplastics Causes Reproductive Toxicity through Oxidative Stress and Activation of the P38 MAPK Signaling Pathway. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* (2020), 190.
- (69) Lu, L.; Wan, Z.; Luo, T.; Fu, Z.; Jin, Y. Polystyrene Microplastics Induce Gut Microbiota

- Dysbiosis and Hepatic Lipid Metabolism Disorder in Mice. *Sci. Total Environ.* (2018), 631–632, 449–458.
- (70) Li, B.; Ding, Y.; Cheng, X.; Sheng, D.; Xu, Z.; Rong, Q.; Wu, Y.; Zhao, H.; Ji, X.; Zhang, Y. Polyethylene Microplastics Affect the Distribution of Gut Microbiota and Inflammation Development in Mice. *Chemosphere* (2020), 244.
- (71) Stock, V.; Laurisch, C.; Franke, J.; Dönmez, M. H.; Voss, L.; Böhmert, L.; Braeuning, A.; Sieg, H. Uptake and Cellular Effects of PE, PP, PET and PVC Microplastic Particles. *Toxicol. Vitro.* (2021), 70.
- (72) Liu, S.; Wu, X.; Gu, W.; Yu, J.; Wu, B. Influence of the Digestive Process on Intestinal Toxicity of Polystyrene Microplastics as Determined by in Vitro Caco-2 Models. *Chemosphere* (2020), 256, 127204.
- (73) Hwang, J.; Choi, D.; Han, S.; Jung, S. Y.; Choi, J.; Hong, J. Potential Toxicity of Polystyrene Microplastic Particles. *Sci. Rep.* (2020), 10, 1–12.
- (74) Choi, D.; Hwang, J.; Bang, J.; Han, S.; Kim, T.; Oh, Y.; Hwang, Y.; Choi, J.; Hong, J. In Vitro Toxicity from a Physical Perspective of Polyethylene Microplastics Based on Statistical Curvature Change Analysis. *Sci. Total Environ.* (2021), 752, 142242.
- (75) Schirinzi, G. F.; Pérez-Pomeda, I.; Sanchís, J.; Rossini, C.; Farré, M.; Barceló, D. Cytotoxic Effects of Commonly Used Nanomaterials and Microplastics on Cerebral and Epithelial Human Cells. *Environ. Res.* (2017), 159, 579–587.
- (76) Hwang, J.; Choi, D.; Han, S.; Choi, J.; Hong, J. An Assessment of the Toxicity of Polypropylene Microplastics in Human Derived Cells. *Sci. Total Environ.* (2019), 684, 657–669.
- (77) Dong, C. Di; Chen, C. W.; Chen, Y. C.; Chen, H. H.; Lee, J. S.; Lin, C. H. Polystyrene Microplastic Particles: In Vitro Pulmonary Toxicity Assessment. *J. Hazard. Mater.* (2020), 385, 121575.
- (78) Sahoo, P.; Barman, T. K. ANN Modelling of Fractal Dimension in Machining. *Mechatronics Manuf. Eng.* (2012), 159–226.
- (79) Cavazzuti, M. Optimization Methods: From Theory to Design Scientific and Technological Aspects in Mechanics. *Optim. Methods From Theory to Des. Sci. Technol. Asp. Mech.* (2013), 1–262..
- (80) J. Arnerić, Kristijan Potrka, Modeli analize varijance (ANOVA), (2019.-2020.), Matematicko- fizički list, LXX 1.
- (81) <https://www.statisticssolutions.com/manova-analysis-anova/>; pristup stranici 7. kolovoza 2022.

- (82) <https://www.statisticshowto.com/probability-and-statistics/hypothesis-testing/anova/>; pristup stranici 7. kolovoza 2022.
- (83) <https://www.atcc.org/products/ccl-75>; pristup stranici 13. svibnja 2022.
- (84) <https://www.atcc.org/products/crl-5803>; pristup stranici 13. svibnja 2022.
- (85) <https://www.atcc.org/products/ccl-185>; pristup stranici 18. srpnja 2022.
- (86) Kim, H.; Zaheer, J.; Choi, E. J.; Kim, J. S. Enhanced ASGR2 by Microplastic Exposure Leads to Resistance to Therapy in Gastric Cancer. *Theranostics* (2022), 12 (7), 3217–3236. h
- (87) Choi, D.; Bang, J.; Kim, T.; Oh, Y.; Hwang, Y.; Hong, J. *In Vitro Chemical and Physical Toxicities of Polystyrene Microfragments in Human-Derived Cells*; Elsevier B.V., (2020); Vol. 400.
- (88) Bruinink, A.; Wang, J.; Wick, P. Effect of Particle Agglomeration in Nanotoxicology. *Arch. Toxicol.* (2015), 89 (5), 659–675.
- (89) Goodman, K. E.; Hare, J. T.; Khamis, Z. I.; Hua, T.; Sang, Q. X. A. Exposure of Human Lung Cells to Polystyrene Microplastics Significantly Retards Cell Proliferation and Triggers Morphological Changes. *Chem. Res. Toxicol.* (2021), 34 (4), 1069–1081.
- (90) R. H. Myer, D. C. Montgomery, *Response Surface Methodology, Process and Product Optimization Usign Designed Experiments*, 2nd Edition, John Wiley and Sons, New York, SAD, (2002)

## 7. Simboli i oznake

ANOVA – metoda analize varijance

BPA – bisfenol A

DDT - diklordifeniltrikloretan

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO – dimetil sulfoksid

DPBS - Dulbecco's Phosphate Buffered Saline

EBSS - Earle's Balanced Salt Solution s kalcijevim i magnezijevim solima

EC<sub>50</sub> – efektivna koncentracija koja je izazvala učinak na 50% populacije

ED<sub>50</sub> – efektivna doza koja je izazvala učinak na 50% populacije

FBS – fetalni goveđi serum

HDF – humane stanice dermalnih fibroblasta

HDPE – polietilen visoke gustoće

HMC-1 – stanice humanih mastocita

IC<sub>50</sub> – koncentracija štetne tvari koja inhibira 50% stanične populacije

LC<sub>50</sub> – letalna koncentracija koja je izazvala smrt kod 50% populacije

LD<sub>50</sub> – letalna doza koja je izazvala smrt kod 50% populacije

LDPE – polietilen niske gustoće

LOEC – najniža koncentracija tvari s vidljivim štetnim učinkom

MAP – makroplastika

MDPE – polietilen srednje gustoće

MEM - Minimum Essential Medium Eagle

MEP – mezoplastika

MP – mikroplastika

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolijev bromid

NP – nanoplastika

NOEC – najviša koncentracija tvari bez vidljivog štetnog učinka

USEPA – *U.S. Environmental Protection Agency*

PAH – policiklički aromatski ugljikovodici

PBC – polikloriranih bifenila

PBDE – polibromirani difenil eteri

PBMC - mononuklearne stanice periferne krvi

PCB – poliklorirani bifenili

PE – polietilen

PES - poliester

PET – poli(etilen-tereftalat)

POPs - postojsane organske onečišćujuće tvari

PP – polipropilen

PS – polistiren

PU – poliuretan

PVC – poli(vinil-klorid)

$R^2$  – Regresijski koeficijent

$R^2_{adj}$  - korigiranim regresijski koeficijent

ROS – reaktivne kisikove vrste

RS – Ramanova spektroskopija

RSM – metoda odzivnih površina (eng. *Response Surface Methodology*)

T-CHO – razina ukupnog kolesterola

TG – razina triglicerida

THF – tetrahidrofuran

$t$  – vrijeme (sat;h)

$\gamma$  – masena koncentracija mikroplastike, mg/L



## 8. Životopis

Iva Polonji [REDACTED] Pohađala je osnovnu školu „OŠ Vrbani“ i VIII. opću gimnaziju „Gimnazija Tituša Brezovačkog“, u Zagrebu. Osnovnu i srednju školu završila je s odličnim uspjehom. Nakon završetka srednje škole, 2017. godine upisala je Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, preddiplomski studij Primijenjena kemija. Završni rad (<https://www.bib.irb.hr/1080377>) izradila je na Zavodu za organsku kemiju pod mentorstvom doc. dr. sc. Dragane Vuk. Stručnu praksu odradila je na Zavodu za mljekarstvo Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu u referentnom laboratoriju za mlijeko i mliječne proizvode. Po završetku preddiplomskog studija, 2020. godine upisala je diplomski studij Primijenjene kemije na istoimenom fakultetu, modul „Kemija okoliša“. U akademskoj godini (2020./2021.) uključila se u rad na Fakultetu putem demonstratura iz Analitičke kemije I te izradom edukativnog video sadržaja (<https://www.bib.irb.hr/1127016>) pod mentorstvom prof. dr. sc. Marije Vuković Domanovac u sklopu Festivala znanosti 2021. godine. Za ostvareni doprinos Fakultetu 2021. godine, nagrađena je Dekanovom nagradom za znanstveno - istraživački rad (<https://www.bib.irb.hr/1155493>) također pod mentorstvom prof. dr. sc. Marije Vuković Domanovac. U tekućoj akademskoj godini (2021./2022.) sudjelovala je na XIV. Susretu mladih kemijskih inženjera te 3. ZORH Susretu znanstvenika, stručnih djelatnika i studenata o zaštiti okoliša u Republici Hrvatskoj s posterskim izlaganjem s posterskim izlaganjem pod mentorstvom prof. dr. sc. Marije Vuković Domanovac. Nadalje, sudjelovala je u razvijanju startup ideje kao pridruženi član tima u sklopu FER-ovog startup inkubatora (SPOCK) pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Steinberg. Bogato radno i stručno iskustvo stekla je od završetka prve godine diplomskog studija radom u analitičkom laboratoriju u Plivi na odjelu kontrole kvalitete farmaceutskih proizvoda.