



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ  
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Николић П. Сандра

***In vivo* и *in vitro* испитивања  
биотоксичности полистиренских микро-  
и наночестица**

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

Крагујевац, 2022



UNIVERZITET U KRAGUJEVCU  
FAKULTET MEDICINSKIH NAUKA

Nikolić P. Sandra

***In vivo* i *in vitro* ispitivanje biotoksičnosti  
polistirenskih mikro- i nanočestica**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Крагујевац, 2022



UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC  
Faculty of Medical Sciences

Nikolić P. Sandra

***In vivo* and *in vitro* biotoxicity studies of  
polystyrene micro- and nanoparticles**

Doctoral Dissertation

Крагујевац, 2022

<b>Аутор</b>
Име и презиме: Сандра Николић
Датум и место рођења: 14.04.1972. године, Крагујевац
Садашње запослење: виши лаборант
<b>Докторска дисертација</b>
Наслов: <i>In vivo</i> и <i>in vitro</i> испитивања биотоксичности полистиренских микро- и наночестица
Број страница:
Број слика: фигура 35; табела 11
Број библиографских података: 123
Установа и место где је рад израђен: Факултет медицинских наука Универзитет у Крагујевцу, Крагујевац
Научна област (УДК): Медицина
<b>Ментор:</b> проф. др Биљана Љујић, ванредни професор за ужу научну област Генетика, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
<b>Коментор:</b> доц. др Марина Газдић Јанковић, доцент за ужу научну област Генетика, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу
<b>Оцена и одбрана</b>
Датум пријаве теме: 13.11.2020.
Број одлуке и датум прихватања теме докторске/уметничке дисертације:
IV-03-279/17 од 14.04.2021.
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата:
<ol style="list-style-type: none"> <li>Проф. др Миодраг Стојковић, редовни професор за ужу научну област Генетика, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, председник;</li> <li>Доц. др Марина Милетић Ковачевић, доцент за ужу научну област Хистологија и ембриологија Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, члан;</li> <li>Проф. др Срђан Пешић, редовни професор за ужу научну област Фармакологија и токсикологија, Медицинског факултета Универзитета у Нишу, члан.</li> </ol>
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације:
<ol style="list-style-type: none"> <li>Проф. др Гвозден Росић, редовни професор за ужу научну област Физиологија, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, председник;</li> <li>Проф. др Оливера Милошевић Ђорђевић, редовни професор за ужу научну област Генетика, Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, члан;</li> <li>Проф. др Срђан Пешић, редовни професор за ужу научну област Фармакологија и токсикологија Факултета медицинских наука Универзитета у Нишу, члан.</li> </ol>
Датум одбране дисертације:

<b>Autor</b>
Ime i prezime: Nikolić Sandra
Datum i mesto rođenja: 14.04.1972. godine
Sadašnje zaposlenje: viši laborant
<b>Doktorska disertacija</b>
Naslov: <i>In vivo</i> i <i>in vitro</i> ispitivanje biotoksičnosti polistirenskih mikro- i nanočestica
Broj stranica:
Broj slika: figura 35; tabela 11
Broj bibliografskih podataka: 123
Ustanova i mesto gde je rad izrađen: Fakultet medicinskih nauka univerziteta u Kragujevcu, Kragujevac
Naučna oblast (UDK): Medicina
<b>Mentor:</b> Prof. dr Biljana Ljujić, vanredni profesor za užu naučnu oblast Genetika, Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu
<b>Komentor:</b> Doc. dr Marina Gazdić Janković, docent za užu naučnu oblast Genetika, Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu
<b>Ocena i obrana</b>
Datum prijave teme: 13.11.2020
Broj odluke i datum prihvatanja teme doktorske/umetničke disertacije: IV-03-279/17 од 14.04.2021.
Komisija za ocenu naučne zasnovanosti teme i ispunjenosti uslova kandidata:
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Prof. dr Miodrag Stojković, redovni profesor za užu naučnu oblast Genetika, Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, predsednik;</li> <li>2. Doc. dr Marina Miletić Kovačević, docent za užu naučnu oblast Histologija i embriologija, Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, član;</li> <li>3. Prof. dr Srđan Pešić, redovni profesor za užu naučnu oblast Farmakologija i Toksikologija, Medicinski fakultet Univerziteta u Nišu, član.</li> </ol>
Komisija za ocenu i odbranu doktorske/umetničke disertacije:
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Prof. dr Gvozden Rosić, redovni profesor za užu naučnu oblast Fiziologija, Fakulteta medicinskih nauka Univeziteta u Kragujevcu, predsednik;</li> <li>2. Prof. dr Olivera Milošević Đorđević, redovni profesor za užu naučnu oblast Genetika, Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Kragujevcu, član;</li> <li>3. Prof. dr Srđan Pešić, redovni profesor za užu naučnu oblast Farmakologija i toksikologija, Fakulteta medicinskih nauka Univerziteta u Nišu, član.</li> </ol>
Datum odbrane disertacije:

<b>Author</b>
Name and surname: Sandra Nikolić
Date and place of birth: 14.04.1972. Kragujevac
Current employment: Senior laboratory technician
<b>Doctoral Dissertation</b>
Title: <i>In vivo</i> and <i>in vitro</i> biotoxicity studies of polystyrene micro- and nanoparticles
No. of pages:
No. of images: 35; tables 11
No. of bibliographic data: 123
Institution and place of work: Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
Scientific area (UDK): Medicine
<b>Mentor:</b> Assoc. Prof. Biljana Ljujić, Associate Professor, Department of Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
<b>Co-mentor:</b> Assist. Prof. Marina Gazdić Janković, Assistant Professor, Department of Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac
<b>Grade and Dissertation Defense</b>
Topic Application Date: 13.11.2020.
Decision number and date of acceptance of the doctoral / artistic dissertation topic: IV-03-279/17 од 14.04.2021.
Commission for evaluation of the scientific merit of the topic and the eligibility of the candidate:
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Full Prof. Miodrag Stojković, Department of Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac</li> <li>2. Assis. Prof. Marina Miletić Kovačević, Department of Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac</li> <li>3. Full Prof. Srđan Pešić, Department of Pharmacology and toxicology, Faculty of Medical Sciences, University of Niš</li> </ol>
Commission for evaluation and defense of doctoral / artistic dissertation:
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Full Prof. Gvozden Rosić, Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac</li> <li>2. Full Prof. Olivera Milošević Đorđević, Department of Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac</li> <li>3. Full Prof. Srđan Pešić, Department of Pharmacology and toxicology, Faculty of Medical Sciences, University of Niš</li> </ol>
Date of Dissertation Defense:

*Неизмерну захвалност дугујем мојим менторкама проф.др Биљани Љујић и доц. др Марини Газдић Јанковић на несебичном залагању и помоћи у изради ове докторске дисертације, а пре свега на указаном поверењу и безусловној подршци, као и на ентузијазму у свим фазама израде без које ова дисертација не би била иста.*

*Велику захвалност дугујем проф.др Миодрагу Стојковићу на целокупном обликовању ове дисертације, помоћи у експерименталном раду и корисним саветима и свакако на иновативности теме која је приказана у овој дисертацији.*

*Захваљујем се Декану проф. др Владимиру Јаковљевићу који ми је омогућио да се моје стручно усавршавање настави кроз израду ове дисертације.*

*Захваљујем се проф.др Гвоздену Росићу, проф. др Оливери Милошевић Борђевић и доц. др Драгици Селаковић на стручној помоћи у изради и тумачењу експерименталних података.*

*Посебно се захваљујем проф. др Немањи Јовичићу и доц. др Марини Милетић Ковачевић на стручној помоћи и несебичној подршци у изради ове дисертације.*

*Захваљујем се вишем научном сараднику Марку Живановићу на помоћи у експерименталном раду и стручној помоћи током израде ове дисертације.*

*Захваљујем се др Сузани Живановић и др Милошу Папићу на пријатељској подршци и помоћи током рада.*

*Хвала мојој драгој деци Нађи, Миони и Вишњи на стрпљену, подршци и безусловној љубави.*

## САЖЕТАК

Микропластика и нанопластика значајно доприносе загађењу животне средине. Још увек није довољно познато какав је утицај МР/НР на функцију ћелија, као и на здравље животиња и људи. У овом истраживању је показано да након оралног уношења, флуоресцентно обележене полистиренске (енгл. *polystyrene*, PS) микрочестице (енгл. *microparticles*, МР) и наночестице (енгл. *nanoparticles*, NP) пролазе кроз дигестивни систем миша, акумулирају се и агрегирају у различитим ткивима и изазивају функционалне промене у ћелијама и органима. Коришћење кохлеарног експланта као новог *in vitro* модела, испитана је интеракција PS-MP/NP са ћелијама унутрашњег уха у коме су детектовани агрегати и хетероагрегати PS честица. PS-MP/NP су се акумулирале у интерстицијуму тестиса третираних животиња, око семиниферних тубула, што је узроковало статистички значајно смањење концентрације тестостерона у серуму. Спленоцити третираних мужјака су повећано секретовали IL-12p35 и IL-23, док су тестови цитотоксичности и генотоксичности указивали на смањену вијабилност ћелија и повећано оштећење ДНК у ћелијама слезине. Код мужјака је забележен анксиогени одговор након примене PS-MP/NP, док је у узорцима ткива хипокампуса третираних женки детектована повећана експресију *Bax* и *Nlrp3* гена, што указује на про-апоптоички и проинфламаторни утицај PS-MP/NP. Један од закључака ове дисертације је да ефекти PS-MP/NP зависе од пола организма који је изложен њиховом деловању, што отвара врата будућим истраживања у циљу спречавања штетних ефеката PS честица на здравље људи.

### Кључне речи

полистирен, микропластика, нанопластика, мишеви, акумулација, понашање



## **ABSTRACT**

Commercially manufactured or generated through environmental degradation, microplastics (MPs) and nanoplastics (NPs) considerably contribute to environmental pollution. There is a knowledge gap in how exposure to MPs/NPs changes cellular function and affects animal and human health. Here, we demonstrate that after oral uptake, fluorescent polystyrene (PS) nanoparticles pass through the mouse digestive system, accumulate and aggregate in different organs, and induce functional changes in cells and organs. Using cochlear explant as a novel in vitro system, we confirmed the consequences of PS-MP/NP interaction with inner ear cells by detecting aggregates and hetero-aggregates of PS particles in hair cells. The testes of treated males accumulated MPs/NPs in the interstitial compartment surrounding the seminiferous tubules, which was associated with a statistically significant decrease in testosterone levels. Male mice showed increased secretion of interleukins (IL-12p35 and IL-23) by splenocytes while cyto- and genotoxicity tests indicated impaired cell viability and increased DNA damage in spleen tissue. Males also showed a broad range of anxiogenic responses to PS nanoparticles while hippocampal samples from treated females showed an increased expression of Bax and Nlrp3 genes, indicating a pro-apoptotic/proinflammatory effect of PS treatment. Taken together, induced PS effects are also gender-dependent, and therefore, strongly motivate future research to mitigate the deleterious effects of nanosized plastic particles.

### **Keywords**

Polystyrene; microplastics; nanoplastics; mice; accumulation; behavior.

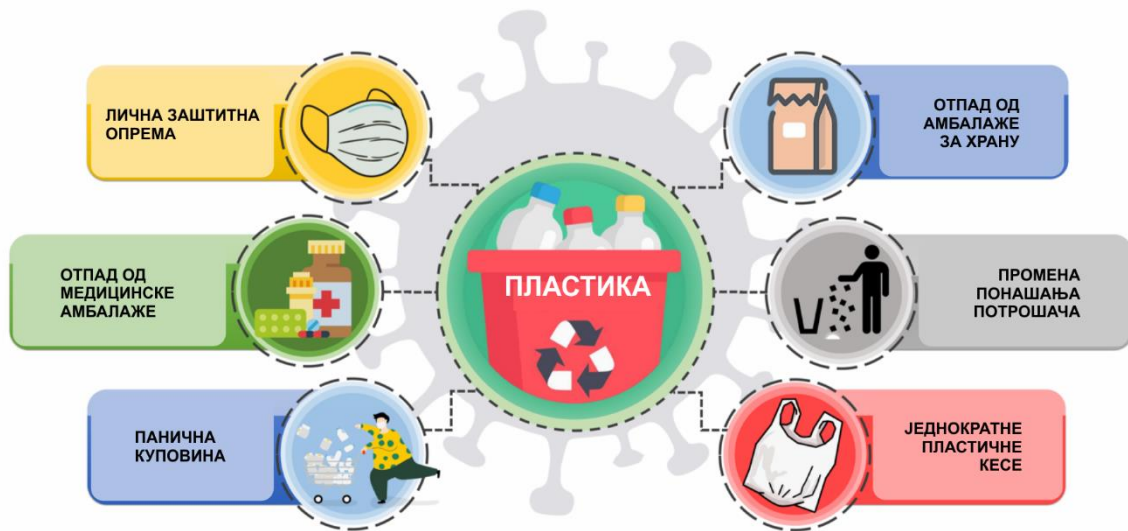
# САДРЖАЈ

<b>1. УВОД</b> .....	<b>1</b>
1.1. ХЕМИЈСКА СТРУКТУРА И БИОРАЗГРАДЊА ПОЛИСТИРЕНА.....	<b>1</b>
1.2. ИНТРАЦЕЛУЛАРНО УНОШЕЊЕ ПОЛИСТИРЕНСКИХ НАНОЧЕСТИЦА.....	<b>5</b>
1.3. ШТЕТНИ УТИЦАЈИ НАНОПЛАСТИКЕ НА ЗДРАВЉЕ ЉУДИ.....	<b>7</b>
<b>2. ЦИЉ РАДА</b> .....	<b>9</b>
2.1 ХИПОТЕЗЕ.....	<b>9</b>
<b>3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ</b> .....	<b>10</b>
3.1 НАНОЧЕСТИЦЕ, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ПОЛИСТИРЕНСКИХ МИКРО- И НАНОЧЕСТИЦА.....	<b>10</b>
3.1.1. СКЕНИРАЈУЋА ЕЛЕКТРОНСКА МИКРОСКОПИЈА.....	<b>10</b>
3.1.2. ЗЕТА ПОТЕНЦИЈАЛ.....	<b>10</b>
3.1.3. ТРАНСМИСИОНА ЕЛЕКТРОНСКА МИКРОСКОПИЈА.....	<b>10</b>
3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ.....	<b>11</b>
3.3. МЕРЕЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ТЕСТОСТЕРОНА.....	<b>12</b>
3.4. КОНФОКАЛНА МИКРОСКОПИЈА.....	<b>12</b>
3.4.1 ИЗОЛАЦИЈА, КУЛТИВАЦИЈА И КОНФОКАЛНА МИКРОСКОПИЈА МИШЈИХ КОХЛЕАРНИХ ЕКСПЛАНТА.....	<b>12</b>
3.5. ИЗОЛАЦИЈА МОНОНУКЛЕАРНИХ ЋЕЛИЈА ИЗ СЛЕЗИНЕ.....	<b>13</b>
3.6. ИСПИТИВАЊЕ ЦИТОТОКСИЧКОГ ЕФЕКТА ПОЛИСТИРЕНСКИХ ЧЕСТИЦА.....	<b>13</b>
3.6.1. МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид) тест.....	<b>15</b>
3.6.2. ЦИТОТОКСИЧНОСТ У РЕАЛНОМ ВРЕМЕНУ (RTCA).....	<b>15</b>
3.7. АНАЛИЗА АПОПТОТСКЕ СМРТИ ЋЕЛИЈА ПОМОЋУ <i>ANNEXIN</i> -a V.....	<b>16</b>
3.8. ТУНЕЛ МЕТОДА.....	<b>16</b>
3.9. ЈЕДНОЋЕЛИЈСКА ГЕЛ ЕЛЕКТРОФОРЕЗА (КОМЕТ ТЕСТ).....	<b>16</b>
3.10. ХЕМАТОКСИЛИН-ЕОЗИН БОЈЕЊЕ. ГИМЗА БОЈЕЊЕ.....	<b>17</b>
3.11. БИХЕВИОРАЛНА ТЕСТИРАЊА.....	<b>17</b>
3.11.1 ТЕСТ ОТВОРЕНОГ ПОЉА (ОП ТЕСТ).....	<b>17</b>
3.11.2 ТЕСТ УЗДИГНУТОГ КРСТАСТОГ ЛАВИРИНТА (УКЛ ТЕСТ).....	<b>17</b>
3.12. РЕЛАТИВНА ЕКСПРЕСИЈА ГЕНА.....	<b>18</b>
3.12.1. ИЗОЛАЦИЈА РНК.....	<b>18</b>
3.12.2. РЕВЕРЗНА ТРАНСКРИПЦИЈА РНК У КОМПЛЕМЕНТАРНУ ДНК (RT-PCR).....	<b>18</b>
3.12.3. КВАНТИТАТИВНА РЕАКЦИЈА ЛАНЧАНЕ ПОЛИМЕРИЗАЦИЈЕ У РЕАЛНОМ ВРЕМЕНУ.....	<b>18</b>
3.13. МЕТОДЕ ЗА ИСПИТИВАЊЕ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ПОЛИСТИРЕНСКИХ МИКРО- И НАНОЧЕСТИЦА <i>IN VITRO</i> .....	<b>19</b>
3.14. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА.....	<b>20</b>
<b>4. РЕЗУЛТАТИ</b> .....	<b>21</b>
4.1. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ПОЛИСТИРЕНСКИХ ЧЕСТИЦА.....	<b>21</b>
4.2. ПЕНЕТРАЦИЈА И АКУМУЛАЦИЈА ЧЕСТИЦА ПОЛИСТИРЕНА <i>IN VIVO</i> И <i>IN VITRO</i> .....	<b>23</b>
4.3. АНАЛИЗА ЦИТОКИНСКОГ ПРОФИЛА ИМУНСКИХ ЋЕЛИЈА ПРОТОЧНОМ ЦИТОМЕТРИЈОМ.....	<b>30</b>

4.4.	ЦИТОТОКСИЧКО ДЕЈСТВО ПОЛИСТИРЕНА НА ЋЕЛИЈЕ.....	31
4.5.	ЋЕЛИЈЕ ИЗЛОЖЕНЕ ПОЛИСТИРЕНУ ПОДЛЕЖУ АПОПТОЗИ.....	33
4.6.	ГЕНОТОКСИЧНИ ЕФЕКАТ ЧЕСТИЦА ПОЛИСТИРЕНА.....	37
4.7.	ЧЕСТИЦЕ ПОЛИСТИРЕНА МОДУЛИРАЈУ НИВО АНКСИОЗНОСТИ КОД МИШЕВА.....	39
4.8.	АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА.....	43
4.9.	ГЕНОТОКСИЧНИ ЕФЕКАТ PS-MP/MP НА ХУМАНИМ ЛИМФОЦИТИМА, MSC-PDL И MRC-5 ЋЕЛИЈСКИМ ЛИНИЈАМА.....	44
5.	ДИСКУСИЈА.....	47
6.	ЗАКЉУЧАК.....	56
7.	ЛИТЕРАТУРА.....	57

## 1. УВОД

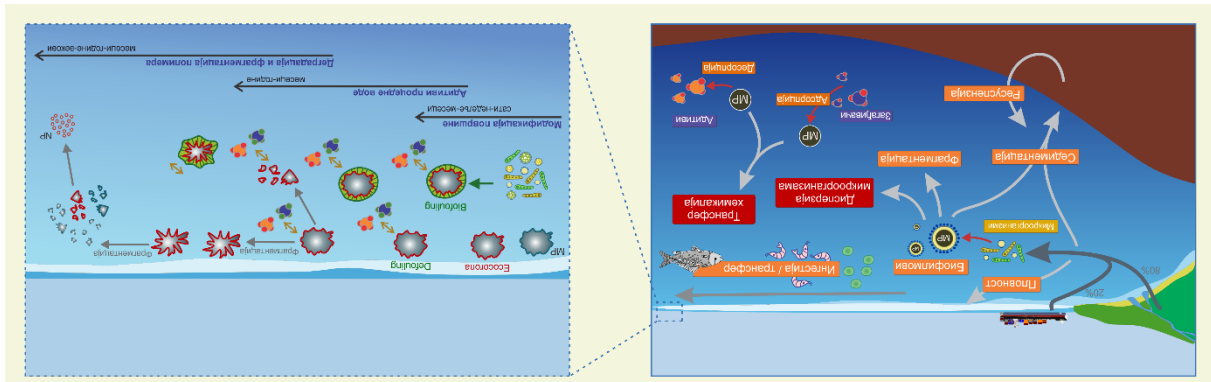
Значајно повећање количине отпадне пластике која доприноси загађењу животне средине је све већи глобални проблем и изазива забринутост за здравље људи (1). Ако се актуелни тренд производње и елиминације отпада настави, око 12 000 МТ пластичног отпада ће бити на депонијама или у природи до 2050. године (2) (**Фигура 1**). Еколошки утицај индустријски произведене (примарна пластика) или пластике микрометарске (енгл. *microparticles*, MP; опсег величине 0,001–5 mm) и нанометарске величине (енгл. *nanoparticles*, NP; пречник <100 nm) настале деградацијом под утицајем биолошких, физичких или хемијских фактора (секундарна пластика) последњих година расте (3, 4, 5).



**Фигура 1.** Актуелни тренд производње и елиминације пластике.

Једна од најчешће коришћених врста пластике са укупном светском производњом од 15,61 МТ у 2019. години је полистирен (енгл. *polystyrene*, PS), синтетички полимер стирена (2, 6). Многе студије су показале да PS може имати значајан негативан утицај на слатководни екосистем. Инфламација црева, оштећење јетре и неуротоксичност код морских организама узроковани су агрегацијом PS-MP/NP у ткивима животиња и нарушавањем равнотеже антиоксидативног система (7,8,9). Иако су гастроинтестинални тракт, шкрге и мозак главно место акумулације PS-MP/NP, величина честица значајно утиче на акумулацију и биодистрибуцију честица у целом телу као и на биокинетику у ткивима водених животиња (10). Штавише, честице пластике из водене средине могу доћи до копнених животиња кроз ланац исхране и имати негативан утицај на опстанак ових организама (11) (**Фигура 2**). Тренутна истраживања биотоксичности PS на копненим сисарима су релативно ограничена и углавном су фокусирана на оштећења дигестивног система (12). Орални унос PS-MP/NP мења састав цревне микрофлоре

изазивајући пероксидацију липида, метаболичке поремећаје код мишева (12,13) и скок системских биомаркера неуротоксичности (13).

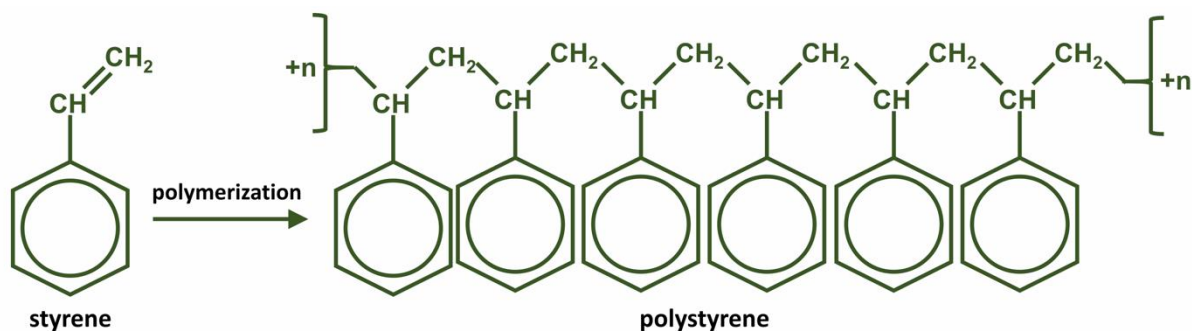


**Фигура 2.** Загађење микро- и нанопластиком (кориговано према: *Front Mar Sci* (2018);5:22p).

Међутим, количина уношења путем хране, степен акумулације и транслокације у органе, могући начини транспорта у ћелије и евентуално изазивање болести још увек нису испитани. Зато је циљ ове студије био да се испита пенетрација, дистрибуција и акумулација *per os* примењених флуоресцентно обележених PS-MP/NP у органима миша, као и у *in vitro* третираним ћелијама и 3D културама неонаталних кохлеарних експаната. Ова дисертација пружа нова знања о биолошким последицама директног излагања организма вишег трофичког нивоа PS-MP/NP, и тиме омогућава боље разумевање утицаја PS-MP/NP на здравље људи.

### 1.1. ХЕМИЈСКА СТРУКТУРА И БИОРАЗГРАДЊА ПОЛИСТИРЕНА

Пластика обухвата групу једињења велике молекулске масе изграђених од полимеризованих мономера уз додатак пластификатора, стабилизатора, пигмената и других адитива (6). Најчешће коришћени синтетички органски полимери су полистирен, полиетилен, терефталат, полипропилен и поливинил хлорид (14). Међу њима, PS је пластика са најширом употребом. PS настаје као резултат полимеризације стирена (Фигура 3), док се стирен добија каталитичком дехидрогенизацијом етилбензена (6) Осим тога, PS се лако хемијски модификује и користи за синтетисање честица различитих величина (6, 15).



**Фигура 3. Хемијска структура полистирена.**

Пошто је површина PS хидрофобна, најчешће се модификују процесом оксидацијом (16). Осим што се њоме лако манипулише, PS је термопластичан полимер са великом издржљивошћу који се лако се боји (17), што овај материјал чини погодним за коришћење за израду лабораторијског посуђа и прибора за култивацију ћелија (6). Због свега наведеног, PS има широку употребу у медицини пре свега за израду медицинских уређаја, петријевих посуда, пипета, посуда за лекове и медијуме за раст ћелија (Табела 1).

**Табела 1. Употреба полистирена у свакодневном животу**

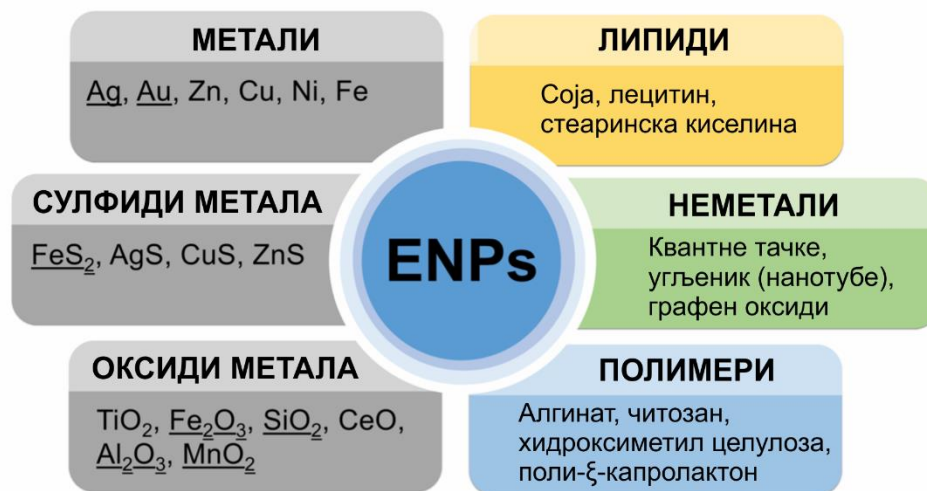
У апаратима	Фрижидери, клима уређаји, машине за прање веша, микроталасне пећнице, усисивачи, блендери
У електроници	Делови за телевизоре, телекомуникациони уређаји, рачунари и друга ИТ опрема
У изолацији	Зидови зграда и кровови, фрижидери и замрзивачи, индустријске хладњаче
У паковању	CD и DVD кутије, амбалажа за храну, картони за јаја, тацне за једнократну употребу, тањери и шоље
У медицини	Посуде за културу ћелија и ткива, епрувете, петријеве посуде, пипете, у дијагностичким компонентама, амбалажа за лекове
У медицини	Кауexalate® (доступан у Америци)

Укупна светска производња полистирена у 2016. била је 14.7 МТ, а Европа и Северна Америка су после Кине, највећи произвођачи полистирена (16,3% и 17%) (<https://www.plasticsinsight.com/resin-intelligence/resin-prices/polystyrene/>).

Осим тога, PS се користи за производњу стиропора, материјала који се широко примењује у производњи тањира, тацни и шоља за једнократну употребу. Такође се употребљава за складиштење и паковање хране и прехранбених производа, као и за производњу играчака, канцеларијског материјала итд. (6,17). Као резултат широке распрострањености и масовне употребе, PS је водећи загађивач животне средине међу пластичним материјалима (18). Изненађујуће, PS се може наћи као натријум-PS-сулфонат или *Kayexalate*<sup>®</sup> (генерички *Kalexate* и *Kionex*), лек који се преписује за лечење хиперкалемије, а користи се и за лечење педијатријских пацијената и дојиља. Нажалост, не постоје студије које се баве токсичним, канцерогеним и мутагенним ефектима овог лека, нити евентуалном смањењу плодности узокване коришћењем *Kayexalate*<sup>®</sup>.

Већина комерцијалне пластике, укључујући PS, није биоразградива. Међутим, стирен, кумен и етилбензол могу се открити у ваздуху. Америчка агенција за заштиту животне средине одредила је вредност од 300 ppm (1000 mg/m<sup>3</sup>) стирена као највећу дозвољену у случају хроничне изложености (18). Честице PS пронађене су чак и у атмосфери планинских региона удаљених од великих градова (19). Деградација PS у природи је могућа, али само у одређеном степену. Излагање високој температури од преко 330°C доводи до потпуног растварања PS пластике, при чему је мономер стирен главни продукт разградње. Међутим, у животној средини, пластични предмети се не могу растворити, већ се могу разградити на мање комаде комбинацијом хемијских и физичких процеса укључујући фотодеградацију, оксидацију, хидролитичку деградацију и механичку дезинтеграцију. Фотодеградација ултраљубичастим зрачењем узрокује раскидање хемијских веза у синтетичким полимерима, што за последицу има смањење молекулске тежине полимера и смањење његове механичке чврстоће, а то га чини подложним ломљењу. Осим тога, током времена, пластика се фрагментише на мање комаде дејством спољашњих механичких сила. Добијени комади пластике представљају веома хетерогену колекцију која варира по величини, облику и густини, као и по хемијском саставу специфичног материјала (20.21).

Комерцијално произведена (примарна пластика) или пластика добијена након разградње (секундарна) у природи се проналази у виду макрочестица (енгл. *microplastics*, MP) и наночестица (енгл. *nanoplastics*, NP) (22). Према Извештају независног удружења стручњака Европске Уније о „Ризицима по животну средину и здравље од загађења микропластиком“ од 06/2019, MP се дефинише као чврсте честице које садрже синтетички полимер мањи од 5 mm у својој најдужој димензији, док NP имају најдужу димензију до 100 nm. Због своје мале величине и ниске деградабилности, MP могу доспети у атмосферски ваздух, пореметити ланац исхране и имати штетне последице по животну средину. NP се одликују великим односом површине и запремине, што има значајан утицај на њихову реактивност (22). На честице се могу лако физички или хемијски агрегирати бројни елементи из животне средине, као што су органски загађивачи и тешки метали, али и различити микроби и живи организми. Ови процеси физичких и хемијских промена NP могу се јавити природно или добити вештачки индустријском синтезом. Ове врсте индустријски произведених NP називају се пројектоване наночестице (енгл. *engineered nanoparticles*, ENP) (Фигура 4).



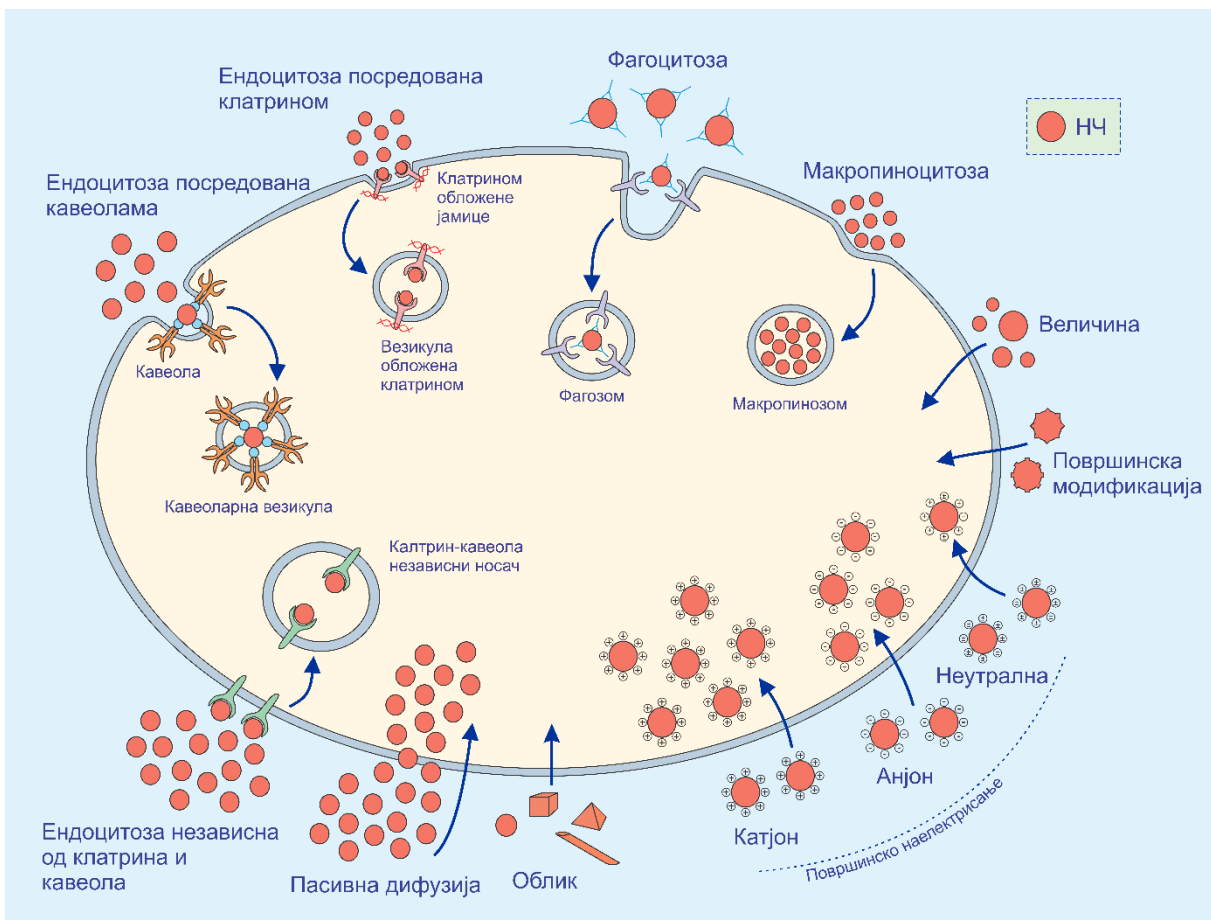
Фигура 4. Индустијски произведене нано партикуле.

## 1.2. ИНТРАЦЕЛУЛАРНО УНОШЕЊЕ ПОЛИСТИРЕНСКИХ НАНОЧЕСТИЦА

Улазак PS-MP/NP у ћелију углавном зависи од интеракције честица са биомакромолекулима као и од њиховог пречника, хемијске структуре и поларитета. Везивање протеина из биолошких течности на површину наночестица доводи до формирања „протеинског омотача“ око честице који директно утиче на цитотоксичност, телесну дистрибуцију и ендоцитозу у специфичне ћелије (23). Тренутно не постоје подаци који потврђују присуство честица пластике у људском телу. Међутим, пластика нанометарске величине се може интегрисати у ланац исхране животиња, али и ланац исхране људи (24). Недавне студије су показале да различите врсте наночестица могу да прођу мукозну баријеру и уђу у циркулацију, што доводи до директног оштећења ћелија и штетних системских ефеката (22). У условима *in vitro*, нано-пластика улази у ћелије путем различитих механизма (15). NP се брзо интернализују путем ендоцитозе посредоване клатрином и кавеолама, фагоцитозе, ендоцитозе независне од клатрина и кавеола, макропиноцитозе (25), а њихова акумулација у интрацелуларним везикулама резултира стварањем високих нивоа слободних радикала (*eng.reactive oxygen species-ROS*). ROS се обично означава као главни узрок потенцијалне токсичности PS-MP/NP који утиче на ћелијску мембрану и узрокује ћелијски стрес (26), дестабилизацију лизозома, апоптозу (27) и аутофагију зависну од mTOR (енгл. *mechanistic target of rapamycin*). Аутофагија је интраћелијски механизам кључан за уклањање и рециклирање оштећених и/или нефункционалних ћелијских компоненти. Непотребан садржај се изолује у цитосолне везикуле назване аутофагозоми, а затим се испоручује у лизозом (28). Рециклирање органела, ћелијских мембрана и протеина је важан процес за



регулацију ћелијске хомеостазе, као и за ремоделирање ткива током ембриогенезе. Абнормална аутофагија доприноси настанку различитих поремећаја, као што су тумори, неуродегенерација, неадекватан одговор ћелије на стресне стимулусе из околине (29). Тако је показано да присуство NP у хуманим ћелијама бубрега (30), допаминергичким неуронима (31) и кератиноцитима (32) узрокује стварање ROS што је повезано са прекомерном смрћу ћелија апоптозом и аутофагијом. Дакле, ако је уклањање оштећених ћелијских компоненти, посредством убиквитин-протеазомног система (енгл. *ubiquitin-proteasome system*, UPS) и/или пута аутофагије/лизозома, поремећено, главни услов за очување ћелијске хомеостазе, последично недостаје (28) (**Фигура 5**). Ипак, потребна су даља истраживања јер су путеви преноса, акумулације и интеракције PS-MP/NP са околином, као и са живим организмима, и даље недовољно јасни.

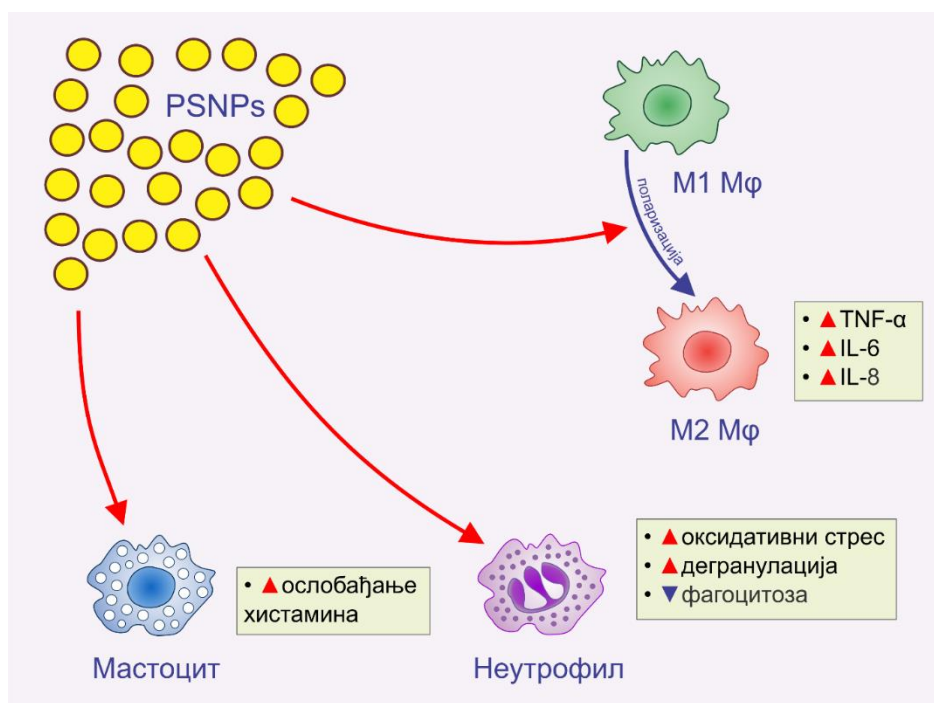


**Фигура 5. Интрацелуларно уношење наночестица.**

### 1.3. ШТЕТНИ УТИЦАЈИ НАНОПЛАСТИКЕ НА ЗДРАВЉЕ ЉУДИ

Повећана производња пластике и повећано загађење хране, воде и ваздуха као и контакт са NP за последицу могу имати поремећај у ембрионалном развоју, настанак генетских и имунолошких болести код људи путем механизма који још нису потпуно познати. Улазак PS-MP/NP у живе организме обично се дешава преко респираторног тракта, дигестивног система или преко коже. Због хидрофобне природе пластичних полимера, дифузија нанопластике кроз неоштећену кожу је веома ниска. Ипак, додатни путеви уласка PS-MP/NP кроз кожу су фоликули длаке, апокрини канали и абразије на кожи (33,34).

Дакле, проучавање интеракције људских ћелија са PS-MP/NP може показати релевантност података добијених на животињским моделима и бити рани показатељ утицаја PS на људски организам. *Priehl* и сарадници. (35), су показали да хумани моноцити брзо фагоцитишу PS-NP дијаметра 20nm, а да ингестиране честице брзо испољавају значајну цитотоксичност. Такође је показано да ове PS-NP стимулишу секрецију IL-6 и IL-8 од стране имунских ћелија, изазивају оксидативни стрес и изражену продукцију ROS у моноцитима (35). Полипропиленске MP такође значајно стимулишу синтезу проинфламаторних медијатора IL-6 и TNF- $\alpha$  у леукоцитима периферне крви и активирају мастоците да луче хистамин (36) (**Фигура 6**). Дакле, пластика може покренути имунски одговор промовисањем ћелијског имунитета, међутим потенцијални дугорочни ефекти на ћелијску и ткивну хомеостазу нису познати. Штавише, кључно је превазићи јаз између концентрација релевантних за животну средину и нивоа PS-MP/NP откривених у живим системима (38).



Фигура 6. Имуномодулаторни ефекти PS-MP/NP.

Мали број студија се бави негативним утицајем загађења пластиком на рани ембрионални развој и епигенетику код људи. Недавно је развијена нова платформа за истраживање, која се бави питањем да ли PS-MP/NP могу да промене експресију гена и утичу на биолошка својства преимплатационих људских ембриона и хуманих индукованих плурипотентних матичних ћелија (енгл. *human induced pluripotent stem cells*, hiPSC) (17). Гени одговорни за детерминацију лево-десно осовине, *LEFTY1* и *LEFTY2*, који кодирају чланове TGF- $\beta$  (енгл. *transforming growth factor-beta*) суперфамилије протеина, били су инхибирани, док је неколико гена укључених у развој визуелног система било активирано у оба узорка ћелија (17). Показано је да третман PS-MP/NP значајно нарушава структуру екстрацелуларног матрикса и изазива малформације атриовентрикуларних срчаних залистака. Применом *HiPathia* програма дошло се до предикције да PS-MP/NP повећавају ризик од исхемијске болести срца утицајем на експресију гена за аполиппротеин C3 (енгл. *apolipoprotein C-3*, *APOC3*) (12). Добро је познато да дефекти гена имају кључну улогу у настанку и прогресији неуролошких поремећаја. Током последњих деценија, у бројним генетским студијама испитана је молекуларна основа и патофизиологија неуродегенеративних болести укључујући аутизам, сензонеурални губитак слуха, макуларну дегенерацију, прогресивне облике деменције, примарни паркинсонизам, Хантингтонову хореју итд. Не треба занемарити, да су *Tanzi* и сарадници (38) доказали да је удисање ваздуха загађеног финим честицама фактор ризика за неуродегенеративне поремећаје и да се учесталост болести фетуса такође повећава услед изложености мајке загађивачима из животне средине. Откривање и дефинисање ових механизма је од велике важности, јер би повећање наших сазнања фундаменталне биологије која је у основи ових процеса допринело развоју нових стратегија за спречавање и лечење људских болести повезаних са загађењем.

Деценијама смо сведоци наглог пораста производње пластике у свету, што је имало велике последице на живе организме. Стога би будуће студије требало да се фокусирају на различите врсте пластичних материјала, њихове концентрације и ефекте хроничне изложености како би се за проценио ризик по животну средину и здравље људи. Сазнања добијена кроз те студије могла би да подрже активне мере међународних организација које се боре за смањење производње пластике, контролу њене деградације у животној средини и заштиту здравља живих организама.

У будућности би требало развити стратегију у којој би наука играла важну улогу у креирању политике производње и употребе пластике, као и успостављању нових правила о спречавању загађења пластиком и могућности њеног рециклирања. Предност овог приступа био би значајан за научнике, лекаре, екологе, правнике и лаике: омогућио би боље разумевање утицаја пластике на здравље; иновативни приступи у процени ризика по здравље људи; нове законе и прописе у заштити животне средине.

## 2. ЦИЉ РАДА

Основни циљ овог истраживања је да се испита дејство полистиренских микро- и нанопартикула на ћелије *in vitro*, као и њихов утицај на различите органске системе *in vivo* применом мишјег модела.

У складу са основним циљем постављени су следећи експериментални задаци:

1. испитати цитотоксично дејство полистиренских микро- и наночестица *in vitro*
2. испитати генотоксично дејство полистиренских микро- и наночестица *in vitro*
3. патохистолошком анализом испитати пенетрацију, дистрибуцију и акумулацију *per os* унетих полистиренских микро- и наночестица у ткивима миша
4. испитати утицај полистиренских микро- и наночестица унетих *per os* на резултате бихевиоралних тестова мишева.

### 2.1. ХИПОТЕЗЕ

1. Полистиренске честице имају цитотоксични ефекат.
2. Полистиренске честице оштећују ДНК.
2. Полистиренске честице имају способност продирања и акумулације у ткивима миша.
3. Полистиренске честице утичу на настанак промена у понашању експерименталних животиња

### 3. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

#### 3.1. НАНОЧЕСТИЦЕ, КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ПОЛИСТИРЕНСКИХ МИКРО- И НАНОЧЕСТИЦА

У истраживању су коришћене честице полистирена величине 40nm (кат. број F8793, *Invitrogen*) и 200 nm (кат. број F8811, *Invitrogen, Loughborough, UK*). Све суспензије честица су пре примене у експериментима третиране у ултразвучном купатилу (15 min на 42 W/L).

##### 3.1.1. СКЕНИРАЈУЋА ЕЛЕКТРОНСКА МИКРОСКОПИЈА

Применом скенирајуће електронске микроскопије (енгл. *Scanning electron microscopy, SEM*) испитиван је изглед, облик и величина, као и просечни дијаметар (+/- nm) честица полистирена које су коришћене у истраживању. Електронски микроскоп (*Tescan MIRA 3 XMU, Tescan Inc., Cranberry PA, USA*) је коришћен за карактеризацију морфологије и величине наночестица како је претходно описано (39). Пре испитивања, сви узорци су премазани златом помоћу *POLARON SC502* премаза како би се избегла електростатичка акумулација наелектрисања.

##### 3.1.2. ЗЕТА ПОТЕНЦИЈАЛ

Зета потенцијал ( $\zeta$ ) раствора PS-MP/NP одређен је помоћу *Zetasizer Nano Series, Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK)* на  $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ . PS-MP/NP су растворене у PBS-у (енгл. *Phosphate Buffered Salline*) и медијуму (енгл. *Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM*) и стављени у капиларну ћелију. Софтвер *Malvern Zetasizer* коришћен је за анализу добијених података. Зета потенцијал је мерен три пута, а добијени резултати су представљени као средња вредност.

##### 3.1.3. ТРАНСМИСИОНА ЕЛЕКТРОНСКА МИКРОСКОПИЈА

PS-MP су идентификоване применом трансмисионе електронске микроскопије (енгл. *transmission electron microscopy, TEM*) према протоколу. Узорци полистирена су стављени на решетке за TEM обележене угљеником и прегледане трансмисионим електронским микроскопом CM12 (*Philips/FEI, Холандија*) на 80 kV. Дигиталне слике су добијене коришћењем *iTEM MegaView CCD*.

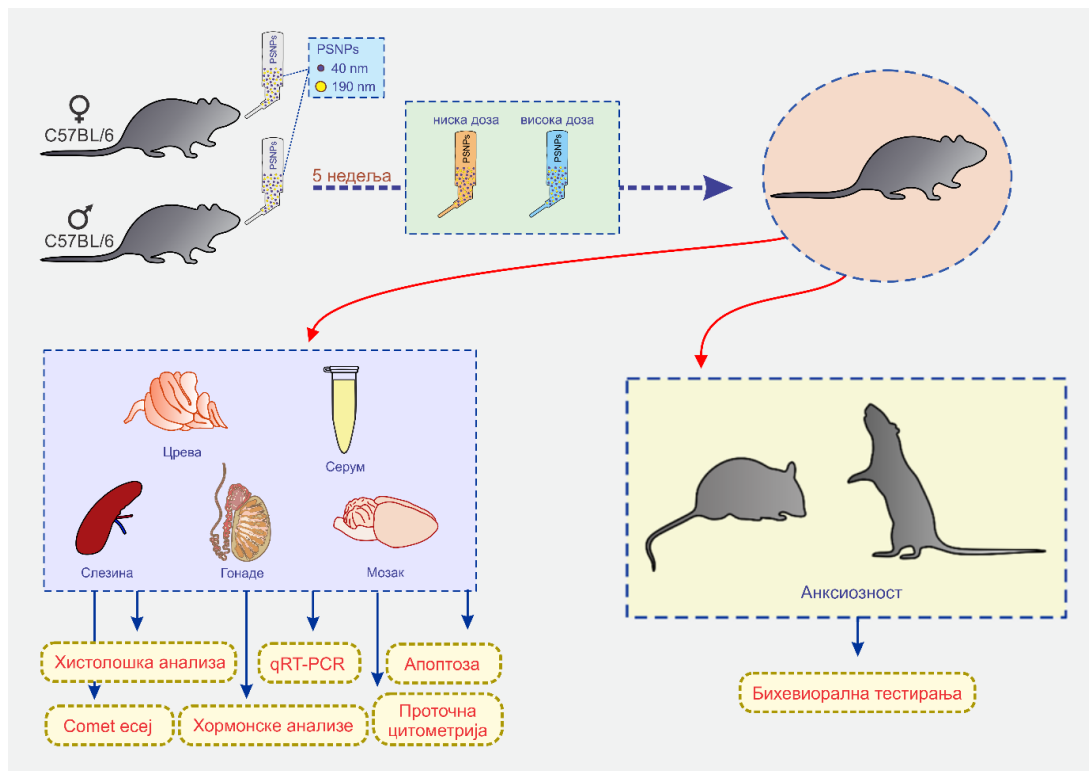
Такође, комерцијалне мезенхималне матичне ћелије (енгл. *bone marrow mesenchymal stem cells, BM-MSCs*), изоловане из коштане сржи C57BL/6 мишева (кат. број S1502-100, *Gibco/Invitrogen*) третиране су у току 24 сата PS-MP величине 200 nm, а након третмана припремљене за анализу TEM-ом.  $1,5 \times 10^6$  ћелија фиксирано је 2,5% глутаралдехидом у 0,1M PBS-у (pH 7,2), а затим су фиксиране применом OsO<sub>4</sub> у истом пуферу и упаковане у епоксидну смолу (*Agar Scientific, UK*). Средње-танки и ултра-танки пресеци су добијени коришћењем *Leica UC6* ултрамикротомом (*LeicaMicrosystems, Немачка*). Средње-танки пресеци су постављени на стаклене плочице, обојени са толуидин плавим и прегледани помоћу *Leica DMLB* светлосног микроскопа (*LeicaMicrosystems, Немачка*) и анализирани применом софтвера *Leica LAS AS V4.11*. Ултра-танки пресеци постављени су на бакарне решетке и прегледани трансмисионим електронским

микроскопом CM12 (*Philips/FEI*, Холандија) са дигиталном камером SIS MegaView III (*Olimpus Soft Imaging Solutions*, Немачка).

### 3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛНЕ ЖИВОТИЊЕ

Сви експерименти спроведени на животињама одобрени су од стране Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу, број одобрења 01-6961. Експерименталне процедуре су у складу са Директивом Савета Европских заједница (86/609/EEZ) и начелима добре лабораторијске праксе.

Транслокација, дистрибуција и ефекти флуоресцентно обележених полистиренских честица две различите величине и различите дозе проучавани су на мужјацима и женкама C57BL/6 мишева старих 8-10 недеља, након оралног узимања. Све експерименталне животиње су одгајане у виваријуму Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу. Све животиње су имале негу и сви експерименти су спроведени у складу са смерницама Етичке комисије за заштиту добробити огледних животиња Факултета медицинских наука. Током трајања експеримента животиње су имале слободан приступ храни и води. Експериментални мишеви третирани су *per os* флуоресцентно обележеним PS-MP/NP величине 40nm и 200 nm, раствореним у води у две концентрације: ниска доза (0,01 mg / по мишу / дневно или  $4.42 \times 10^9$  40 nm +  $2.16 \times 10^7$  200 nm) и висока доза (0,1 mg / по мишу / дневно  $4.42 \times 10^{10}$  40 nm +  $2.16 \times 10^8$  200 nm) једном дневно током 5 недеља (40). Пре сваке примене раствори су третирани у ултразвучном купатилу (*WIN-TEC-UW01-037 V2.0HISHINE*). Контролни мишеви су добили воду без PS-MP/NP. После пет недеља третман је прекинут, а мишеви су жртвовани. Узорци крви, јетре, црева, срца, бубрега, плућа, мозга, слезине, тестиса и јајника су прикупљени за даље анализе (Фигура 7).



Фигура 7. Дизајн експеримента на животињама.

### 3.3. МЕРЕЊЕ КОНЦЕНТРАЦИЈЕ ТЕСТОСТЕРОНА

Након пет недеља, животиње су жртвоване, крв је изолована из абдоминалне аорте и центрифугирана 10 минута на 300 g. Узорци серума су коришћени за мерење концентрације укупног тестостерона помоћу *Elecsis 2010* анализатора, применом стандардних комерцијалних сетова (*Elecsis Testosterone II, Roche Diagnostics*, Немачка). Серумски дихидро-тестостерон је мерен сензитивним китом (*ALPCO Diagnostics, Salem, SAD*) применом ELISA методе. Осетљивост теста за тестостероне је била 0.025 ng/ml, а за дихидро-тестостерон 6,0 pg/ml.

### 3.4. КОНФОКАЛНА МИКРОСКОПИЈА

Јетра, црево, срце, бубрези, плућа, мозак, слезина, тестис и јајник контролних и животиња третираних PS-MP/NP, изоловани су и фиксирани у 4% параформалдехиду 12 h на 4°C. За криопрезервацију органи су третираны сахарозом (10–30% у 0,1M PBS, Ph 7,4) и чувани на -80 °C до пресека на криотому. Пресеци (дебљине 15 mm) су постављени на стаклене плочице, сушени 2 сата на собној температури пре испирања у PBS у трајању од 5 минута. Конфокалне микроскопске слике су добијене помоћу *TLS Leica SP5 II* микроскопа (*Leica Microsystems GmbH*, Немачка). Флуоресцентно обележене полистиренске честице од 40 nm (црвене) и 200 nm (зелене) детектоване су на таласној дужини *Argon 488 nm* и *HeNe 543 nm*. Обрада слике извршена је помоћу *LAS AF* софтвера.

#### 3.4.1 ИЗОЛАЦИЈА, КУЛТИВАЦИЈА И КОНФОКАЛНА МИКРОСКОПИЈА МИШЈИХ КОХЛЕАРНИХ ЕКСПЛАНТА

Припрема, култура и бојење неонаталних мишијих кохлеарних експлантата урађени су како је раније описано (41, 42). Тачније, четвртог постнаталног дана СВА/CaJ мишеви (*Jackson Laboratori, ME, SAD*) су жртвовани. Темпорална кост је одвојена од лобање и уклоњена је коштана ушна капсула. Спинални лигамент је пажљиво скинут. Средњи део је пажљиво сециран на апикални и више базални део, чувајући Кортијев орган, укључујући сензорне ћелије и ганглијске неуроне. Након уклањања *Reissner*-ове мембране, експлантациони материјали су постављени на стакалца у медијуму за културу ћелија са додатком 1% ампицилина и 1% N2 суплемента и култивисани на 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. После најмање 12 сати у култури и потврђивања успешног везивања за покровно стакло, културе су третиране ниском концентрацијом (0,01 mg/ml) 200 nm и 40 nm PS-MP/NP. Након тога, експлантациони материјали су испрани PBS-ом, фиксирани са 4% PFA (*Electron Microscopi Sciences, PA, SAD*) 20 минута, поново испрани у PBS-у и блокирани са 5% NHS (*Sigma-Aldrich, MO, SAD*) и 1% TX-100 (*Integra Chemical, VA, USA*) у трајању од 30 минута на собној температури. Сензорне слушне ћелије (ћелије длачице) су обележене зечијим анти-миозином 7A антителима у разблажењу 1:500 (кат. бр. 25-6790, *Proteus Biosciences, CA, USA*) и инкубирани преко ноћи на собној температури. Узорци су затим испрани и инкубирани са *Alexa Fluor 647* анти-зечијим антителима (1:500, *Thermo Fisher Scientific, MA, SAD*). Једра су обележена помоћу *Hoechst 33342* боје (*Invitrogen, Carlsbad, Kalifornija, SAD*). Експлантациони материјали су испрани PBS-ом и покривени са *VectaShield*-ом (*Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornija, SAD*), а затим анализирано *Leica SP8* конфокалним микроскопом (*Leica Biosystems, IL, SAD*).

### 3.5. ИЗОЛАЦИЈА МОНОНУКЛЕАРНИХ ЋЕЛИЈА ИЗ СЛЕЗИНЕ

Изолација мононуклеарних ћелија из слезине мишева изведена је како је претходно описано (43). Мишеви су жртвовани, а једноћелијска суспензија из слезине је добијена механичком дисперзијом кроз ћелијско сито (*BD Pharmingen, San Diego, US*) у DMEM-у са додатком 5 mM L-глутамин, 0,1 mM неесенцијалних аминокиселина, 1% пеницилин-стрептомицин, 10% феталног говеђег серума и 4,5 g/l D-глукозе. Еритроцити су уклоњени раствором за лизирање (*BD Pharmingen*). После три испирања, ћелије су ресуспендоване у комплетном медијуму и коришћене за даље анализе, укључујући проточну цитометрију, МТТ и RTCA тест.

#### 3.5.1. АНАЛИЗА ФЕНОТИПА ИМУНСКИХ ЋЕЛИЈА СЛЕЗИНЕ ПРОТОЧНОМ ЦИТОМЕТРИЈОМ

Након изолације, приликом бројања ћелија, одређивана је вијабилност ћелија помоћу *trypan-blue*-а под светлосним микроскопом. У свим експериментима вијабилност ћелија је износила 90% до 95%. На  $1 \times 10^6$  ћелија изолованих из слезине ресуспендованих у 50  $\mu$ l пуфера за бојење (енгл. *Staining Buffer*; *BD*) додата је одговарајућа количина примарно коњугованог моноклонског антитела специфичног за CD3 (*BD Pharmingen*). Ћелије изоловане из слезине инкубиране су и са одговарајућим изотипским контролама. Ћелије су инкубиране 30 минута у мраку на температури +4°C. По истеку инкубације, ћелије су опране додавањем 2ml хладног пуфера за бојење. Након тога, ћелије су центрифугиране 5 минута на 250g. После центрифугирања одливан је супрнатант и талог ћелија ресуспендован у 250  $\mu$ l пуфера за бојење. Непосредно након процедуре бојења, експресија маркера на ћелијама је анализирана на проточном цитометру.

Интрацелуларно бојење цитокина је изведено по *BD Cytofix/CytoPerm*™ методи. У овом истраживању ћелије су стимулисане форбол 12-миристат 13-ацетатом (50 ng/mL, енгл. *Phorbol 12-myristate 13-acetate*; *Sigma Aldrich*) и јономицином (500 ng/mL, енгл. *Ionomycin*; *Sigma Aldrich*). Након инкубације додат је *GolgiStop*™ (0,7  $\mu$ l/ml, *BD Pharmingen*). Ћелијски талог је ресуспендован у 250  $\mu$ l *Cytofix/CytoPerm*™ раствора (*BD Pharmingen*) и инкубиран 20 минута на температури +4°C. Затим су ћелије опране са 1 ml *Perm/Wash*™ пуфера (*BD Pharmingen*) и центрифугиране (250g, 5 минута). После одливања супрнатанта додата су антитела за интрацелуларно бојење цитокина и инкубирана 30 минута на +4°C. Ћелијски талог је ресуспендован у 50  $\mu$ l *Perm/Wash*™ пуфера. Додата су примарно коњугована моноклонска антитела специфична за цитокине: анти- IL-12, анти- IL-10, анти-IL-13, анти-IL-17 и анти-IL-23. Проточна цитометрија је спроведена на проточном цитометру *FACSCalibur* (*BD Biosciences, San Jose, CA, USA*). Подаци су анализирани помоћу софтвера *Floving software*.

### 3.6. ИСПИТИВАЊЕ ЦИТОТОКСИЧКОГ ЕФЕКТА ПОЛИСТИРЕНСКИХ ЧЕСТИЦА

У циљу испитивања потенцијалног цитотоксичког дејства полистиренске пластике дијаметра 40 nm и 200 nm на ћелијама сисара, у даљем току истраживања спроведено је неколико експерименталних метода (**Фигура 8**).

МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид) тест - колориметријска метода која се користи за одређивање броја живих ћелија у тестовима пролиферације или цитотоксичности. У овој студији МТТ тест је осмишљен за процену

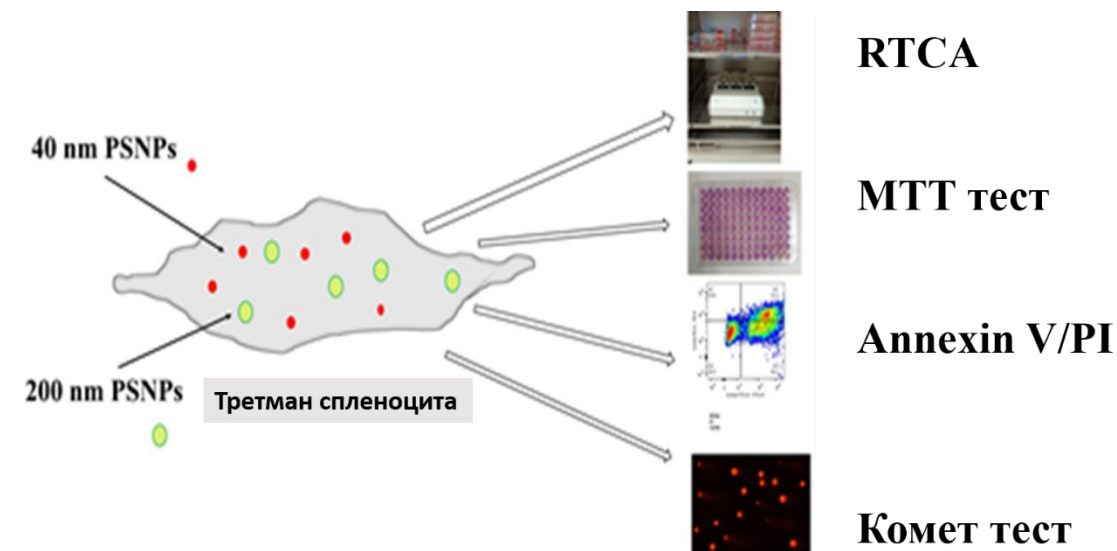


краткотрајне цитотоксичности (24 h или 72h) након третмана PS-MP/NP дијаметара 40nm и 200nm. МТТ тест је заснован на биоредукцији жутог тетразолијумовог једињења 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-il)-2,5-Diphenyltetrazolium bromid) у тамно љубичасти формаза. Конверзија се постиже помоћу ензима дехидрогеназе у метаболички активним ћелијама. Количина продукта формазана, измерена количином апсорбције на спектрофотометру на одређеној таласној дужини (оптимално 500-550 nm), директно је пропорционална броју живих ћелија у култури.

Анализа ћелија у реалном времену (RTCA) је техника заснована на импеданси и микросензорским електродама. Коришћени *xCELLigence Real-Time Cell Analyzer* може континуирано да прати број ћелија у реалном времену, контакте ћелија-ћелија, морфологију ћелија током времена, као и њихова миграторна и инвазивна својства.

Гел електрофореза појединачних ћелија- Кошет тест (енгл. *single cell gel electrophoresis- Comet assay*) представља методу детекције и евалуације оштећења ДНК. Принцип теста је заснован на електрофорези ДНК, где је степен електрофоретске покретљивости директно сразмеран количини ДНК прекида. Сам назив Кошет тест потекао је од изгледа мигрирајуће ДНК—један део се задржава у нивоу једра, дајући визуелни утисак „главе“, а молекули фрагментисане ДНК који брже мигрирају надовезују се на главу дајући утисак „репа“ комете. Анализа комета врши се при увећању 200× - 400×, што зависи од типа анализираних ћелија, опсега миграције ДНК, карактеристика микроскопа и компјутерског софтвера.

Анализа апоптотске смрти ћелија помоћу *Annexin-a V/PI* је метода заснована на снажном афинитету *Annexin-a V* за везивање за фосфатидилсерин. Током апоптозе фосфатидилсерин се преноси са цитоплазматске стране плазма мембране на површину ћелије, тако да се *Annexin V* може користити као маркер за откривање апоптозе проточном цитометријом.



**Фигура 8. Шематски приказ метода за одређивање цитотоксичности PS- MP/NP.**

### 3.6.1. МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолијум бромид) тест

Ћелије изоловане из слезине мишева су инкубирани 24 сата на 37 °C, у атмосфери засићеној воденом паром са 5% CO<sub>2</sub>, у комплетном DMEM-у (*Sigma Aldrich, St. Louis, SAD*). Након 24 сата ћелије су третиране медијумом који садржи PS-MP/NP. Ћелије су третиране полистиренским честицама у следећим концентрацијама: 40 nm PS-NP (0,01 mg/ml и 0,1 mg/ml); 200 nm PS-MP (0,01 mg/ml и 0,1 mg/ml); и смеша 40 и 200 nm PS-MP/NP (0,01 mg/ml и 0,1 mg/ml). Након инкубације од 24 и 72 сата вијабилност ћелија је мерена МТТ тестом. Апсорбанца је мерена на ELISA читачу (*Raito Life and Analytical Sciences Co., Ltd., Shenzhen, P. R. China*) на таласној дужини 550 nm (44). Процент вијабилних ћелија добијен је када је вредност апсорбанце третираних ћелија подељена вредношћу апсорбанце контролних (нетретираних) ћелија и помножена са 100.

### 3.6.2. ЦИТОТОКСИЧНОСТ У РЕАЛНОМ ВРЕМЕНУ (RTCA)

Праћење ћелијског индекса третираних ћелија је обављено коришћењем есеја *Real Time Cell Analyses* на *xCELLigence RTCA DP* систему (*Roche Applied Science, Швајцарска*) према приручнику произвођача. *xCELLigence* се састоји од три дела: i) RTCA анализатор за мерење импедансе на златним микроелектродама постављеним на Е- плочу; ii) RTCA SP је оперативна јединица смештена унутар инкубатора на којој су постављене три Е-плоче iii) RTCA управљачки софтвер (вер. 1.2.1.1002) који се може контролисати даљински путем интернет веза у реалном времену. Такав интегрисани микроелектронски систем за биолошка мерења садржи биосензоре који су лаки за коришћење и који прате адхезију и вијабилност ћелија у реалном времену. Уколико се на златној електроди налази већи број залепљених (живих) ћелија; мери се већа импеданса. Измерена вредност без јединица под називом ћелијски индекс (енгл. *Cell Index, CI*) представља резултат мерења дефинисан следећом једначином:  $CI = (R_{tn} - R_{to})/F$ .

Где је:

R<sub>tn</sub> - отпор мерен у тренутку је t<sub>n</sub>,

R<sub>to</sub> - отпор измерен у тренутку t<sub>o</sub>,

F - константна: 15 Ω на 10 kHz, 12 Ω на 25 kHz и 10 Ω на 50 kHz.

Да бисмо измерили сигнал, сипали смо 50 μL DMEM –а у плочу 16. Након позадинског мерења, додали смо 200 000 спленоцита у медијум. Након засејавања ћелија (50 μL суспензије DMEM–а и ћелија), RTCA систем је програмиран да мери CI током 96 сати сваких 15 минута. После 24 сата од сејања, причвршћене ћелије су третиране PS честицама: 0,01 mg/ml и 0,1 mg/ml честица од 40 nm и 200 nm. CI је праћен током преосталог периода дајући информације о третману у реалном времену. Сви експерименти су изведени у три понављања, сваки независни експеримент такође у три понављања. Интервални нагиб је аутоматски израчунат софтвером да би се проценила брзина промене индекса ћелија. Да би се одредио резултат третмана, ћелијски индекс је нормализован на приближну вредност у временској тачки нормализације, односно 24 сата. Нормализовани ћелијски индекс (NCI) је радна функција са подацима, где се бира одређено време (тј. када су ћелије третиране), што се затим утврђује као 1.0 (100%) од стране самог софтверског пакета. Након тога, све вредности се означавају у сразмери са овом вредношћу. NCI је погодан за апроксимацију процентуалне варијације у ћелијској адхезији.

### 3.7. АНАЛИЗА АПОПТОТСКЕ СМРТИ ЋЕЛИЈА ПОМОЋУ ANNEXIN-a V

Да би квантификовала апоптоза имунских ћелија, мононуклеарне ћелије су изоловане из слезине здравих мишева и култивисане 24 сата у присуству PS-MP/NP (40 nm и 200 nm) у ниским и високим концентрацијама. После *in vitro* третмана, спленоцити су обојени флуоресцентном пробом *Annexin V-FITC*, након чега је додат PI (BD *Pharmingen*) према упутству произвођача.

Процент мртвих ћелија је одређен проточним цитометром *FACS Calibur* (BD *Biosciences, San Jose, CA, US*), а подаци су анализирани помоћу софтвера *Floving software*. Коришћени су следећи критеријуми: 1) виталне ћелије су биле Annexin V (-) и PI (-), 2) ћелије у раној фази апоптозе су биле Annexin V (+) и PI (-), 3) ћелије у касној фази апоптозе су биле Annexin V (+) PI (+) и 4) некротичне ћелије су биле Annexin V (-) PI (+).

### 3.8. TUNEL метода

Узорци ткива слезине мишева третираних PS честицама као и контролних животиња су фиксирани у 4% раствору формалдехида и стављени у парафин. Ткива су исечена на исечке дебљине 4  $\mu\text{m}$ . Након депарафинизације и рехидратације, на сваки ткивни исечак је нанета мешавина за TUNEL (енгл. *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*), а затим је уследила инкубација од 60 минута на 37°C у влажној атмосфери у мраку. Након инкубације препарати су испирани у PBS, а затим прекривени DPX медијумом (*Sigma Aldrich, St. Louis, SAD*), анализирани и фотографисани дигиталном камером постављеном на светлосни микроскоп (*Nikon Eclipse 50i, Japan*).

### 3.9. ЈЕДНОЋЕЛИЈСКА ГЕЛ ЕЛЕКТРОФОРЕЗА (КОМЕТ ТЕСТ)

Комет тест је изведен на изолованим мононуклеарним ћелијама слезине као што је претходно описано (45). Ћелије су засејане у комплетном медијуму у плочи са 24 бунара и третиране PS честицама (дијаметра 40 односно 200 nm) у концентрацијама 0,47 и 4,7  $\mu\text{g/ml}$  у трајању од 24 сата у инкубатору на 37 C° са 5% CO<sub>2</sub>. Негативна контрола (нетретиране ћелије) и позитивне контроле (10 mg/mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и 0,5 mg/mL MMC) су постављене паралелно са третманима. После инкубације, ћелије су трипсинизоване и центрифугиране на 580g 2 минута. Добијене суспензије ћелија третиране полистиренском пластиком су затим помешане са 100  $\mu\text{l}$  1% агарозе (енгл. *low melting point agarose - LMPA*), садржај је ресуспендован и нанет на обележене предметне плочице преко ког се стављају покровне љуспице. Плочице су биле на леду неколико минута, а затим се скидају покровне љуспице. Такве предметне почице су преливане хладним лизирајућим раствором (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% triton X-100, 10% DMSO, pH 10.0) и остављене 2 сата у фрижидеру. Након тога, плочице су извађене из лизирајућег раствора и преливане хладним пуфером за електрофорезу (110M NaOH и 200 mM EDTA, pH>13.0) у којем су стајале пола сата. Затим је укључена електрофореза у трајању од 30 минута на 25V и 300 mA. Неутрализација плочица је вршена након завршене електрофорезе неутралишућим пуфером (0,4 M Tris, pH 7,5). Поступак је поновљен три пута у размаку од по 5 минута. Поступак бојења је остварен коришћењем етидијум бромида (50  $\mu\text{l}$ ). Цео поступак комет теста је спроведен у мраку како би се спречило додатно оштећење ДНК. Анализа плочица је извршена уз помоћ флуоресцентног микроскопа (*Nikon E50i*) на увећању 400x и са сваке плочице се бројало 100 ћелија. Оштећење ћелија је визуелно класификовано у пет група на основу оштећења

ДНК: 0 – нема оштећења; 1- мала оштећења ; 2- средња оштећења; 3- велика оштећења; 4 – тоталана оштећења (46). Индекс генетичког оштећења (*GDI*) је израчунат применом формуле:  $GDI = \text{Class1} + 2 \times \text{Class2} + 3 \times \text{Class3} + 4 \times \text{Class4} / \text{Class0} + \text{Class1} + \text{Class2} + \text{Class3} + \text{Class4}$ .

### 3.10. ХЕМАТОКСИЛИН-ЕОЗИН БОЈЕЊЕ. ГИМЗА БОЈЕЊЕ

Мононуклеарне ћелије слезине су засејани на покровна стакла (13 mm) у плочи са 24 бунара и инкубирани 24 сата у базалном медијуму без полистиренских честица (контрола) односно у присуству оба типа полистиренских честица (40 nm и 200 nm) у ниској или високој концентрацији. После третмана PS-MP/NP ћелије су обојене са 150 µl концентрованог *Giemsa* или раствора хематоксилина и еозина (HE) у трајању од 1 минута, након чега су HE односно *Giemsa* пажљиво уклоњени, а вишак боје испран два пута са 500µl PBS-а. Покровна стакалца са обојеним ћелијама су затим пренета на предметна стакла на које је претходно сипано по 20µl DPX медијума. Анализа плочица је извршена уз помоћ микроскопа *Nikon (Eclipse 50i, Japan)*.

### 3.11. БИХЕВИОРАЛНА ТЕСТИРАЊА

Ради процене анксиозности и депресивности животиња које су *per os* третиране флуоресцентно обележеним PS-MP/NP раствором у води спроведена су бихевиорална тестирања. Степен анксиозности је квантификован коришћењем теста отвореног поља (ОП) и теста уздигнутог крстастог лавиринта (УКЛ) (47,48). Животиње су смештене у просторију у којој се спроводило тестирање 1-2 сата пре извођења бихевиоралних тестова ради аклиматизације. Сви тестови су снимљени дигиталном камером постављеном изнад лавиринта на одговарајућој висини. Видео датотеке са отвореног поља и уздигнутог крстастог лавиринта су анализирани коришћењем *Ethovision softvera XT 12 (Noldus Information Technology, Холандија)*. На крају испитивања понашање сваке појединачне животиње, експерименталне арене су темељно очишћене како би се елиминисале могуће мирисне сензације. Сва испитивања су обављена у одговарајућим условима тишине и осветљења. Током испитивања експериментатор није био присутан у просторији за тестирање.

#### 3.11.1. ТЕСТ ОТВОРЕНОГ ПОЉА (ОП ТЕСТ)

Тест отвореног поља је спроведен као што је претходно описано (49). Тест је трајао пет минута, а праћени су следећи параметри: укупно време проведено у централној зони (УВЗЦ), број улазака у централну зону (БУЦЗ), укупни пређени пут (УПП), проценат времена кретања током трајања теста (% ВК), број усправљања (БУ).

#### 3.11.2. ТЕСТ УЗДИГНУТОГ КРСТАСТОГ ЛАВИРИНТА (УКЛ ТЕСТ)

ЕРМ тест је спроведен према претходно утврђеном протоколу (49). Параметри добијени током петоминутног теста били су: укупно време проведено у отвореним крацима (УВОК), број улазака у отворене краке (БУОК), укупни пређени пут (УПП), проценат времена кретања током трајања теста (% ВК), број усправљања (БУ), број нагињања (БН) и број епизода укупне експлоративне активности (УЕА).

### 3.12. РЕЛАТИВНА ЕКСПРЕСИЈА ГЕНА

#### 3.12.1. ИЗОЛАЦИЈА РНК

Након што су животиње жртвоване, узорци хипокампуса су хомогенизовани у тризолу и центрифугирани на 12000 rpm/5 мин /4°C. У сваки узорак је додат хлороформ и мешан 15 секунди. Након тога, епрувете су остављене да се инкубирају (2-3 мин) на собној температури. После центрифугирања од 15 минута/1200 rpm/4°C, примећене су три фазе, где је горња фаза (која садржи РНК) пребачена у нову микроепрувету. Додато је 500 µL изопропанола, РНК је преципитирана 10 минута, а узорци су поново центрифугирани (12000 rpm/10 мин /4°C). Супернатант је уклоњен, а преципитат је испран са 1 mL 70% етанола, а затим центрифугиран на 7500 rpm/5 мин /4°C. Супернатант је уклоњен, етанол је остављен да се осуши на ваздуху (2-3 мин.). РНК остатак је ресуспендован у 20 µL воде, а затим инкубиран на 55°C у термоблоку на 2-3 мин. Концентрација РНК је мерена у узорцима коришћењем биофотометра (*Eppendorf BioPhotometer Plus*). Узорци су даље чувани на -20°C до употребе.

#### 3.12.2 РЕВЕРЗНА ТРАНСКРИПЦИЈА РНК У КОМПЛЕМЕНТАРНУ ДНК (RT-PCR)

Реверзна транскрипција мРНК у комплементарну ДНК је изведена применом кита за реверзну транскрипцију (*cDNA Synthesis Kit*) са 2 µL узорка РНК који је додат у главну мешавину (енгл. *Master Mix, Fast Gene Scriptase Basic*). Комплементарна ДНК је добијена коришћењем апарата *Multigene OptiMAKS (Labenet International)*, а затим чувана на -20°C до даље употребе.

#### 3.12.3. КВАНТИТАТИВНА РЕАКЦИЈА ЛАНЧАНЕ ПОЛИМЕРИЗАЦИЈЕ У РЕАЛНОМ ВРЕМЕНУ (QUANTITATIVE REAL-TIME PCR, qRT-PCR)

Добијена комплементарна ДНК је коришћена за процену релативне експресије *housekeeping* гена *Gapdh* као и гена од интереса: *Gaba-α5*, *Bdnf*, *Bak*, *Bcl2*, *Nlrp3* и *Tgfβ*, применом комерцијално кита (*FastGene IC Green 2k qPCR Universal Mix*, Немачка). Реакцијска смеша је направљена за сваки циљани ген посебно додавањем мешавине *forward/reverse* прајмера (0,5 µL *forward* прајмера и 0,5 µL *reverse* прајмера, концентрација 10 µM) у 10 µL qPCR *Master Mix*-а, након чега је додато 1 µL кДНК и 8 µL воде (енгл. *Nuclease-free H<sub>2</sub>O*). Сваки qPCR циклус је започео кораком активације полимеразе, а затим је следило 40 циклуса који се понављају, сваки од њих се састоји од три корака: 1) денатурација ДНК на 95°C/15 sec; 2) хибридизација прајмера на 60°C/30 sec; 3) елонгација на 72°C/30 sec. Након амплификације, релативна експресија гена је израчуната коришћењем формуле:

$$2^{-\Delta\Delta C_t} = \Delta C_{t1} - \Delta C_{t2}$$

$\Delta C_{t1}$  = разлика између вредности  $C_t$  испитиваног гена у узорку третиране групе и  $C_t$  вредности *Gapdh* у узорку третиране групе;

$\Delta C_{t2}$  = разлика између вредности  $C_t$  испитиваног гена у контролној групи и  $C_t$  вредности *Gapdh* у контролној групи.

У Табели 2 су приказани прајмери који су коришћени у истраживању.

**Табела 2. Прајмери коришћени за qRT-PCR анализу.**

Гени	<i>Forward sequence</i>	<i>Reverse sequence</i>
<i>Gapdh</i>	5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC -3'	5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG -3'
<i>Gaba-<math>\alpha</math>5</i>	5'-GCCCTGGAAGCAGCTAAAAT -3'	5'-CGGGACATTTTGTTCGATCTT -3'
<i>Bdnf</i>	5'-AGCTGAGCGTGTGTGACAGT -3'	5'-ACCCATGGGATTACACTTGG -3'
<i>Bax</i>	5'-GCGTGGTTGCCCTCTTCTACTTTG-3'	5'-AGTCCAGTGTCCAGCCCATGATG -3'
<i>Bcl2</i>	5'-GTCCCGCCTCTTCACCTTTCAG -3'	5'-GATTCTGGTGTTCCTCCCGTTGG -3'
<i>Nlrp3</i>	5'-AGCCTTCCAGGATCCTCTTC-3'	5'-CTTGGGCAGCAGTTTCTTTC -3'
<i>Tgfb<math>\beta</math></i>	5'-ATACAGGGCTTTCGATTCAGC-3'	5'-GTCCAGGCTCCAAATATAGG -3'

### 3.13. МЕТОДЕ ЗА ИСПИТИВАЊЕ ГЕНОТОКСИЧНОСТИ ПОЛИСТИРЕНСКИХ МИКРО- И НАНОЧЕСТИЦА *IN VITRO*

За испитивање генотоксичног ефеката PS-MP/NP *in vitro* коришћени су лимфоцити изоловани из периферне крви C57BL/6 мишева, лимфоцити изоловани из периферне крви здравих људи, ћелијска линија хуманих феталних фибробласта плућа (MRC-5), ћелијска линија хуманих мезенхималних матичних ћелија периодонталног лигамента (MSC-PDL).

За култивацију наведених ћелија коришћен је медијум DMEM у који је додат фетални говеђи серум, L-глутамин, пеницилин/стрептомицин и неесенцијалне аминокиселине. Ћелије су узгајане у инкубатору на 37°C са 5% CO<sub>2</sub>. Лимфоцити су изоловани из хепаринизоване крви мишева и здравих донора уз помоћ *Histopaque*-1077 и третирано полистиренским микро- и наночестицама (дијаметра 40 односно 200 nm) у две различите концентрације (0,47 и 4,7 µg/ml) и инкубирани пола сата на 37 °C. MRC5 односно MSC-PDL су засејани у комплетном медијуму у плочи са 24 бунара и третирано PS честицама (дијаметра 40 односно 200 nm) у концентрацијама 0,47 и 4,7 µg/ml у трајању од 24 сата у инкубатору на 37 °C са 5% CO<sub>2</sub>. После третмана, поступак комет теста (једноћелијске гел електрофорезе), анализа плочица и рачунање индекса генетичког оштећења (GDI) је спроведено као што је раније описано у поглављу 3.9 и приказано у табели XX. Негативна контрола (нетретиране ћелије) и позитивне контроле (MMC и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) су постављене паралелно са третманима.

**Табела 3. Третман хуманих лимфоцита и ћелијских линија MRC-5 и MSC-PDL полистиренским микро– и наночестицама**

ИЗОЛАЦИЈА ЛИМФОЦИТА ИЗ ПЕРИФЕРНЕ КРВИ ЉУДИ	ПРИПРЕМА MRC-5 И MSC-PDL
Узорак крви се распореди у две епрувете по 2 ml и дода 2ml медијума RPMI са EDTA. Крв са медијумом (4ml) наслојити у другу епрувету у којој се налази 3ml HISTOPAQUE-1077.	Комерцијалне MRC-5 и MSC-PDL претходно су засејане у флашкове и култивисане у комплетном DMEM-у. Ћелије су затим пребројане у разблажењу 1:10.
Центрифугирање - 1900 грм, 15 минута	Центрифугирање - 1800 грм, 10 минута
Супернатант се одлива, а формиран прстен садржи лимфоците на којима се врши даље истраживање. Ћелије се ресуспендују у медијуму RPMI.	Супернатант се одлива, а пелет се ресуспендује у 5ml комплетног DMEM-а.
Центрифугирање - 1800 грм, 10 минута.	
Супернатант се одлије, лимфоцити се ресуспендују у RPMI.	
Центрифугирање - 1800 грм, 10 минута	
Супернатант се одлије и на пелет дода 1ml RPMI.	
Третман PS-MP/NP.	Третман PS-MP/NP.
Инкубација – 30 минута на 37°C.	Инкубација- 24h на 37°C.
Центрифугирање - 2000 грм, 5 минута.	Центрифугирање - 2000 грм, 10 минута.
Лизирајући раствор– 2h.	
Пуфер за електрофорезу- 30 минута.	
Електрофореза – 30 минута (25 V, 300 mA).	
Неутралишући пуфер – 3 x 5 min.	
Бојење препарата - 50 µl етидијум бромид.	

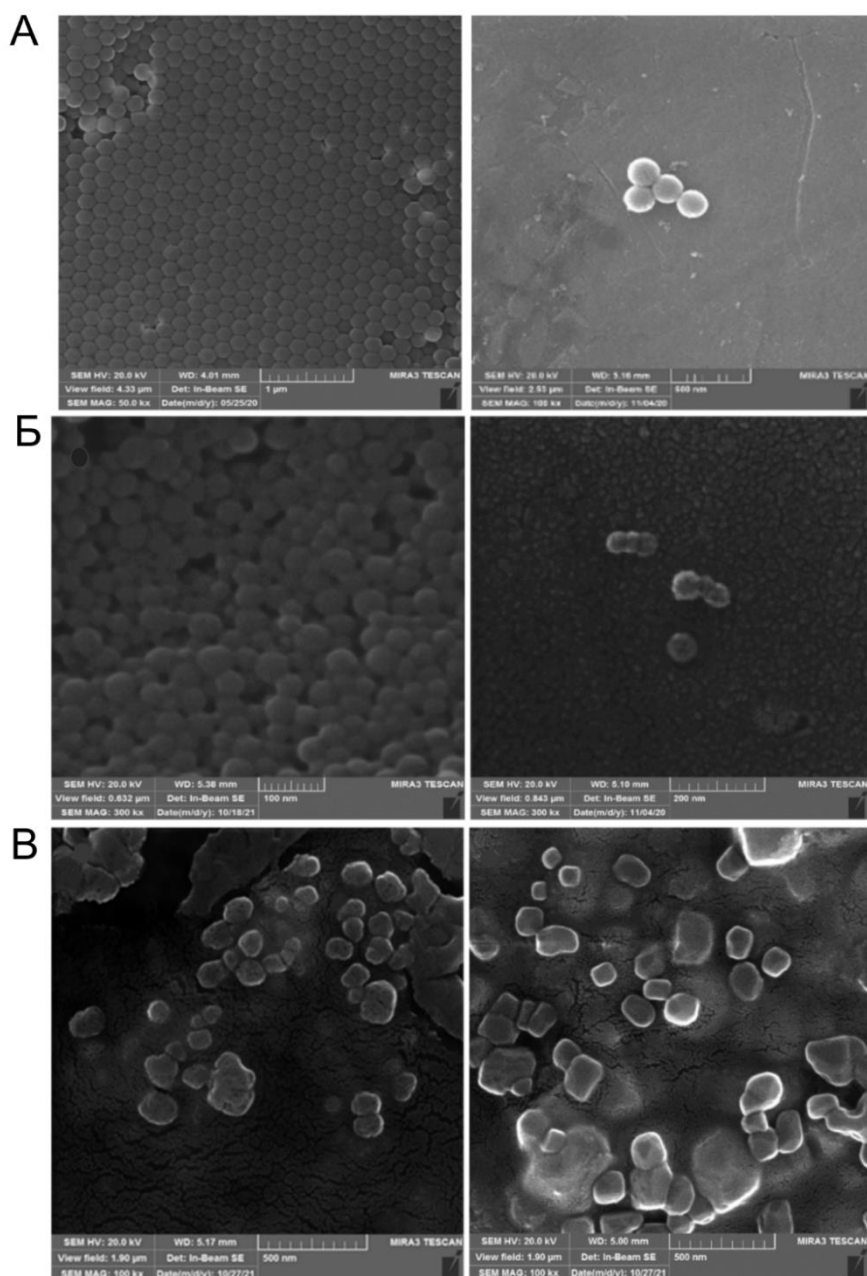
### 3.14. СТАТИСТИЧКА АНАЛИЗА

За сваку анализу изведена су три независна експеримента са минимумом три техничке реплике, осим ако није другачије наведено. Податци су представљени као средња вредност са стандардном девијацијом (SD) или стандардна грешка средње вредности (SEM). Ефекти су упоређени са мишевима и ћелијама који нису третирано. Статистичке анализе су обављене коришћењем Mann-Whitney теста и једне начинске анализе варијансе (ANOVA). Коришћена је једносмерна ANOVA са *Tukey's post hoc* тестом да би се упоредиле разлике међу групама у Комет тесту. Вредност  $p$  мања од 0,05 сматра се значајном и означена је са\*;  $p < 0,005$  је означена са \*\*, а  $p < 0,001$  са \*\*\*.

## 4. РЕЗУЛТАТИ

### 4.1. КАРАКТЕРИЗАЦИЈА ПОЛИСТИРЕНСКИХ ЧЕСТИЦА

Као што се може видети на **фигури 9**, PS-MP/NP које су коришћене у истраживању су сферног облика. Просечна величина ( $\pm$  SD) честица пречника 200 nm (PS-MP) била је  $201,23 \pm 6,2933$  nm, док је средња вредност честица пречника 40 nm (PS-NP) била  $29,11 \pm 5,42$  nm (**Табела 4**).



**Фигура 9.** Репрезентативне микрографије PS честица коришћених у истраживању добијене скенирајућом електронском микроскопијом (SEM). PS честице величине (A) 40 nm у PBS-у, (B) 200 nm растворене у PBS-у и (B) 200 nm растворене у DMEM-у.



**Табела 4. Пречник коришћених флуоресцентних PS честица мерен скенирајућом електронском микроскопијом (SEM).**

Узорак	Пречник PS честица (nm)			
	Мин. вредност	Макс. вредност	Средња вредност	SD
40 nm	19.90	44.66	29.11	5.42
200 nm	191.86	210.69	201.23	6.29

Анализа зета потенцијала је показала да су PS честице растворене у PBS-у негативно наелектрисане. Просечни потенцијал PS-NP (величине 40 nm) је био  $-29,83 \pm 1,22$  mV, док је за PS-MP (дијаметра 200 nm) био  $-38,85 \pm 2,60$  mV, што указује на умерену стабилност и дисперзију коришћених честица (Табела 5).

**Табела 5. Вредности зета потенцијала PS честица растворених у PBS-у.**

Величина узорка	t (°C) (средња вредност)	Зета потенцијал (mV) (средња вредност + SD)	Моб (μсм/Vs) (средња вредност +SD)
40 nm	24.97	$-29.83 \pm 1.22$	$-2.3383 \pm 0.1$
200 nm	24.97	$-38.85 \pm 2.60$	$-3.0470 \pm 0.21$
40 nm + 200 nm	25.05	$-32.33 \pm 1.52$	$-2.5423 \pm 0.05$

Зета потенцијал PS-MP/NP диспергованих у DMEM-у је такође био негативан, а просечна вредност је била  $-11,8 \pm 1,16$  за честице величине 40 nm односно  $-9,96 \pm 0,75$  за 200 nm PS-MP (Табела 6).

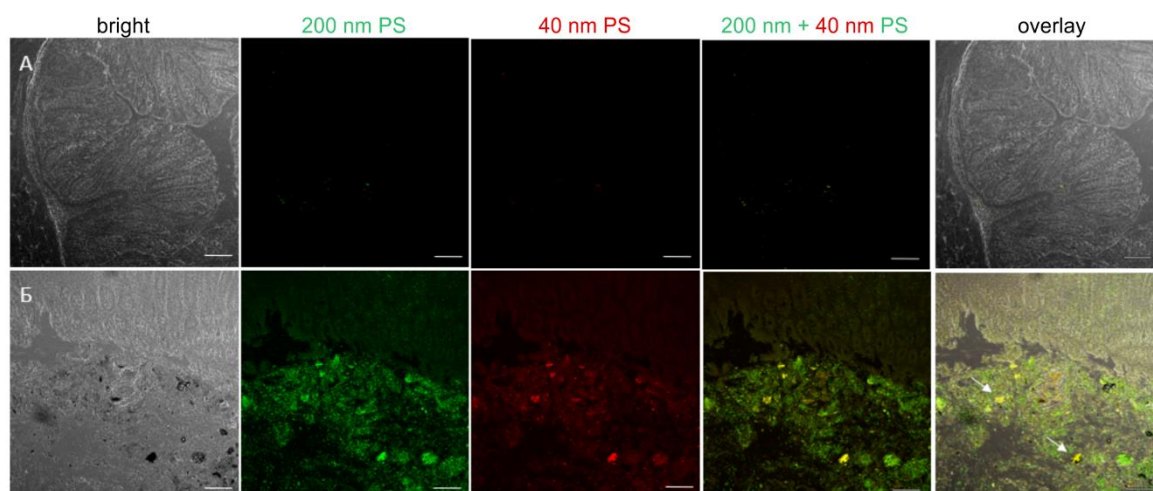
Табела 6. Вредности зета потенцијала PS честица растворених у DMEM-у.

Величина узорка	t (°C) (средња вредност)	Зета потенцијал (mV) (средња вредност + SD)	Mob (µcm/Vs) (средња вредност + SD)
40 nm	25,06	-11,8 ± 1,16	-0,92±0,08
200 nm	25,03	-9,96 ± 0,75	-0,78±0,05
40 nm + 200 nm	25,06	-9,79 ± 1,40	-0,76±0,1

#### 4.2. ПЕНЕТРАЦИЈА И АКУМУЛАЦИЈА ЧЕСТИЦА ПОЛИСТИРЕНА *IN VIVO* И *IN VITRO*

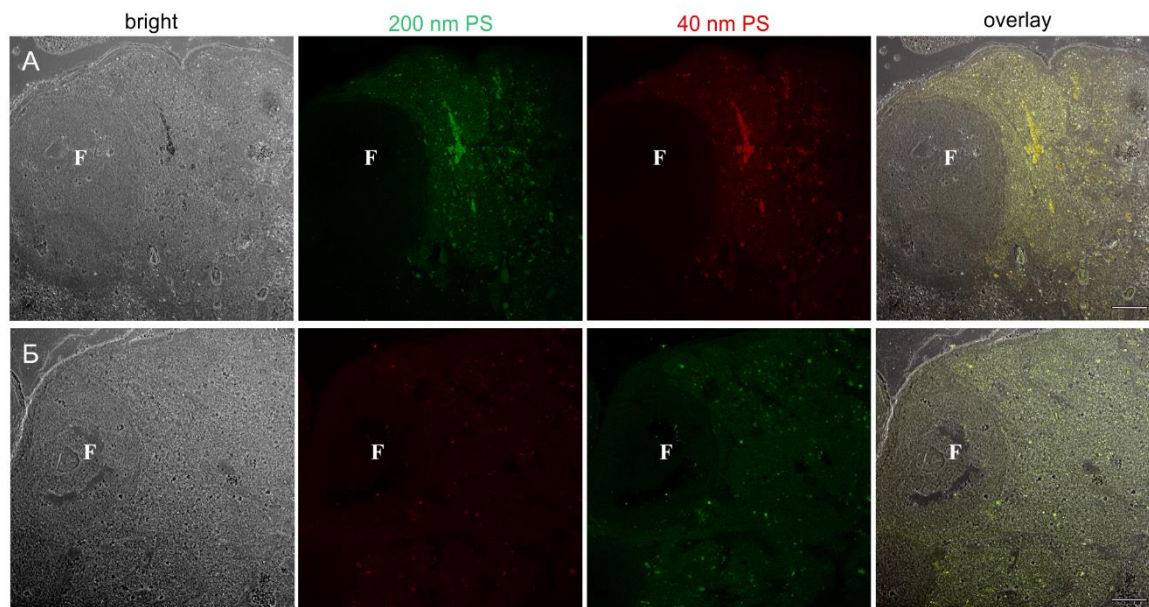
Како би била испитана анатомска дистрибуција и акумулација PS-MP и PS-NP *in vivo*, у ткивима и органима миша након *per os* уноса, у истраживању су коришћене флуоресцентно обележене честице (зелене- дијаметра 200 nm и црвене- дијаметра 40 nm), а затим је њихова пенетрација анализирана конфокалном микроскопијом.

Након оралне примене PS-MP/NP растворених у води за пиће у трајању од пет недеља у концентрацији 0.1 mg/дан, обе врсте честица су биле видљиве као различите флуоресцентне тачке или флуоресцентни агрегати у лумену црева третираних мишева (Фигура 10А), док лумен црева контролне групе није показивао флуоресцентни сигнал (Фигура 10Б).



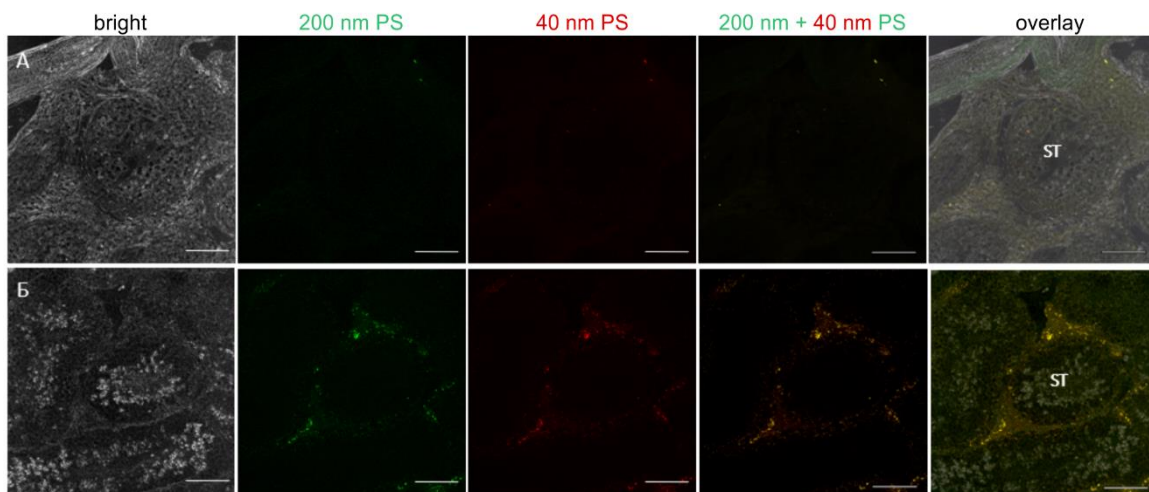
Фигура 10. Репрезентативне слике конфокалне микроскопије јејунума животиња третираних PS-MP/NP. (А) Сигнал је одсутан у јејунуму контролних животиња. (Б) Флуоресцентно обележене PS-MP (зелено) и PS-NP (црвено) акумулирају се у лумену црева мишева након уноса *per os*, путем воде за пиће. Представљени резултати 2 експеримента са 9 мишева по групи. Scale bars = 100 µm.

Такође, флуоресценција није детектована у јајницима женки мишева које су у периоду од пет недеља биле изложене PS-MP/NP путе воде за пиће (**Фигура 11**).



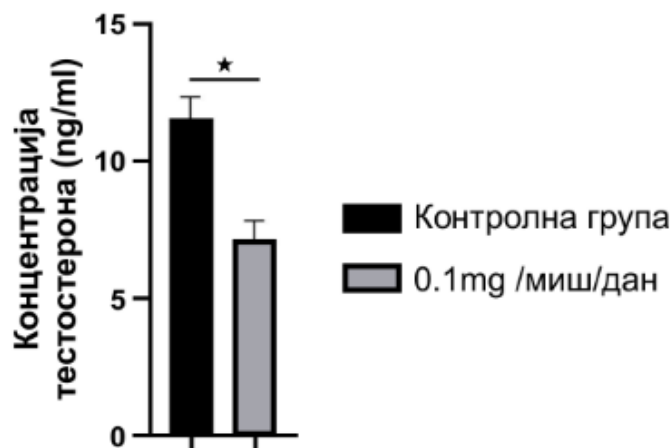
**Фигура 11.** Репрезентативне слике конфокалне микроскопије јајника животиња третираних PS-MP/NP. Флуоресценција није детектована у ткиву јајника (А) контролних нити (Б) експерименталних мишева третираних PS-MP/NP. Представљени резултати 2 експеримента са 9 мишева по групи.

Насупрот томе, као што се може уочити на **фигури 12**, тестиси третираних мужјака показали су зелену и црвену флуоресценцију у интерстицијалном делу који окружује семиниферне каналиће (*lat. tubuli seminiferi*). Међутим, PS честице нису уочене у епителу семиниферних тубула тестиса.



**Фигура 12.** Репрезентативне слике конфокалне микроскопије тестиса мишева третираних PS-MP/NP. (А) Флуоресценција није детектована у тестисима контролних животиња. (Б) У тестисима третираних мужјака, флуоресцентни сигнали су лоцирани и ограничени на интерстицијум који окружује семиниферне тубуле. *Scale bars* = 50  $\mu\text{m}$ . Представљени резултати 2 експеримента са 9 мишева по групи.

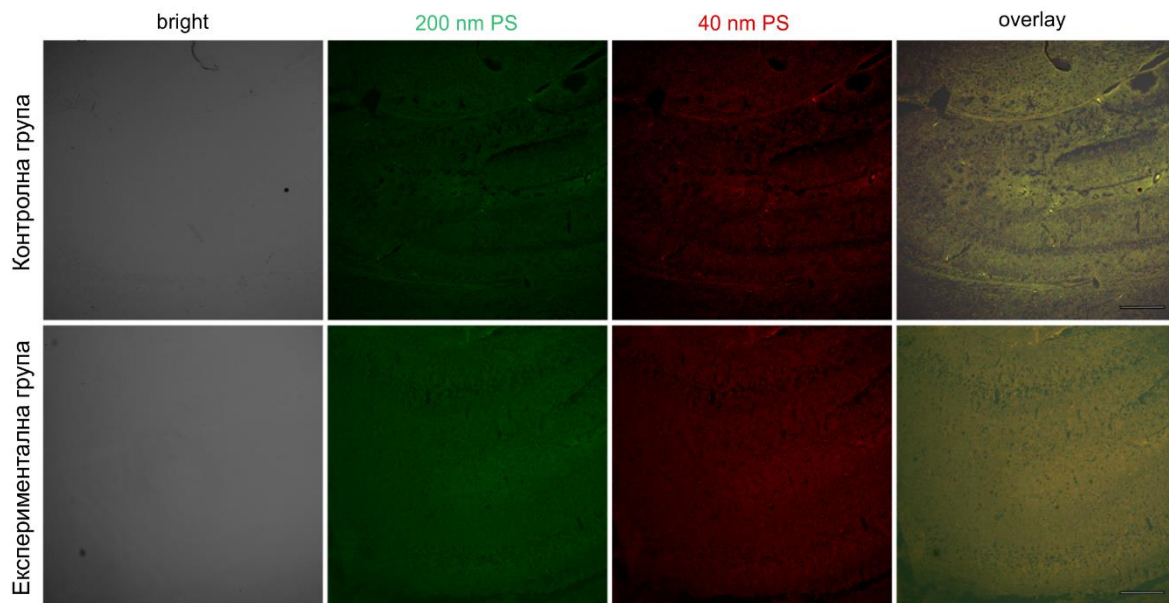
Након што је уочена акумулација полистирена у тестисима експерименталних животиња, у циљу испитивања утицаја пластике на функционални статус тестиса, измерена је концентрације овог хормона у серуму мишева. Као што је приказано на **фигури 13**, накупљање PS-MP/NP у тестисима узроковала је статистички значајно ( $p < 0,05$ ) смањење концентрације тестостерона у серуму животиња третираних PS-MP/NP у поређењу са контролном групом.



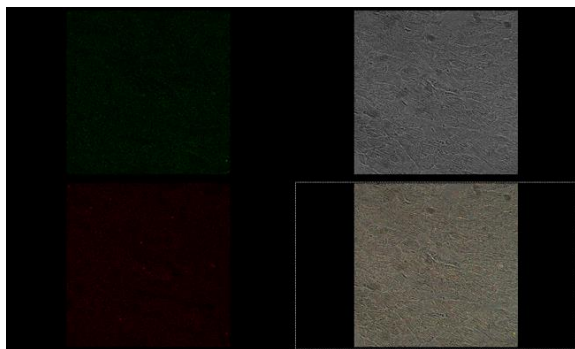
**Фигура 13.** Концентрација тестостерона у серуму животиња третираних PS-MP/NP. Постоји статистички значајан пад тестостерона у серуму мишева који су *per os* били изложени PS-MP/NP (0.1 mg/дан у трајању од пет недеља) у поређењу са контролном групом. Представљени резултати 2 експеримента са 9 мишева по групи (средња вредност  $\pm$  SE; \*  $p < 0.05$ ).

У испитиваним деловима мозга, бубрега, срца, јетре и плућа нису откривени значајни флуоресцентни сигнали код третираних животиња у поређењу са контролном групом која одговара старости и полу (**Фигура 14**). Наиме, у ткиву мозга контролних и третираних животиња примећен је флуоресцентни сигнал који је проузроковано уобичајеним аутофлуоресценцијом мозга, међутим, није примећено накупљање флуоресцентно означених PS-MP/NP. Као репрезентативна зона је изабран хипокампус (**Фигура 14А**).

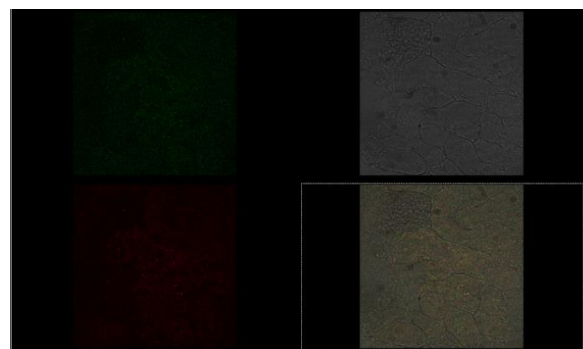
**(А) Мозак**



**(Б) Срце**



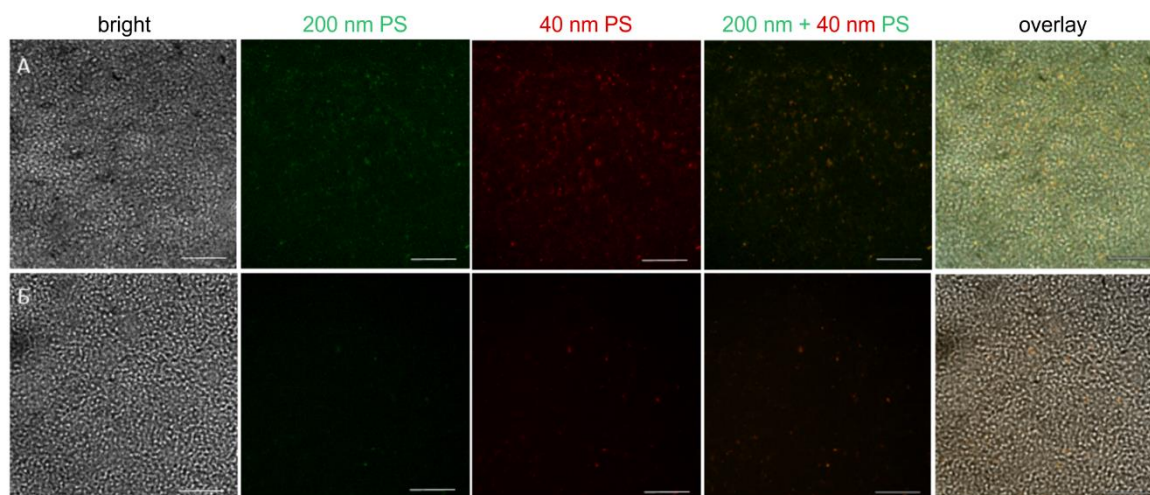
**(В) Бубрег**



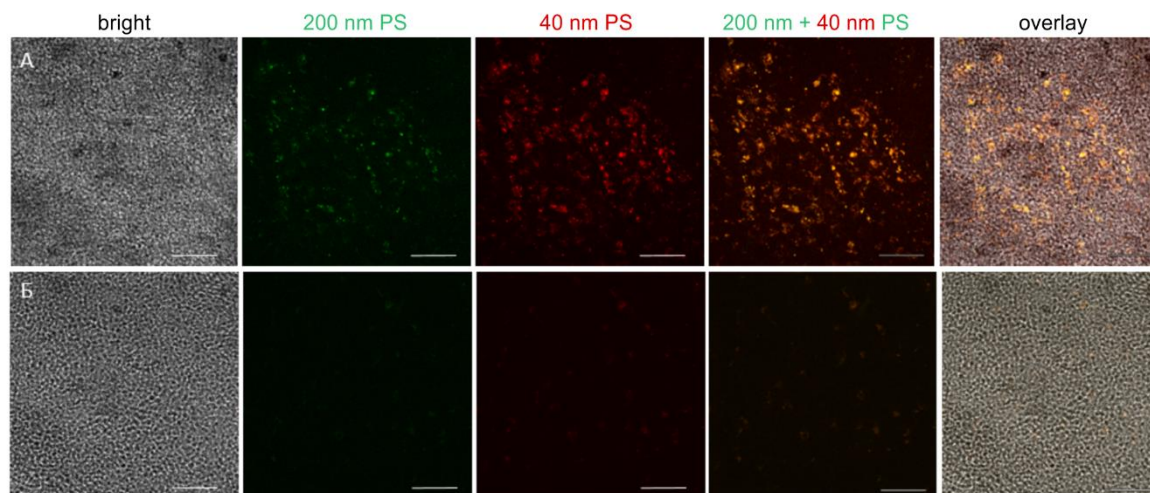
**Фигура 14.** Репрезентативне слике конфокалне микроскопије мозга, срца и бубрега мишева третираних PS-MP/NP. У (А) хипокампусу, (Б) ткиву срцу и (В) бубрега експерименталних мишева, није примећено накупљање флуоресцентно обележених PS честица. Комбиновани резултати 2 експеримента са укупно 9 животиња по групи. *Scale bars* = 250  $\mu\text{m}$ .

Такође, флуоресцентно обележене PS честице нису могле да се детектују у паренхиму слезине животиња због изражене аутофлуоресценције органа (**Фигура 15**). Међутим, детаљном анализом исечака конфокалном микроскопијом уочено је смањење интензитета аутофлуоресценције у паренхиму слезине третираних животиња, како у црвеној (**Фигура 15 I**) тако и у белој пулпи (**Фигура 15 II**).

**I**

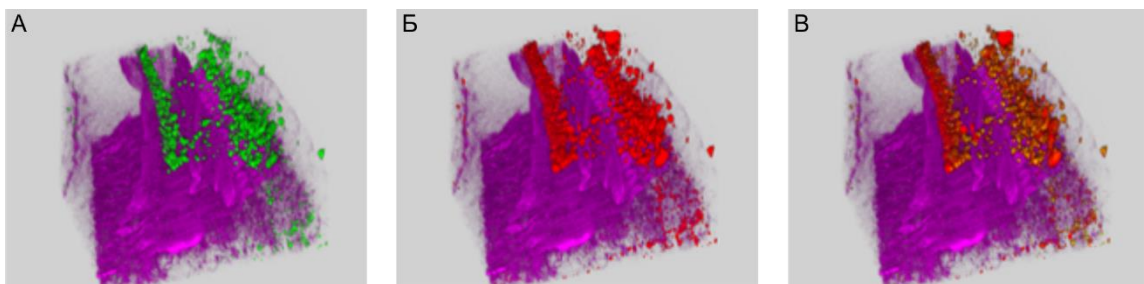
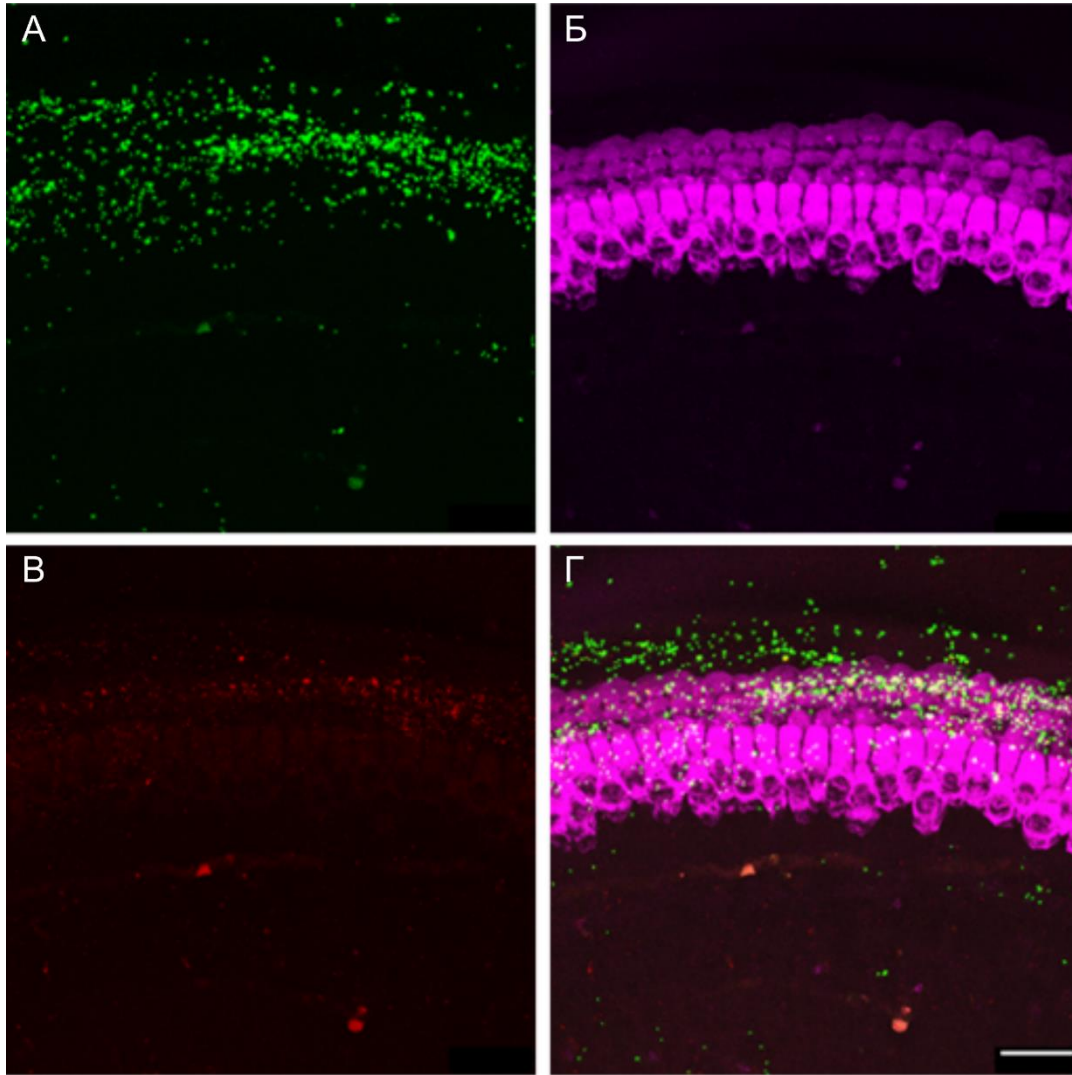


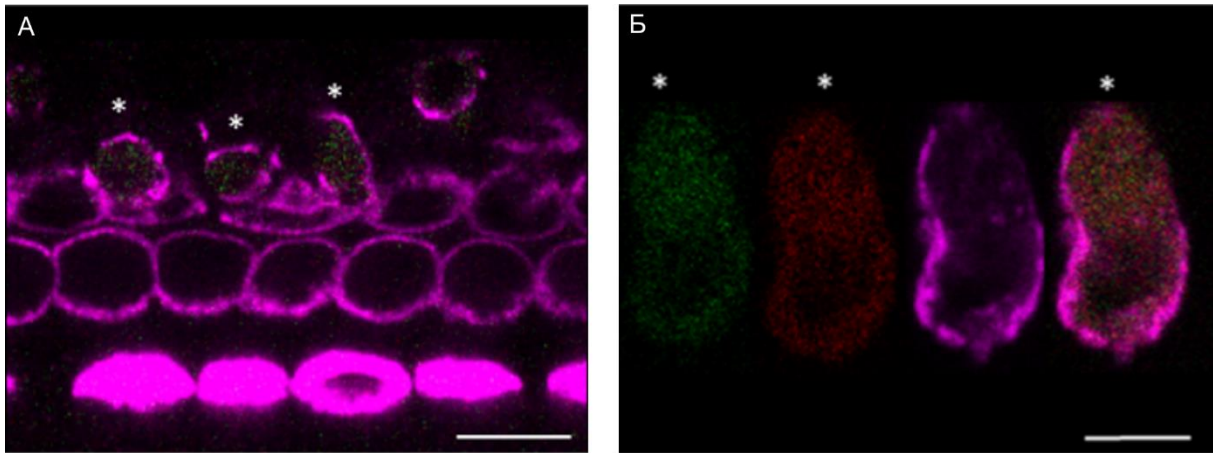
**II**



**Фигура 15. Репрезентативне слике конфокалне микроскопије слезине мишева третираних PS-МР/НР. (I) Црвена пулпа слезине (А) контролне и (Б) експерименталне групе животиња. (II) Фоликули беле пулпе слезине (А) контролне и (Б) експерименталне групе мишева.**

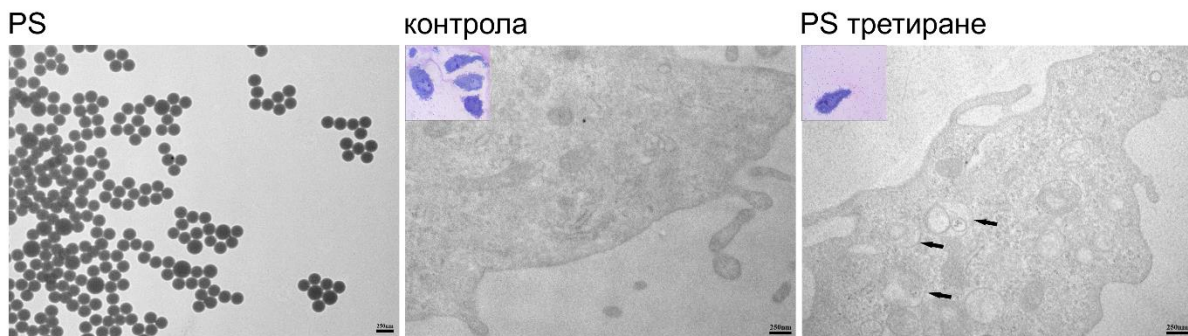
Како би се испитало да ли локално примењене PS-MP/NP пенетрирају у сензорне ћелије сисара, мишји неонатални кохлеарни експланти су култивисани у присуству ниске концентрације PS честица (Фигура 16). Након 24 сата кокултуре, конфокалном микроскопијом је детектовано интрацелуларно присуство оба типа PS честица, потврђујући њихову способност да пенетрирају и акумулирају се и у унутрашњим и спољашњим сензорним слушним ћелијама са длачицама, Такође је уочена је значајна количина ванћелијских агрегата PS-MP/NP (Фигура 16).





**Фигура 16.** Кохлеарни експлант инкубиран 24 сата са ниском концентрацијом PS честица величине 200 nm и 40 nm. Обе врсте честица су присутне у сензорним ћелијама са длачицама унутрашњег уха и локализоване интрацелуларно (А-Г).

Да би се потврдило да PS честице величине 200 nm заиста улазе у ћелију, у наредној фази истраживања коришћена је трансмисиона електронска микроскопија (ТЕМ). Наиме, честице су прво идентификоване микроскопијом, а затим су комерцијалне мезенхималне матичне ћелије изоловане из коштане сржи C57BL/6 мишева култивисане у присуству PS у трајању од 24 сата, а затим прегледане ТЕМ-ом. ТЕМ је потврдила да и макропластика величине (200 nm) има способност пенетрације у ћелију (**Фигура 17**).

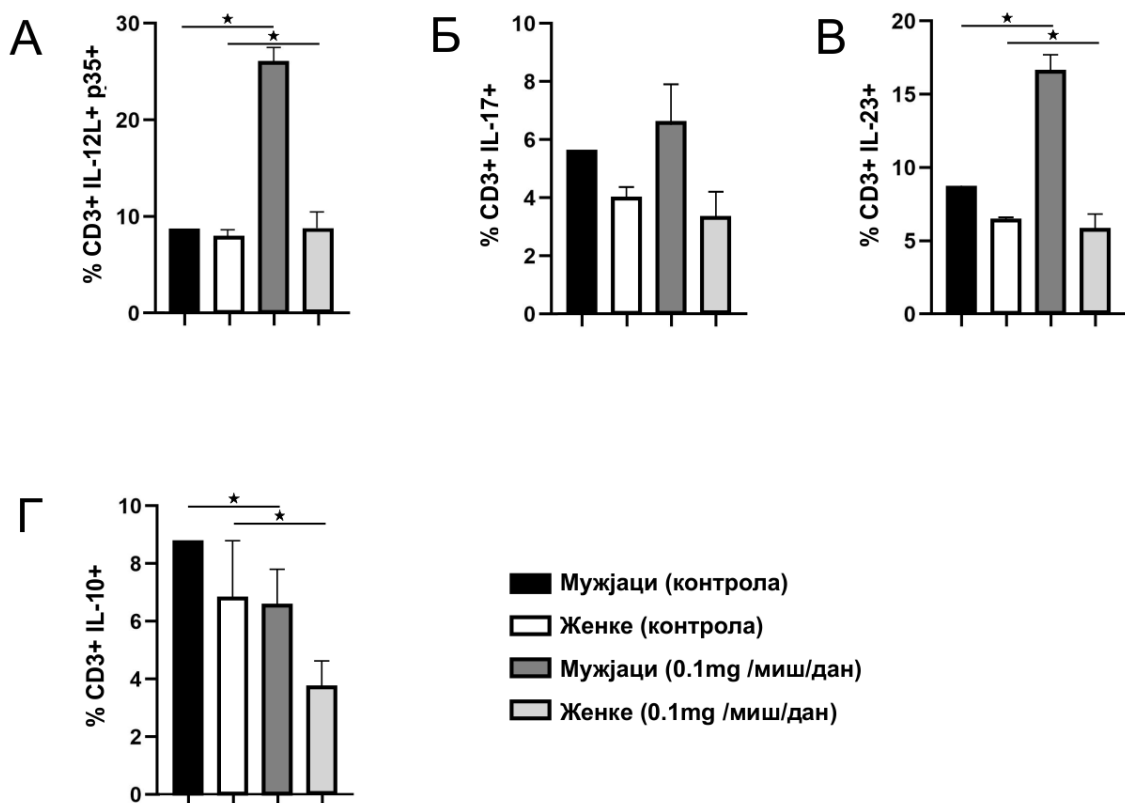


**Фигура 17.** Репрезентативне слике трансмисионе електронске микроскопије. MSC третиране полистиренским честицама величине 200 nm (PS treated) интернализују PS у ендозомским структурама (стрелице). *Scale bars 250 nm.*



### 4.3. АНАЛИЗА ЦИТОКИНСКОГ ПРОФИЛА ИМУНСКИХ ЋЕЛИЈА ПРОТОЧНОМ ЦИТОМЕТРИЈОМ

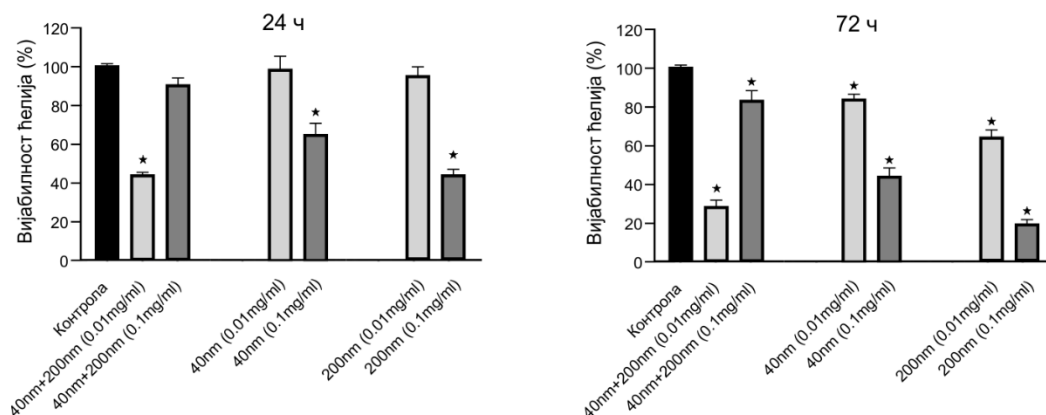
Како би се испитало да ли перорална примена PS-MP/NP изазива инфламаторни одговор, анализиран је фенотип имунских ћелија слезине. Проточна цитометрија је показала значајно ( $p < 0,05$ ) повећање секреције IL-12p35 и IL-23 у спленцитима мужјака третираних PS у дози 0,1 mg/дан у поређењу са женкама и контролним животињама (Фигура 18 А,В). Није било статистички значајне ( $p > 0,05$ ) разлике у процентуалној заступљености CD3+ лимфоцита који продукују IL-17 између експерименталних група (Фигура 18 Б). Међутим интрацелуларно бојење је показало значајно нижи проценат ( $p < 0,05$ ) CD3+ ћелија које секретују антиинфламаторни IL-10 у слезини мишева третираних са PS-MP/NP (Фигура 18 Г), што је указало на потенцијалну цитотоксичност PS-MP/NP посредством индукције инфламације *in vivo*.



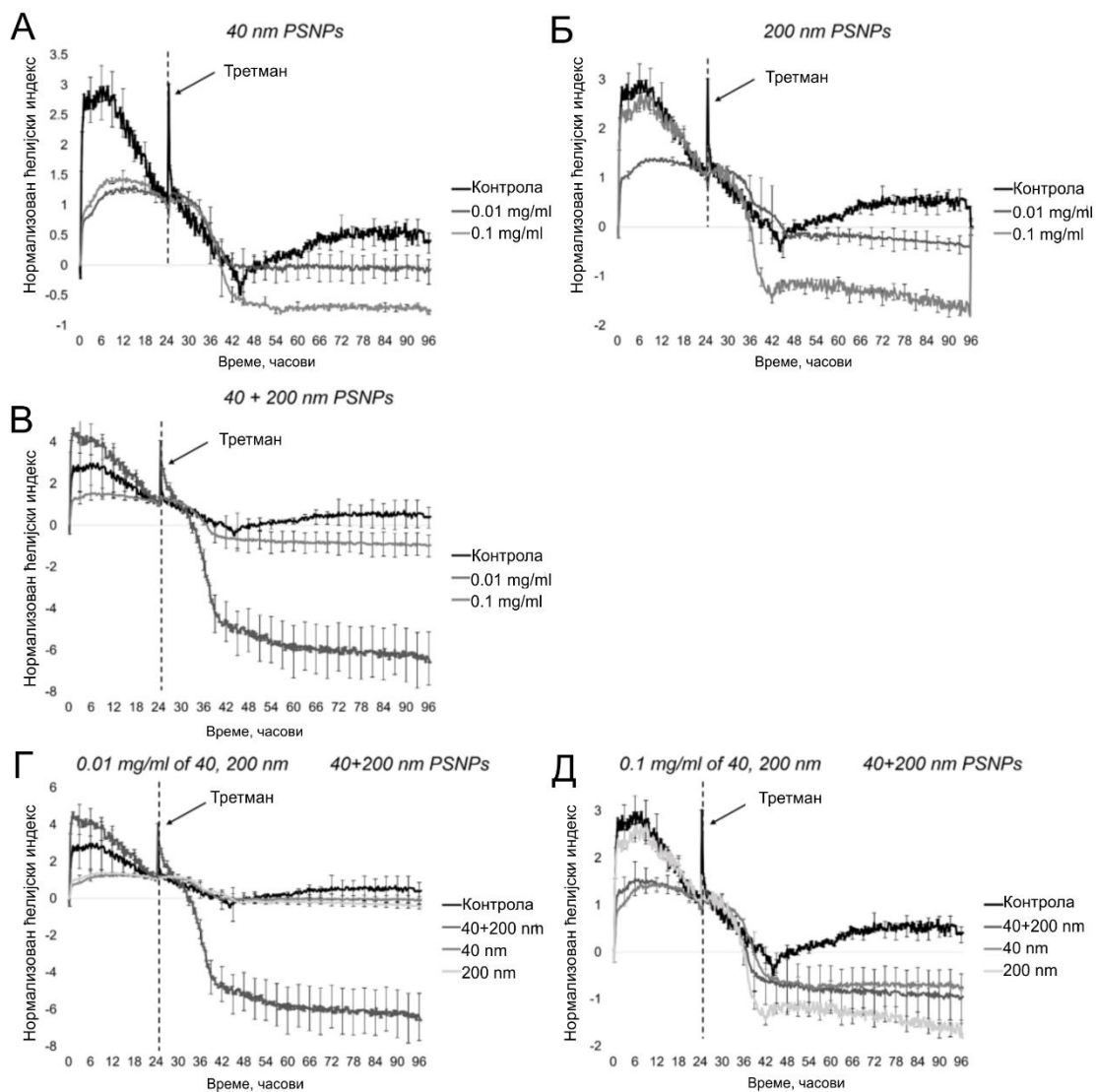
**Фигура 18.** Анализа ћелија слезине проточном цитометријом. Процентуална заступљеност А) CD3+IL-12p35+; Б) CD3+IL-17+; Ц) CD3+IL-23+ и Д) CD3+IL-10+ ћелија. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  SEM ( $n = 9$  животиња по групи),  $*p < 0,05$ .

#### 4.4. ЦИТОТОКСИЧНО ДЕЈСТВО ПОЛИСТИРЕНА НА ЋЕЛИЈЕ

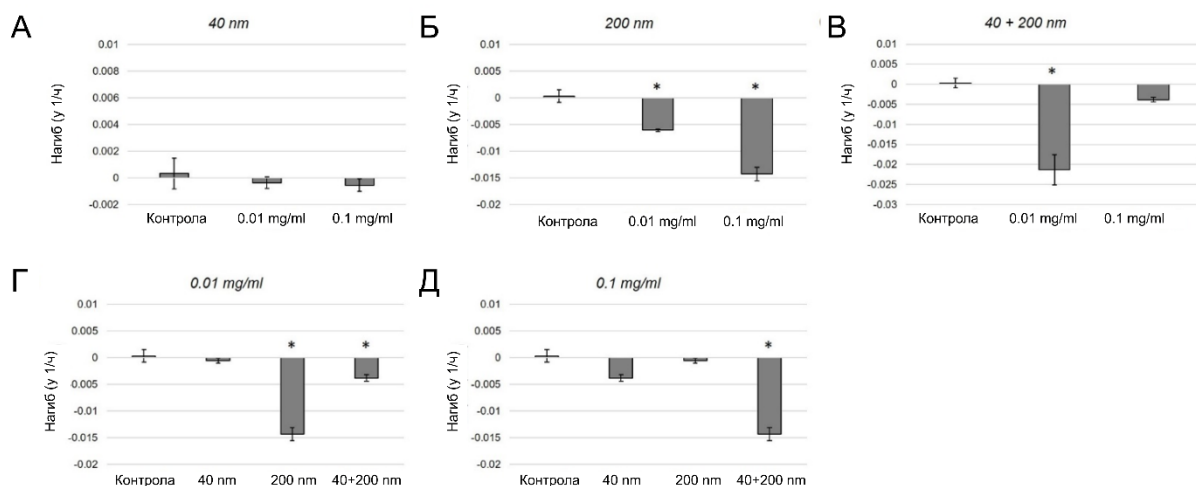
Приказани МТТ *in vitro* подаци указују на значајно токсично дејство PS честица на ћелије слезине након третмана у трајању од 24 и 72 сата (Фигура 19). Цитотоксичност PS-MP/NP је зависила од примењене концентрације и трајања третмана. Наиме, култивација ћелија са честицама величине 40 nm (PS-NP) при нижој концентрацији у току 24 сата није показала статистички значајну цитотоксичност. Међутим, већа концентрација након 24 сата показала је значајно ( $p < 0,05$ ) повећање цитотоксичности (64,61% живих ћелија). Применом третмана у трајању од 72 сата, ефекти су били још израженији, што потврђује статистички значајна ( $p < 0,05$ ) цитотоксичност обе примењене концентрације полистиренске пластике (83,16% живих ћелија при концентрацији 0,01 ng/ml и 42,91% при концентрацији 0,1 ng/ml). PS-MP (величине 200 nm) показале су сличан ефекат, односно након 24 сата само је већа концентрација изазвала статистички значајну ( $p < 0,05$ ) промену (41,59%), док су после 72 сата обе концентрације значајно смањиле вијабилност ћелија (63,61% живих ћелија при дози 0,01 ng/ml и 18,16% живих ћелија при дози 0,1 ng/ml). С друге стране, мешавина честица величине 40 nm и 200 nm показала је временски зависно смањене ћелијске вијабилности. Међутим, нижа концентрација је имала већи ефекат од веће концентрације која изазвала статистички значајно ( $p < 0,05$ ) смањење вијабилности тек после 72 сата (82,67% вијабилних ћелија). Сличан ефекат прилико примене оба врсте PS честица (200nm и 40nm) је добијен праћењем вијабилности ћелија коришћењем нормализованог ћелијског индекса (NCI) у реалном времену у систему *xCelligence* (Фигуре 20, 21) и квантификацијом индуковане апоптозе.



**Фигура 19.** Цитотоксични утицај PS-MP/NP на ћелије слезине. Цитотоксичност је изражена кроз проценат живих ћелија после третмана у две дозе, у трајању од 24 односно 72 сата. (\* $p < 0,05$ ).



**Фигура 20. Кинетика нормализованог ћелијског индекса (NCI) ћелија слезине изложених PS-MP/NP различитих величина и концентрација у поређењу са контролним ћелијама. (А) 40 nm PS-NP примењене у концентрацијама од 0,01 mg/ml и 0,1 mg/ml; (Б) 200 nm PS-MP примењене у концентрацијама од 0,01 mg/ml и 0,1 mg/ml; (В) Мешавина 40 и 200 nm PS-MP/NP примењених у концентрацијама од 0,01 mg/ml и 0,1 mg/ml. (Д) 40 nm, 200 nm, и мешавина 40 nm и 200 nm PS-MP/NP примењена у концентрацији од 0,01 mg/ml. (Е) 40 nm, 200 nm, и мешавина 40 nm и 200 nm PS-MP/NP примењена у концентрацији од 0,1 mg/ml. Појединачни третмани PS (А, Б) показали су одређену цитотоксичност, али значајно мању од мешавине PS-MP/NP (В). Ниже концентрације PS-MP/NP (Д) показале су значајнији ефекат од виших концентрација (Е).**

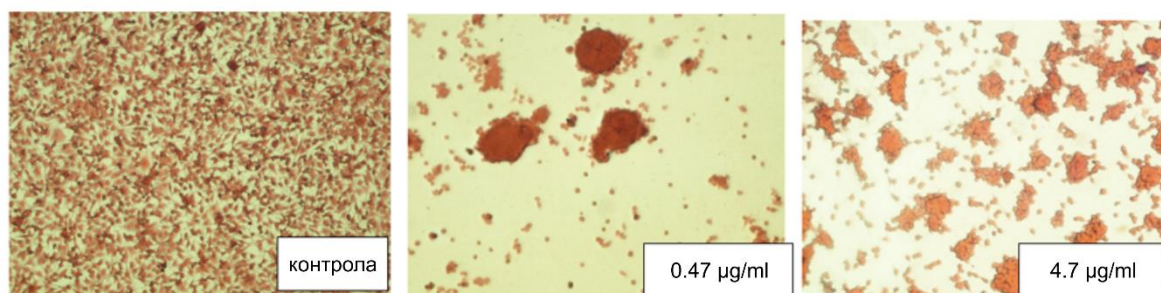


**Фигура 21. Нагиб нормализованог ћелијског индекса (NCI) ћелија слезине у зависности од времена изложености ћелија PS-MP/NP различитих концентрација и величина у поређењу са контролним ћелијама.** Нагиби, а тиме и стопа промене NCI, анализирани су у периоду од 48 и 72 сата након третмана. (А) Нема значајне разлике у NCI нагибу контролних ћелија и ћелија третираних са PS-NP (40 nm) у дози 0,01 mg/ml и 0,1 mg/ml. (Б) Повећање нагиба зависно од дозе услед примене PS-MP (200 nm) у концентрацији 0,01 mg/ml и 0,1 mg/ml у поређењу са контролама. (Ц) Котретман PS-MP/NP (40 nm и 200 nm) значајно је смањио нагиб NCI само при нижој концентрацији. (Д) PS-MP (200 nm) су биле ефикасније од мешавине партикула у смањењу вијабилности ћелија при концентрацији од 0,01 mg/ml. (Е) Мешавина PS-MP/NP је била ефикаснија од примене појединачних честица 40 nm односно 200 nm у смањењу вијабилности ћелија када је коришћена концентрација од 0,1 mg/ml. \* $p < 0,05$  у поређењу са контролом.

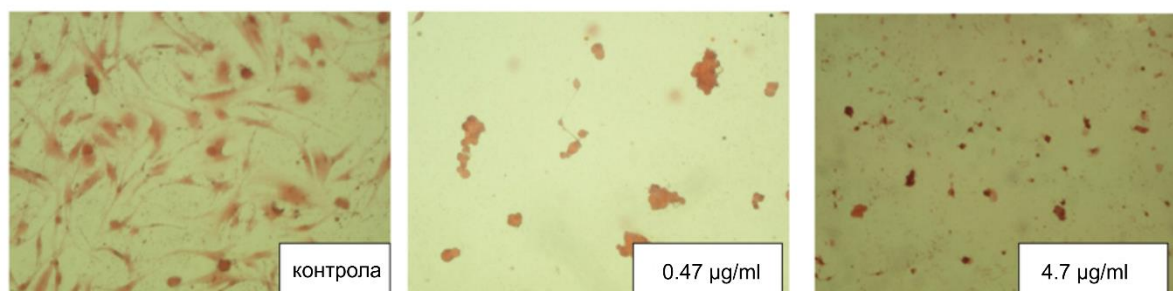
#### 4.5. ЋЕЛИЈЕ ИЗЛОЖЕНЕ ПОЛИСТИРЕНУ ПОДЛЕЖУ АПОПТОЗИ

24 сата након третмана PS-MP/NP, MRC-5 и MSC-PDL су подлегле сличним морфолошким промена, што је уочено применом HE бојења. Након третмана ћелија PS-MP/NP у концентрацији 0,47  $\mu\text{g/ml}$ , било је евидентно бубрење ћелија док су једра била благо вакуолизована (Фигура 22). Са повећањем дозе PS (4,7  $\mu\text{g/ml}$ ), ћелија су постале смањеног волумена, смежуране и масовно одлепљене од пластике за култивацију (Фигура 22) што сугерише да су ћелије ушле у апоптозу.

## MRC-5



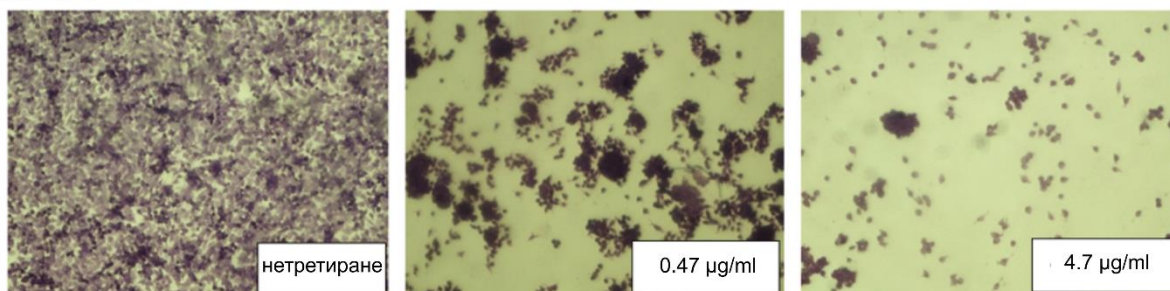
## MSC-PDL



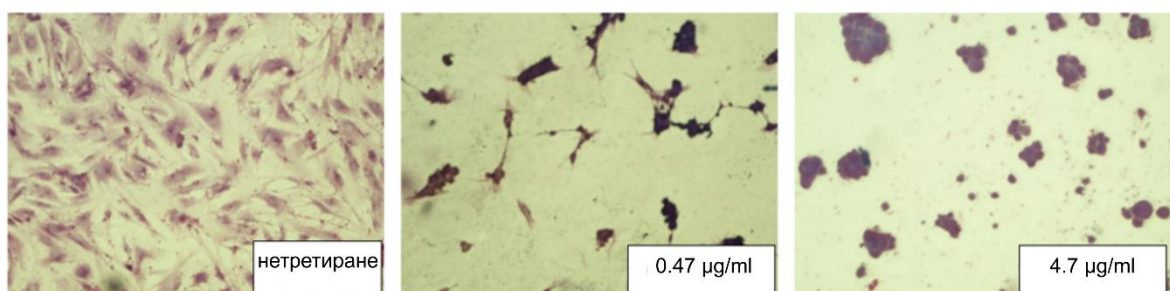
**Фигура 22. Морфолошке промене MRC-5 и MSC-PDL индуковане применом PS-MP/NP (HE бојење).** Ћелије изложене базалном медијуму без PS (контролна група). Ћелије изложене 0,47 µg/ml PS-MP/NP; уочена је кондензација једра и неправилни облици ћелија. Ћелије су изложене 4,7 µg/ml PS-MP/NP; ћелије су смежуране и показују знаке апоптозе.

*Giemsa* бојење је коришћено за визуелизацију апоптозе у MRC-5 и MSC-PDL ћелијама које су биле изложене третираним PS-MP/NP. Као што је приказано на слици XX, постојао је јасни хиперхроматизам једра, агрегација ивица и формирање тамно обојених апоптотичних тела у ћелијама које су третиране PS. Са повећањем концентрације честица PS-MP/NP (4,7 µg/ml), број ћелија, волумен и запремина ћелија су се евидентно смањили док се међућелијски простор повећао, при чему је било јасно уочљиво формирање апоптотичних тела (Фигура 23).

## MRC-5



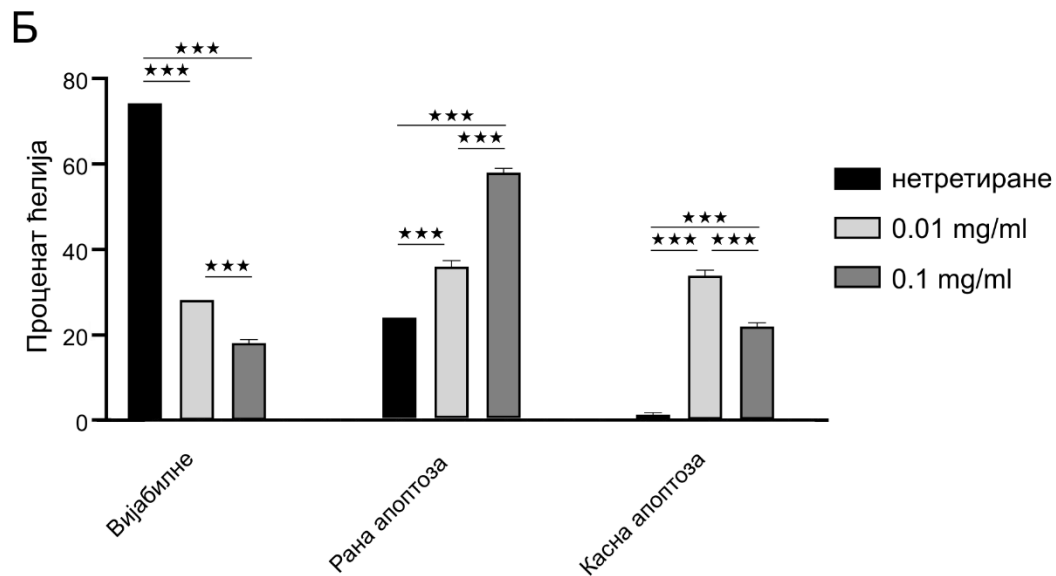
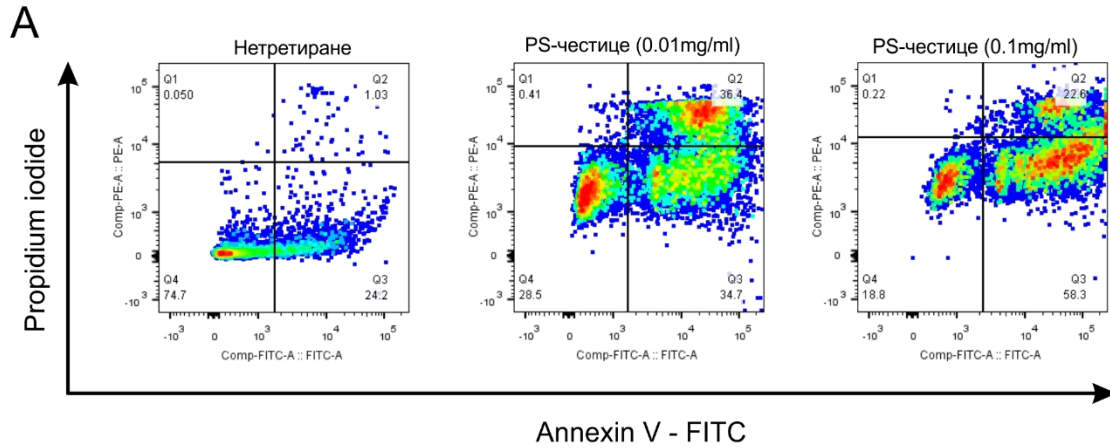
## MSC-PDL



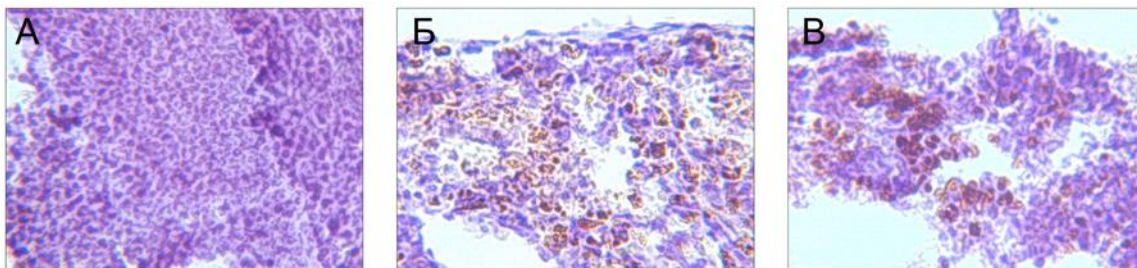
**Фигура 23.** Апоптоза MRC-5 и MSC-PDL ћелија изазвана PS-MP/NP и детектована *Giemsa* бојењем. Ћелије изложене базалном медијуму без PS честица (контролна група). Ћелије изложене PS-MP/NP у концентрацији 0,47 µg/ml и 4,7 µg/ml.

Апоптотска смрт ћелија слезине мишева изазвана PS честицама квантификована је двоструким бојењем са Annexin V/пропидијум јодидом (Фигура 24 А). Ћелије су третиране PS-MP/NP у концентрацији 0,01 mg/ml односно 0,1 mg/ml током 24 сата. Обе концентрације PS пластике значајно ( $p < 0,001$ ) су повећавале процентуалну заступљеност ћелија које су подлегле раној и касној апоптотској смрти у поређењу са нетретираним ћелијама (контрола) (Фигура 24 А). Највећи проценат ћелија у раној фази апоптозе је забележен након третмана PS честицама у концентрацији од 0,1 mg/ml, док је највећи проценат ћелија у касној апоптози уочен након третмана у концентрацији од 0,01 mg/ml (Фигура 24 Б).

Како би се испитала релевантност података добијених *in vitro* и потврдио проапоптотски ефекат PS-MP/NP *in vivo*, коришћен је TUNEL есеј за *in situ* детекцију фрагментације ДНК изазване апоптозом у ткиву слезине. Као што је показано на Фигура 25, повећан је степен фрагментације ДНК у обе третиране групе (црне стрелице). Наиме, женке и мужјаци мишева третирани PS-MP/NP имају више TUNEL позитивних ћелија него нетретиране животиње истог пола (Фигура 25).



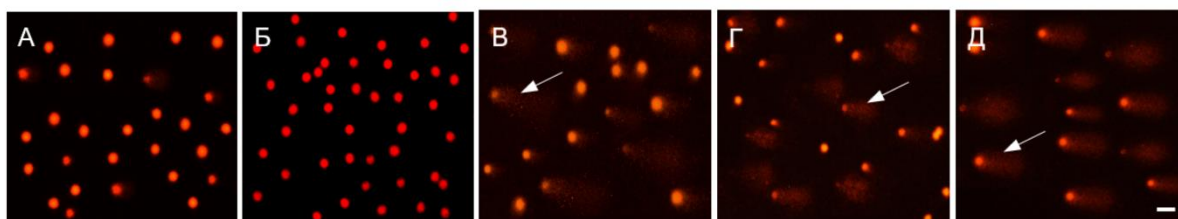
**Фигура 24. PS-MP/NP изазивају апоптотску смрт ћелија слезине.** (А) Репрезентативни дот плотови илуструју ћелије слезине после 24. часовног излагања PS-MP/NP у концентрацији 0,01 mg/ml и 0,1 mg/ml. Ћелије су обележене *Annexin*-ом V (*Ann V*) и пропидијум јодидом (енгл. *Propidium iodide*, PI) ( $Ann V^+ PI^-$  ћелије су у раној фази апоптозе,  $Ann V^+ PI^+$  ћелије су у касној фази апоптозе,  $Ann V^- PI^+$  су некротске ћелије). (Б) Проточном цитометријом је анализирана заступљеност ћелија у раној и касној фази апоптозе. Резултати су приказани као средња вредност  $\pm$  SEM за три независна експеримента.



**Фигура 25. PS-MP/NP изазивају апоптотску смрт ћелија слезине.** Репрезентативни исечци ткива слезине у којима се уочавају TUNEL-позитивне ћелије. TUNEL тест 35. дана експеримента на ткиву слезине **А)** нетретираних животиња, **Б)** женке третиране са 0,1 mg/миш/дан PS-MP/NP, **В)** мужјака третираног са 0,1 mg/миш/дан PS-MP/NP, (оригинално увећање 400X).

#### 4.6. ГЕНОТОКСИЧНИ ЕФЕКАТ ЧЕСТИЦА ПОЛИСТИРЕНА

Обзиром да се TUNEL тестом означава фрагментисана геномска ДНК, а да интензитет боје једарног бојења индиректно одражава степен фрагментације ДНК (50), у даљем току истраживања испитан је потенцијал PS-MP/NP да изазову оштећење ДНК комет тестом (Фигура 26).



**Фигура 26. Репрезентативне слике репа (беле стрелице) оштећене ДНК спленоцита (Комет тест).** (А) нетретиране ћелије, (Б) третиране са 0,01 mg/ml 2 PS-MP/NP, (Ц) третиране са 0,1 mg/ml PS-MP/NP, (Д) 10 mg/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- позитивна контрола, (Е) 0,5 mg/ml митомицин Ц-позитивна контрола. Scale bars = 50 mm.

Обе концентрације PS-MP/NP (0,01 mg/ml и 0,1 mg/ml) значајно су повећале GDI у ћелијама слезине ( $p < 0,001$ ) као и у лимфоцитима мишева након излагања у трајању од 24 сата, и то на дозно-завистан начин, у поређењу са негативним контролама (Табела 7 и табела 8). Док су контролне ћелије биле претежно овалног облика, код ћелија изложених PS-MP/NP уочено је формирање репа, што указује на оштећење ДНК које се повећавало са повећањем концентрације PS честица.



Табела 7. Третман мишијих спленоцита нанопластиком. Негативна и позитивна контрола (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и MMC).

Третман	Број ћелија	Класификација комета					GDI mean ± SD
		0 (<5%)	1 (5-20%)	2 (20-40%)	3 (40-95%)	4 (>95%)	
Негативна контрола	300	85.00	10.33	3.00	1	0.67	0.22 ± 0.04
Позитивна контрола H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10 µg/mL)	300	8.33	35.67	17.33	7	31.67	2.18 ± 0.07
Позитивна контрола MMC (0.5 µg/mL)	300	0.33	24.67	39.33	15.67	20	2.30 ± 0.09
PS-MP/NP conc. 0,47 mg/ml	300	48.33	36.33	11.33	2	2	0.73 ± 0.11***
PS-MP/NP conc. 4,7 mg/ml	300	0.67	24.00	50.00	13.67	11.67	2.12 ± 0.06***

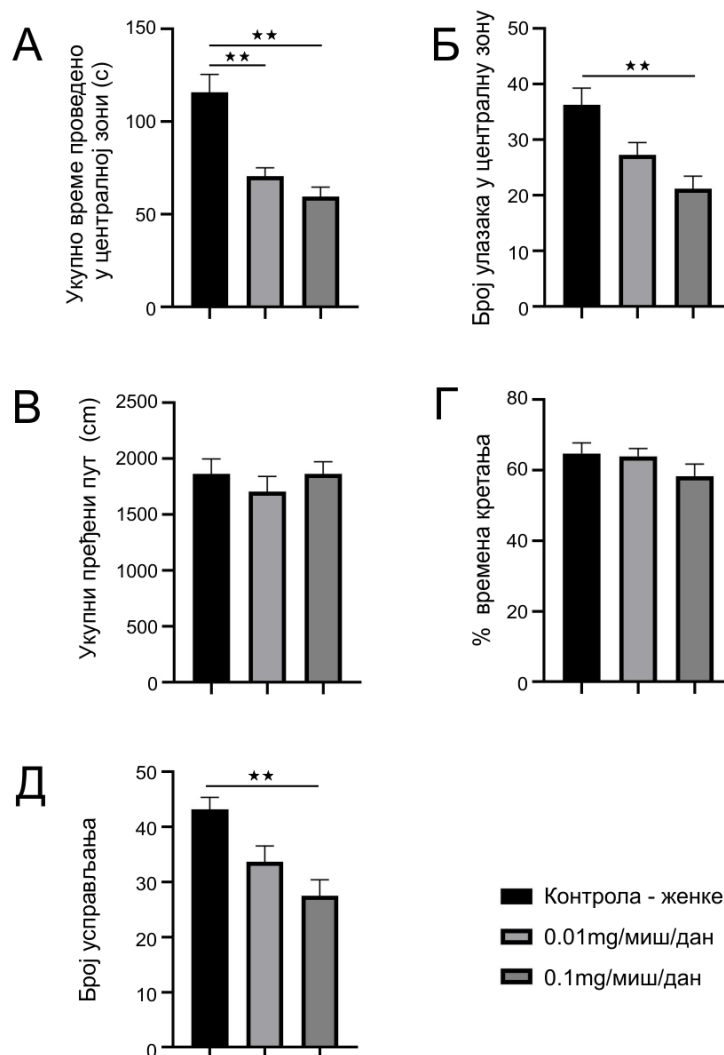
Табела 8. Третман лимфоцита периферне крви C57BL/6 WT мишева нанопластиком. Негативна и позитивна контрола (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и MMC).

Третман	Број ћелија	Класификација комета					GDI mean ± SD
		0 (<5%)	1 (5-20%)	2 (20-40%)	3 (40-95%)	4 (>95%)	
Негативна контрола	300	83.67	14.33	2.00	/	/	0.13 ± 0.02
Позитивна контрола H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10 µg/mL)	300	2.33	35.33	38.00	10.00	14.33	1.99 ± 0.10
Позитивна контрола MMC (0.5 µg/mL)	300	2.33	26.00	34.33	18.67	18.67	2.25 ± 0.04
PS-MP/NP conc. 0,47 mg/ml	300	55.33	35.00	11.00	2.33	0.33	0.65 ± 0.12*
PS-MP/NP conc. 4,7 mg/ml	300	/	12.33	43.00	18.33	26.33	2.59 ± 0.31***

\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , статистички значајна разлика у поређењу са негативном контролом (ANOVA).

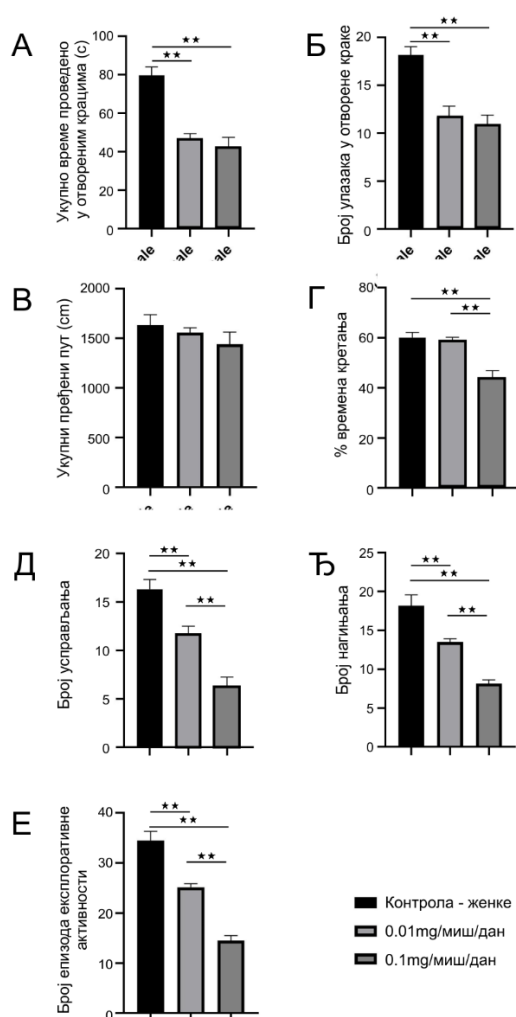
#### 4.7. ЧЕСТИЦЕ ПОЛИСТИРЕНА МОДУЛИРАЈУ НИВО АНКСИОЗНОСТИ КОД МИШЕВА

Обе примењене концентracије PS честица значајно су утицале на степен анксиозности код женки мишева, што је утврђено коришћењем директних индикатора анксиозности, УВЗЦ и БУЦЗ, у тесту отвореног поља ( $df=2$ ,  $F=19,130$  и  $9,226$ ); орална примена PS-MP/NP у дневној дози од  $0,1 \text{ mg/ml}$  довела је до значајног ( $p < 0,01$ ) смањења оба процењена параметра (Фигуре 27А и 27Б). Насупрот томе, дневни унос PS-MP/NP честица у нижој дози резултирао је значајним ( $p < 0,01$ ) смањењем само УВЗЦ (Фигура 27А). Иако без значајних промена у локомоторним индикаторима анксиозности у ОП тесту (УПП и % ВК) (Фигура 27В и 27Г,  $F=0,520$  и  $1,454$ ), експлоративна активност приказана као БУ у ОП тесту (Фигура 27Д) показала је анксиогени одговор изазван вишом дозом честица пластике ( $F=8,550$ ,  $p < 0,01$ ).



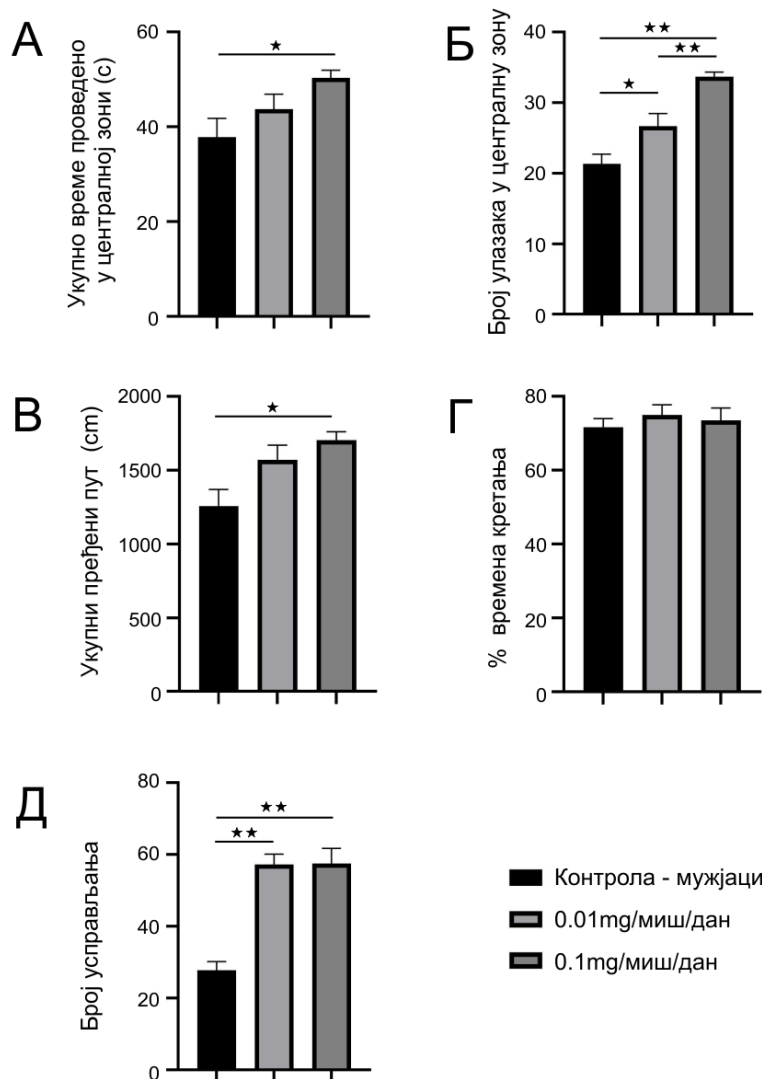
**Фигура 27.** Параметри добијени у тесту отвореног поља за женке мишева. Утицај PS-MP/NP на (А) укупно време проведено у централној зони; (Б) број улазака у централну зону; (В) укупни пређени пут; (Г) проценат времена кретања током трајања теста; (Д) број усправљања.\*означава  $p < 0,05$ , \*\* означава  $p < 0,01$ .

УКЛ тест, који је још осетљивији за процену анксиозности (Фигура 28), снажно је потврдио резултате ОП теста. Наиме, оба основна индикатора анксиозности, УВОК и БУОК (Фигура 28А и 28Б), значајно су смањена ( $p < 0,01$ ) након примењеног третмана код женки мишева ( $F=22,614$  и  $14,655$ ). За разлику од ОП теста, локомоторна активност анализирана УКЛ тестом је такође промењена уносом PS-MP/NP честица. Иако без значајне промене у УПП (Фигура 28В,  $F=0,992$ ), примена PS-MP/NP честица у дози од  $0,1 \text{ mg/ml/дан}$  значајно је смањила ( $p < 0,01$ ) % ВК третираних животиња у поређењу са контролним и са животињама које су примиле нижу дозу PS-MP/NP (Фигура 28Г,  $F=16,452$ ). Коначно, најизраженији анксиогени одговор на PS-MP/NP честице примећен је при процени експлоративне активности животиња УКЛ тестом (Фигура 28Д-Е), где су сва три испитивана параметра (број усправљања, нагињања и УЕА епизода) значајно смањени након петнедељне оралне примене PS-MP/NP честица ( $F=29,649$ ,  $31,663$  и  $60,970$ ). На исход примене PS-MP/NP честица значајно је утицала примењена доза.



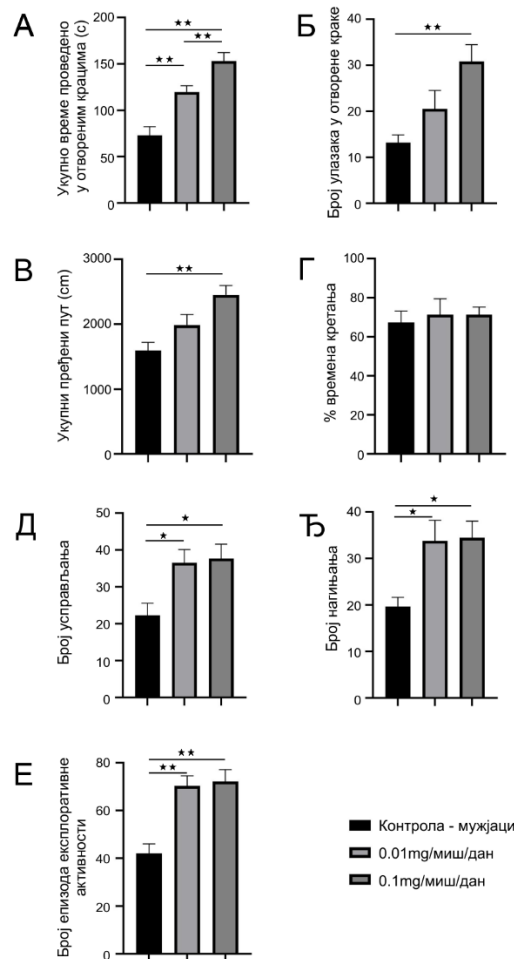
**Фигура 28.** Параметри добијени у тесту уздигнутог крстастог лавиринта за женке мишева. Утицај PS-MP/NP на (А) укупно време проведено у отвореним крацима; (Б) број улазака у отворене краке; (В) укупни пређени пут; (Г) проценат времена кретања током трајања теста; (Д) број усправљања; (Ђ) број нагињања; (Е) број епизода УЕА.\*означава  $p < 0,05$ , \*\* означава  $p < 0,01$ .

За разлику од женки мишева, мужјаци су показали анксиолитички одговор на третман PS-MP/NP у ОП тесту (**Фигура 29**). Већа доза PS честица повећала је УВЗЦ третираних мужјака у поређењу са контролном групом (**Фигура 29А**,  $F=4,028$ ,  $p < 0,05$ ). Анксиолитички ефекат PS честица био је још израженији анализирањем БУЦЗ (**Фигура 29Б**,  $F=20,496$ ) и показао је дозно-завистан ефекат ( $p < 0,01$ ), док је био нешто мање изражен у локомоторним индикаторима ОП теста, као што су УПП и % ВК (**Фигура 29В и 29Г**,  $F=6,030$  и  $0,325$ ), где је само већа доза PS честица изазвала повећање УПП ( $p < 0,05$ ) у поређењу са контролном групом мишева. Обе примењене дозе PS честица значајно ( $p < 0,01$ ) повећавају експлоративну активност у ОП тесту, изражену као БУ (**Фигура 29Д**,  $F=27.359$ ).



**Фигура 29.** Параметри добијени у тесту отвореног поља за мужјаке мишева. Утицај PS-MP/NP на (А) укупно време проведено у централној зони; (Б) број улазака у централну зону; (В) укупни пређени пут; (Г) проценат времена кретања током трајања теста; (Д) број усправљања.\*означава  $p < 0,05$ , \*\* означава  $p < 0,01$ .

Полне разлике у нивоу анксиозности су такође примећене применом УКЛ теста (**Фигура 30**). Директни показатељи анксиозности у УКЛ тесту, УВОК и БУОК, јасно су указали на анксиолитички ефекат полистиренских честица код мужјака мишева (**Фигура 30А и 30Б**,  $F=22.666$  и  $7.241$ ). Обе примењене дозе честица значајно су продужиле УВОК ( $p < 0,01$ ), са значајном ( $p < 0,05$ ) разликом у зависности од дозе, док је само већа доза имала значајан утицај на БУОК ( $p < 0,01$ ). Сличан исход након петонедељног оралног узимања PS честица уочен је у процени локомоторне активности у УКЛ тесту (**фигура 30В и 30Г**,  $F=8,811$  и  $0,139$ ), где је само већа доза PS честица имала анксиолитички ефекат, изражен повећањем УПП у поређењу са контролом групом ( $p < 0,01$ ), без значајне промене у % ВК код мужјака мишева. Као индиректни показатељ нивоа анксиозности у УКЛ, евалуација истраживачке активности изражена као БУ, БН и број епизода УЕА (**фигура 30Д-Е**) потврдила је претходно описан анксиолитички ефекат PS честица ( $F=5.510$ ,  $5.776$  и  $14.444$ ). Сви процењени индикатори експлоративне активности у отвореним и затвореним крацима УКЛ теста су били значајно повећани након примене обе дозе PS честица у поређењу са контролном групом ( $p < 0,05$ ), док је укупна експлоративна активност код мужјака мишева, такође била значајно повећана ( $p < 0,01$ ).

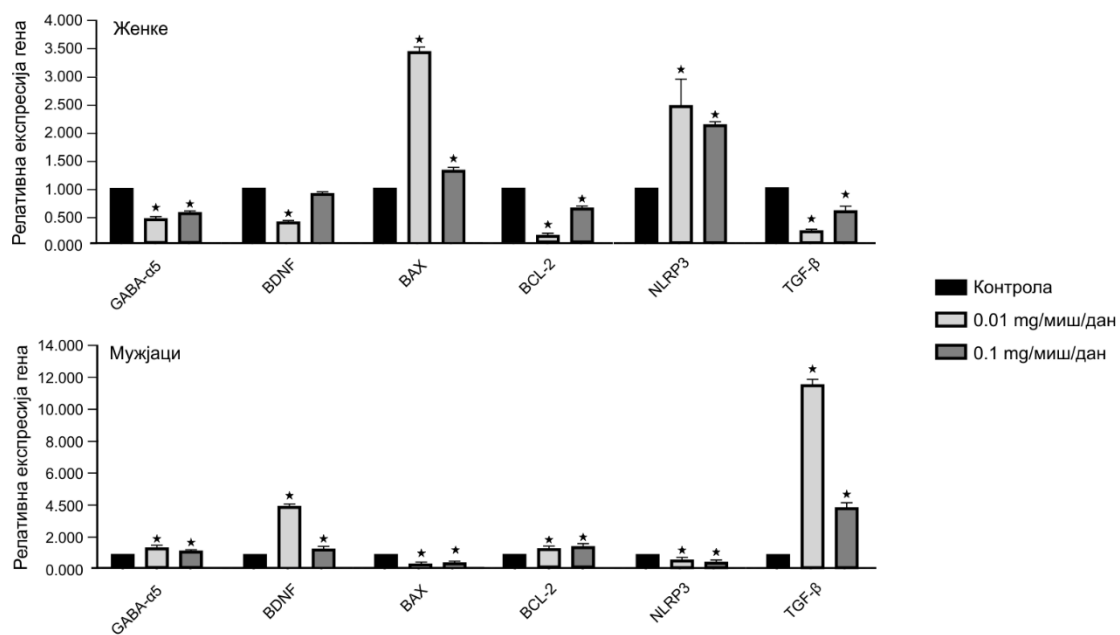


**Фигура 30.** Параметри добијени у у тесту уздигнутог крстастог лавиринта за мужјаке мишева. Утицај PS-MP/NP на (А) укупно време проведено у отвореним крацима; (Б) број улазака у отворене краке; (В) укупни пређени пут; (Г) проценат времена кретања током трајања теста; (Д) број усправљања; (Ђ) број нагињања; (Е) број епизода УЕА. \*означава  $p < 0,05$ , \*\* означава  $p < 0,01$ .

#### 4.8. АНАЛИЗА ЕКСПРЕСИЈЕ ГЕНА

У поређењу са контролним животињама, унос PS-MP/NP честица изазива промене у релативној експресији циљаних гена у анализираним узорцима хипокампуса женки (Фигура 27 А) и мужјака (Фигура 27 Б) експерименталних животиња.

На графикону се јасно може уочити да док је експресија *Gaba-a5*, *Bdnf*, *Bcl2* и *Tgf-β* смањена, експресија *Nlrp3* и *Bax* гена је била повећана ( $p < 0,05$ ) код женки третираних са обе концентрације PS-MP/NP (Фигура 31). Релативна експресије *Gaba-a5*, *Bdnf*, *Bcl2* и *Tgf-β* гена је била повећана ( $p < 0,05$ ) код мужјака који су оралним путем били изложени дејству PS-MP/NP у два дозама (Фигура 31). Међутим, унос PS-MP/NP је смањио експресију *Bax* и *Nlrp3* код третираних мужјака.



**Фигура 31. Релативна експресија различитих гена код женки и мужјака мишева након пероралног уноса PS-MP/NP у две концентрације 0,01 мг/дан и од 0,1 мг/дан. PS-MP/NP су индуковале већу експресију *BAX* и *NLRP3* код третираних женки и већу експресију *BDNF* и *TGF-β* код третираних мужјака у поређењу са контролама. Резултати експресије гена су представљени као промена у експресији иРНК у циљном узорку, нормализована према референтом гену и у односу на контролни узорак. Подаци су приказани као средња вредност  $\pm$  SEM,  $*p < 0,05$ .**

#### 4.9 ГЕНОТОКСИЧНИ ЕФЕКАТ PS-MP/NP НА ХУМАНИМ ЛИМФОЦИТИМ, MSC-PDL И MRC-5 ЋЕЛИЈСКИМ ЛИНИЈАМА

Обзиром да су PS-MP/NP показале генотоксични ефекат на спленоцима и лимфоцитима изолованим из анималног материјала, наша идеја је била да генотоксичност испитамо на хуманом материјалу. За ова испитивања користили смо лимфоците изоловане из крви здравих донора, као и комерцијалне линије хуманих феталних фибробласта плућа (MRC-5) и хуманих мезенхималних матичних ћелија периодонталног лигамента (MSC-PDL) (табела 9, табела 10 и табела 11).

Табела 9. Третман лимфоцита периферне крви здравих донора нанопластиком. Негативна и позитивна контрола (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и MMC).

Третман	Број ћелија	Класификација комета					GDI mean ± SD
		0 (<5%)	1 (5-20%)	2 (20-40%)	3 (40-95%)	4 (>95%)	
Негативна контрола	300	83.67	14.33	2.00	/	/	0.18 ± 0.03
Позитивна контрола H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10 µg/mL)	300	5.00	23.33	28.33	14.33	29.00	2.39 ± 0.03
Позитивна контрола MMC (0.5 µg/mL)	300	/	11.00	45.67	26.33	17.00	2.49 ± 0.08
PS-MP/NP conc. 0,47 mg/ml	300	45.67	40.67	12.33	1.00	0.33	0.70 ± 0.05***
PS-MP/NP conc. 4,7 mg/ml	300	/	18.00	47.00	16.33	18.67	2.36 ± 0.06***

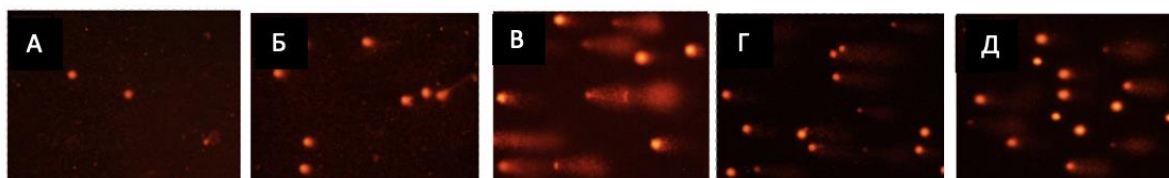
\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , статистички значајна разлика у поређењу са негативном контролом (ANOVA).

**Табела 10. Третман MRC-5 нанопластиком. Негативна и позитивна контрола (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и MMC).**

Третман	Број ћелија	Класификација Комета					GDI mean ± SD
		0 (<5%)	1 (5-20%)	2 (20-40%)	3 (40-95%)	4 (>95%)	
Негативна контрола	300	87.00	10.67	2.00	0.33	/	0.16 ± 0.01
Позитивна контрола H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10 µg/mL)	300	1.67	29.00	32.00	15.33	22.00	2.27 ± 0.09
Позитивна контрола MMC (0.5 µg/mL)	300	3.33	32.67	28.33	11.67	24.00	2.20 ± 0.08
PS-MP/NP conc. 0,47 mg/ml	300	53.00	26.00	16.33	2.67	2.00	0.75 ± 0.05***
PS-MP/NP conc. 4,7 mg/ml	300	6.00	26.33	34.67	13.67	19.33	2.14 ± 0.04***

\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , статистички значајна разлика у поређењу са негативном контролом (ANOVA).

PS-MP/NP су показале генотоксични ефекат на хуманим ћелијама MRC-5, значајно повећавајући GDI у обе концентрације (0,01 mg/ml и 0,1 mg/ml) у односу на негативну контролу (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ) аналогно третману на мишијим ћелијама.



**Фигура 32. Репрезентативне слике Комет теста на ћелијској линији MRC-5 након третмана нанопластиком. А) негативна контрола; Б) PS-MP/NP conc. 0.47 mg/ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; В) PS-MP/NP conc. 4,7 mg/ml; Г) позитивна контрола H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Д) позитивна контрола MMC.**



**Табела 11. Третман MSC-PDL нанопластиком. Негативна и позитивна контрола (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и MMC).**

Третман	Број хелија	Класификација комета					GDI mean ± SD
		0 (<5%)	1 (5-20%)	2 (20-40%)	3 (40-95%)	4 (>95%)	
Негативна контрола	300	86.00	10.33	3.00	0.67	/	0.18 ± 0.02
Позитивна контрола H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (10 µg/mL)	300	/	24.00	33.33	16.00	26.67	2.45 ± 0.17
Позитивна контрола MMC (0.5 µg/mL)	300	1.67	17.33	43.00	13.33	24.67	2.42 ± 0.03
PS-MP/NP conc. 0,47 mg/ml	300	40.67	41.00	13.67	3.67	1.00	0.83 ± 0.11***
PS-MP/NP conc. 4,7 mg/ml	300	/	/	/	/	/	/

\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , статистички значајна разлика у поређењу са негативном контролом (ANOVA).

## 5. ДИСКУСИЈА

Резултати ове студије показују да PS-MP/NP дате *per os* пролазе кроз дигестивни систем сисара, акумулирају се у различитим ткивима, утичу на хормонски и инфламаторни статус и понашање третираних експерименталних животиња.

PS-MP/NP су детектоване у киши, ваздуху, земљи, снегу, соли, води из славине и флашираној води, пиву, чају, меду, шаргарепи, зеленој салати, кромпиру, броколију, јабукама, крушкама, риби (51,52,53,54,55,56,57), а кроз ланац исхране честице пластике продиру у живе организме (58,14) укључујући и људе (59,60,61). Због широке примене, полистирен међу пластичним масама предстаља једног од главних загађивача животне средине (14,37). Додатна изложеност PS-MP/NP настаје приликом контакта са вештачким бојама и грађевинским материјалом, материјалом за изолацију, гуменим подовима, као и током рада неких 3Д штампача или током тетовирања (62,63,64,65,66). Запањујуће је да се полистирен налази као компонента педијатријског лека за оралну примену, содијум- PS-сулфоната, који се користи за лечење високог нивоа калијума (67).

Услед доказа о све већој акумулацији PS-MP/NP у организму водених животиња рађена су паралелна истраживања на копненим сисарима. Неколико недавних студија је показало да се PS-MP/NP акумулирају у различитим органима глодара (13,68,69). Зато што најмање честице показују највећу акумулацију, унос наночестица кроз дигестивни тракт и њихова даља акумулација захтевају даља истраживања како би се дошло до нових сазнања о њиховој акумулацији, и евентуалном утицају на понашање.

У овој студији показано је да након оралног узимања PS-MP/NP величине 200 nm и 40 nm агрегирају у лумену црева третираних мишева, што је у складу са претходним студијама. Зна се да PS-MP/NP изазивају промене цревне микробиоте (70), дакле могуће је да дуже задржавање PS-MP/NP у лумену црева може изазвати комбиноване токсичне ефекте, као нпр. оксидативни стрес, инфламацију и метаболичке поремећаје. Такође је показано да PS-MP/NP продиру и у друга ткива након акумулације у дигестивном тракту. Мада механизам још увек није разјашњен, приказани резултати подржавају хипотезу да PS-MP/NP продиру кроз епителну баријеру црева и транспортују се у друга ткива кроз систем за циркулацију. Недавно је показано, коришћењем плурипотентних матичних ћелија и преимплантационих људских ембриона да флуоресцентне PS-MP/NP величине 200 и 40 nm улазе у ћелије и формирају агрегате и хетероагрегате (71). У овој дисертацији, су коришћењем кохлеарних експланата као додатних *in vitro* система, испитане последице интеракције PS-MP/NP са ћелијама унутрашњег уха, и такође детектовани агрегати и хетероагрегати PS честица у сензорним слушним ћелијама са длачицама. Кохлеарни експлант служи као важан експериментални модел у истраживању слуха (42) јер представља 3D културу која омогућава олакшану евалуацију ћелијског одговора на експериментални третман (43).

Конфокалном микроскопијом полистиренске честице су уочене у везивном ткиву које окружује семиниферне каналиће (*lat. tubuli seminiferi*), који укључују ендокрине (Лејдигове) ћелије. Чак и после кратког излагања, честице PS се акумулирају у тестисима мишева изазивајући инфламацију, смањење квалитета сперме и смањење нивоа тестостерона (72) што би могло бити узроковано смањењем активности ензима, сукцинат дехидрогеназе (SDH) и лактат дехидрогеназе (LDH) одговорних за метаболизам сперме (73,74,75,76). Тестостерон, најважнији андроген код мушкараца, игра важну улогу у сперматогенези. Смањен ниво тестостерона је у снажној корелацији са функционалним оштећењем у тестисима и Лејдиговим ћелијама. Тестостерон

синтетишу и луче Лејдигове ћелије. Лутеинизирајући хормон (LH), који ослобађа предњи режањ хипофизе, везује се за LH рецептор (LHR) који се налази на мембрани Лејдигових ћелија, што доводи до повећаног нивоа cAMP. То узоркује активацију протеин киназе А (PKA) и повећање нивоа стероидогеног акутног регулаторног протеина (енгл. *steroidogenic acute regulatory protein*, StAR) и стероид синтазе (P450<sub>scc</sub>, P450<sub>c17</sub>, 3β-HSD, 17β-HSD). Деловањем StAR, слободни холестерол у цитоплазми се транспортује од спољашње мембране митохондрија ка унутрашњој мембрани. P450<sub>scc</sub> конвертује холестерол у прегненолон. Прегненолон секвенцијално улази у ендоплазматски ретикулум, где га P450<sub>c17</sub>, 3β-HSD и 17β-HSD претварају у тестостерон (77). У недавно објављеној студији је показано да перорална примена PS-MP величине 0.5 μm, 4 μm, and 10 μm у трајању од 180 дана у концентрацији 100 μg/L и 1000 μg/L узоркује репродуктивну токсичност код мужјака мишева. Експресија LHR, стероидних ензима и StAR је била значајно смањена код третираних животиња, и зависила је од примењене концентрације полистиренских партикула. Иста група аутора је потврдила да PS-MP смањују експресију StAR инхибирајући активацију AC/cAMP/PKA сигналног пута (77). Поред тога, прекомерна експресија LHR је ублажила смањење нивоа StAR, стероидних ензима и смањење тестостерона изазвано PS-MP, што је потврдило механизам токсичног деловања полистирена на полне жлезде сисара. Неколико студија је показало PS партикуле изазивају оксидативни стрес не само повећањем нивоа ROS и LPO већ и смањењем антиоксидативних ензима (CAT, SOD, POD) (78). Примећено је и да је профил липида поремећен, као и да је смањен укупни садржај протеина код третираних организама. PS значајно смањује експресију стероидних ензима и концентрацију полних хормона, што за последицу има смањен број, покретљивост и виталност сперматозоида. Поред тога, уочене су и значајне хистопатолошке промене у ткивима тестиса, које указују да PS индукују програмирану ћелијску смрт апоптозом. Све наведено, за последицу има антиандрогени ефекат PS партикула и дисфункцију тестиса код пацова. Поремећај производње андрогена може бити специфично узрокован директним деловањем PS-MP/NP, а резултати ове дисертације указују да корелацију између хормонске неравнотеже и функција имунског система не треба занемарити.

Због велике површине и специфичних карактеристика, PS-MP/NP испољавају имуномодулаторно дејство и промовишу стварање слободних кисеоничних радикала. Неколико недавно објављених студија истраживало је имуномодулаторне ефекте PS партикула различитих величина, међутим тачан механизам њиховог деловања није разјашњен. Добро је познато да полистирен има изражен негативан утицај на имунски систем водених животиња. *Bergami* и сарадници су показали да PS-NP утичу на урођени имунски одговор антарктичког морског јежа *Sterechinus neumayeri*. PS-NP значајно смањују фагоцитни капацитет и изазвају инфламаторни одговор, оксидативни стрес и индукују апоптозу код третираних животиња (79). *In vitro* тестови функције неутрофилних гранулоцита су коришћени да би се проценио ефекат PS-NP концентрације 0,1 μg/μl на имунски систем слатководних риба, модела који се често користи за токсиколошка испитивања. Излагање неутрофила PS честицама изазвало је значајно повећање оксидативне активности и индукцију оксидативног праска неутрофила, ослобађање примарних гранула и испуштање екстрацелуларне неутрофилне мреже (енгл. *neutrophil extracellular traps*, NETs), потврђујући да полистирен испољава проинфламаторну активност и омета имуни систем (80). Осим тога, чак и током краткотрајне култивације, аминок-модификоване PS-NP изазвале су значајно смањење стабилности лизозомске мембране зависно од концентрације и дужине трајања третмана, као и нуклеарне промене сличне апоптози у фагоцитима медитеранског морског јежа *Paracentrotus lividus* (81).

Досадашња истраживања углавном су била фокусирана на водену средину, а постоји само неколико студија које испитују штетне ефекте PS-MP/NP на имунски систем копнених животиња и људи. Показано је да се PS-NP ( $\leq 200$  nm) интракутано убризгане у задњу ногу миша брзо дренирају у лимфни чвор где их преузимају резидентне дендритске ћелије и макрофаги (82). Имунске ћелије преузимају наночестице фагоцитозом путем специфичне интеракције са рецептором CD64, који је специфично експримиран на њиховој површини (15). Макрофаги као компоненте урођеног имунског система су одговорни за разградњу страних материја укључујући наночестице, као и за секрецију цитокина и презентацију антигена Т лимфоцитима, делујући на тај начин као веза између урођеног и адаптивног имунског одговора. Макрофаги се могу трансформисати у класично активирани (M1) макрофаге, који су проинфламаторни, или алтернативно активирани (M2) макрофаге, који су антиинфламаторни. Дакле, равнотежа M1/M2 је кључна за одржавање хомеостазе ткива. Показано је да PS-NP не утичу на вијабилност хуманих макрофага нити на експресију M1 маркера CD86, NOS2, TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  (83). Међутим, у M2 макрофагима, полистиренске партикуле су утицале на експресију рецептора CD163 и CD200R, као и на продукцију IL-10 (83). Иста група истраживача је показала да аминокиселинске PS-NP инхибирају фагоцитозу бактерије *Escherichia coli* од стране оба типа макрофага, M1 и M2 (83). PS-NP модификоване на карбоксилном крају нису утицале на фагоцитозу M2, али су повећале секрецију TGF- $\beta$ 1 од стране M1 и нивое АТФ-а у M2 макрофагима (83). Подаци јасно указују да честице полистирена модулирају урођени имунски одговор промовишући поларизацију људских макрофага од алтернативно активираних (M2) до проинфламаторних (M1) макрофага, без утицаја на (M1) маркере (83). Штавише, PS стимулишу имунски одговор промовисањем ћелијског имунитета обзиром да имају значајан утицај на експресију проинфламаторних гена, укључујући IL-8 и IL-6 (14, 84).

Ендоцитоза је основна функција макрофага којом се остварује уништавање и накнадна деградација ингестираних микроба или алогених материјала. *Xia* и сарадници су открили да PS-NP дијаметра 30 nm интернализоване у ендозом макрофага, спречавају рециклирање ендозома назад на површину ћелије и тиме спречава деобу ћелије на две ћерке ћелије (85). Дакле, поред њихове способности да модулирају фенотип и функцију макрофага без директног токсичног ефекта, PS-NP могу индуковати и формирање генетски нестабилних бинуклеарних макрофага.

Нанопластика има нарочито велики утицај на неутрофиле, имајући у виду њихову фагоцитну улогу, и деловање на првој линији одбране од потенцијално токсичних агенаса. Интратрахеална апликација дијаметра PS-NP 64 nm значајно је повећала инфлукс неутрофила у плућа пацова и повећала параметре запаљења плућа у бронхоалвеоларном аспирату, као што је активност лактат дехидрогеназе (86). У складу са резултатима добијеним *in vivo*, када је хумана ћелијска линија плућа A549 третирана са PS-NP, примећено је значајно повећање производње IL-8, као и већа оксидациона активност (86). *Forte* и сарадници су испитали утицај PS-NP на продукцију цитокина важних у патогенези обољења гастроинтестиналног тракта (84). Показано је да PS-NP утичу на експресију гена који кодирају проинфламаторне цитокине укључујући IL-8 и IL-6 у ћелијама хуманог аденокарцинома желуца (84).

Код зебрица (енгл. *Zebrafish*; lat.: *Danio rerio*), PS-MP/NP узрокују значајне промене у микробиоти црева и метаболичком профилу ткива, а све ове промене повезане су са инфламацијом (87). Такође, примећена је повећана експресија гена за IL-8 код пацова након излагања ваздуху у коме су биле присутне PS честице различитих величина (88). У складу са овим, показано је да PS-MP/NP изазивају имунски одговор промоцијом

ћелијског имунитета. Подаци ове студије показују да је имуностимулативни ефекат PS-MP/NP *in vivo* праћен повећаном секрецијом проинфламаторних IL-12p35 и IL-23 и смањеним присуством CD3+ ћелија које секретују антиинфламаторни IL-10 у слезини мишева третираних PS-MP/NP. Ови резултати су у складу са резултатима претходних студија које показују да су PS честице потенцијални имунолошки стимуланси који повећавају TNF- $\alpha$  и IL-6 (41).

Након резултата конфокалне микроскопије којом је забележена многа мања аутофлуоресценција у слезини мишева третираних са PS-MP/NP у поређењу са нетретираним животињама, показано је да PS-MP/NP имају цитотоксичне ефекте на ћелије слезине. Међутим највећи проценат ћелија у касној апоптози примећен је након третмана PS честицама у концентрацији од 0.01 mg/ml, што потврђује претпоставку да PS честице имају цитотоксични ефекат који зависи од величине честица, облика и њихове концентрације (89,90). Насупрот томе, ниже концентрације имају већу цитотоксичност од виших концентрација (90). Такође, потврдили смо на основу кинетике нормализованог ћелијског индекса (NCI) да ефекат PS-MP/NP зависи и од дозе и времена.

Као што је раније поменуто, присуство PS-MP/NP такође повећава производњу ROS (енгл. *Reactive Oxygen Species*), који се сматрају индикаторима ћелијског стреса. Неколико студија је допринело бољем разумевању цитотоксичности нанопластике на нивоу ћелије у смислу оксидативног стреса (испитивањем утицаја на продукцију реактивних врста кисеоника) и вијабилности нервних и епителних ћелија човека (91). Због повећане генерације ROS и стреса ендоплазматског ретикулума, PS-MP/NP индукују аутофагију мишјих макрофага (ћелијска линија RAW 264.7) и хуманог епитела плућа (ћелијска линија BEAS-2B), активацијом AMPK/Akt/mTOR сигналног пута (92,93). Наночестице полистирена активирају јонске канале у ћелијама плућног паренхима човека. Примена PS-NP величине 20 nm изазвала је активацију базолатералних K<sup>+</sup> канала и стимулирала секрецију јона Cl<sup>-</sup> и HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Ови налази указују да наночестице полистирена могу имати способност да утичу на функцију епителних ћелија и физиолошке процесе. Такође, монодисперзне PS партикуле величине 500 nm стимулишу стварање супероксид анјон радикала (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) у хуманим ћелијама јетре (94). Дакле, разумевање могућег ћелијског и молекуларног механизма одговорног за штетне ефекте PS-NP на имунске ћелије и оксидативну равнотежу *in vivo* је од кључне важности за проналажење најбољег приступа за смањење или потпуно укидање штетних ефеката полистиренске пластике на људско здравље.

Истраживања у нанотоксикологији су показала да наночестице титанијум диоксида могу изазвати индиректно оштећење стварањем ROS, а такође могу директно да интерагују са ДНК и да изазову њено оштећење (95). Међутим, механизам који лежи у основи генотоксичних ефеката микрочестица полимера пластике, посебно PS, није потпуно јасан. За разлику од хемијских једињења која продиру у ћелију и директно или индиректно покрећу процесе уништавања генома, PS-MP су хемијски инертне, што значајно отежава интерпретацију добијених резултата. Већина истраживача, објашњавајући разлоге могућег генотоксичног ефекта микропластике, скренула је пажњу на способност таквих честица да индукују повећано стварање ROS у ћелији, изазивајући тако оксидативни стрес. Активација антиоксидативног система је пронађена у моделским експериментима који испитују ефекте микропластике на воденим организама. Сматра се да су високо реактивни радикали главни узрок оксидативног оштећења и прекида ланаца молекула ДНК (96).

Генотоксични ефекти микрочестица пластике су испитани углавном на морским бескичмењацима. Прве доказе о генотоксичности пластичних микрочестица пружиле су експерименталне студије на морским шкољкама. Резултати Комет теста на хемоцитима дагњи *Mytilus galloprovincialis* и *Scrobicularia plana* показали су повећан број прекида ДНК ланаца након третмана микрочестицама пластике (PS и PE) (97). Интересантно је и то да је уочен двофазни одговор ДНК на дејство PS-MP: после 7 дана третмана, примећено је смањење оштећења ДНК, у поређењу са контролом, али се оштећење ДНК драматично повећало након 26 дана излагања (98). Оштећење ДНК морских организама индуковано свакодневном изложеношћу мешавини честица пластике (PS, PE, PP) је у неколико студија потврђено као промена дужине репа комете у односу на контролу. Сун и сарадници (99) су сумирали доступне податке у литератури и пружили убедљиве доказе, засноване на мета-анализи, да микрочестице пластике у еколошки реалним концентрацијама (<1 mg/L, средња вредност ~0.5 mg/L) показују значајна генотоксична својства при интеракцији са воденим организмима. Ово је било јасно не само на основу комет методе, већ и из повећања броја микронуклеуса.

Резултати ове докторске дисертације по први пут показују генотоксични ефекат полистиренских честица микро- (200 nm) односно нано-метарске величине (40 nm) на ћелијама сисара. Обзиром да је генотоксичност критичан фактор у процени наночестица, коришћен је Комет тест, који се широко користи у екотоксиколошким студијама као осетљив алат за процену оштећења ДНК у појединачним еукариотским ћелијама. Сматра се да је овај молекуларни приступ 35 до 50 пута осетљивији од било ког биомаркера који се користи за процену степена токсичности на нивоу организма (као што је вијабилност, репродукција и раст). Показано је да PS-MP/NP индукују оштећења ДНК ћелија анималног порекла (спленоцита изолованих из слезине миша, лимфоцита изолованих из периферне крви мишева), али је потврђено и оштећење ДНК хуманих ћелија: феталних фибробласта плућа (MRC-5), хуманих мезенхималних матичних ћелија периодонталног лигамента (MSC-PDL), лимфоцита изолованих из хумане периферне крви, при чему су све ћелијске линије третиране са PS-MP/NP у две концентрације. *In vitro* експерименти у којима је испитана интеракција између PS-MP/NP и хуманих ћелија, су спроведени у контролисаним лабораторијским условима где је изложеност другим истовременим стресорима сведен на минимум. Коришћене су концентрације PS-MP/NP које се могу сматрати екотоксиколошки релевантним (0,01 mg/ml и 0,1 mg/ml), обзиром да су измерене у локацијама светских океана. Овај приступ и спровођење акутних експеримената, идентификовао је најугроженије ћелијске структуре укључујући молекул ДНК, и тиме показао један од механизма токсичности PS-MP/NP. Применом ТЕМ, у овом раду је такође, по први пут показана пенетрација PS честица у ћелијама сисара и и акумулација у ендозомским везикулама (**Фигура 17**, **Фигура 33**), што додатно расветљава механизам њиховог генотоксичног и цитотоксичног деловања, односно указује на могуће директно штетно дејство полистиренске пластике на људско здравље.



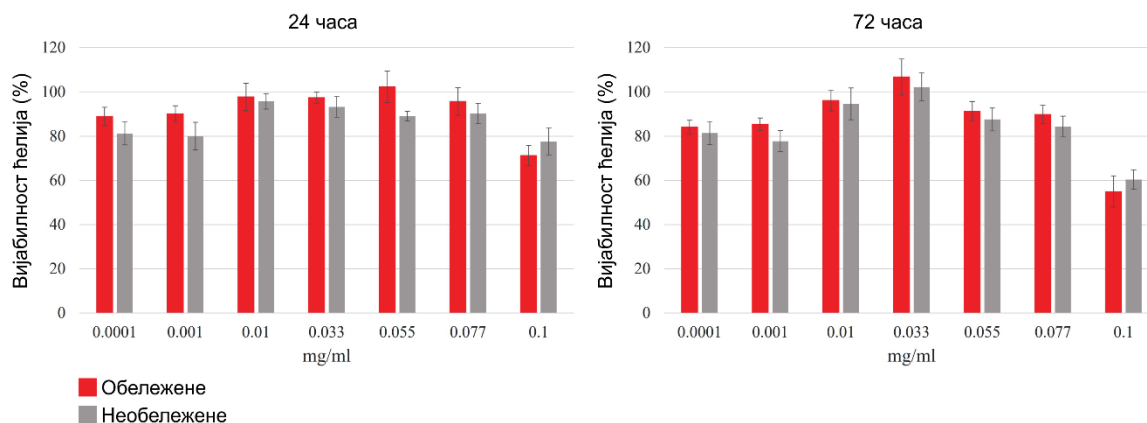
**Фигура 33. Испитивање биотоксичности полистиренских микро- и нано-честица *in vivo* и *in vitro*.**

PS честице коришћене у истраживању су изабране на основу различитих параметара као што су: величина, (не)токсичност флуоресцентне боје, инертност у односу на биомакромолекуле и друге мале молекуле, могућност интернализације у ћелије. Из тог разлога изабране су *Invitrogen's Fluorophores*®. Произвођач је обезбедио техничку документацију (информације о производу, MP 05001, издање из 2004. и ревидирано 2005.) која потврђује подобност одабраних PS честица на основу већ наведених параметара. Специфична метода обележавања честица подразумева да је флуоресцентна боја уграђена у микросфере, а није закачена за њихову површину. У том смилу, могућа токсичност боје може се сматрати минималном, ако је уопште и има. Према упутству произвођача одабране карбоксил модификоване PS честице имају на својој површини велику густину карбоксилних киселина које могућност неспецифичних реакција свODE на минимум. Међутим, пошто произвођач није у потпуности искључио могућност неспецифичних интеракција, поред МТТ теста, урађена је и анализа ћелија у реалном времену помоћу *xCelligence* система. Последњи, не најмање важан фактор у избору PS честица је могућност интернализације у ћелије. У том смислу, постоје радови других аутора који тврде да PSNP *Fluorophores*® величине 40nm улазе у ћелију након третмана у трајању од 4 сата (100), док интернализација честица дијаметра од 200 nm до 500nm захтева трајање третмана дуже од 24 h, након чега се полистирен може се претежно наћи у лизозомима у нефагоцитним ћелијама. Предложени механизам интернализације у овој и сличним студијама је ендцитоза (путеви зависни или независни путеви од кларитина). Сличан механизам помињу Рејман и сарадници (101). Да би се потврдило да PS-MP величине 200 nm улазе у ћелију користили смо трансмисиону електронску микроскопију.

Што се тиче могуће токсичности боја уграђених у PS-MP/NP, за PS-NP величине 40 nm коришћена боја је Тексас црвена (енгл. *Texas red*), док је за PS-MP величине 200 nm коришћена боја FITC. Показано је да FITC није токсична боја, док одређене студије показују да FITC боја показује одређену токсичност, али у дозама које далеко превазилазе концентрацију у *Fluorophores*®-у. Исти аутор такође тврди да не постоје прецизни подаци о токсичности за *Texas red*, али да је познато да она може да интерагује са другим макромолекулама, нарочито протеинима и потпуно или делимично инактивира њихову нативну функцију. Обзиром да су боје за обележавање уграђене у PS-MP/NP, према упутствима произвођача, оне не излазе из PS честица, па је стога концентрација слободних молекула боје занемарљива. С тим у вези, а на основу литерарних података, мало је вероватно да ће *Texas red* уграђена у PS-NP од 40 nm бити значајно способна да се отпусти, ступи у реакцију са протеинима и изазове цитотоксичност која може да се пореди са оном коју изазивају само PS-NP. Слично томе, FITC боја уграђена у PS-MP величине 200 nm тешко се може ослободити у концентрацији која би показала цитотоксичност упоредиву са самим PS-MP.

Обзиром да не постоје значајне студије о токсичности *Texas red*, процењена је токсичност необележених PS-NP од 40 nm, ради поређења са цитотоксичношћу обележених PS-NP. Тест је изведен на спленоцитима миша, МТТ методом и добијени резултати вијабилности ћелија су веома слични резултатима који су добијени на спленоцитима третираним обележеним PS-NP од 40 nm (Фигура 34). С тим у вези, а у

складу са литерарним подацима, хипотезама ове студије и експерименталним подацима, дошло се до закључка да боје које су примењене за обележавање PS-MP/NP коришћених у овој дисертацији, немају статистички значајан утицај на укупан цитотоксични ефекат PS-MP/NP.

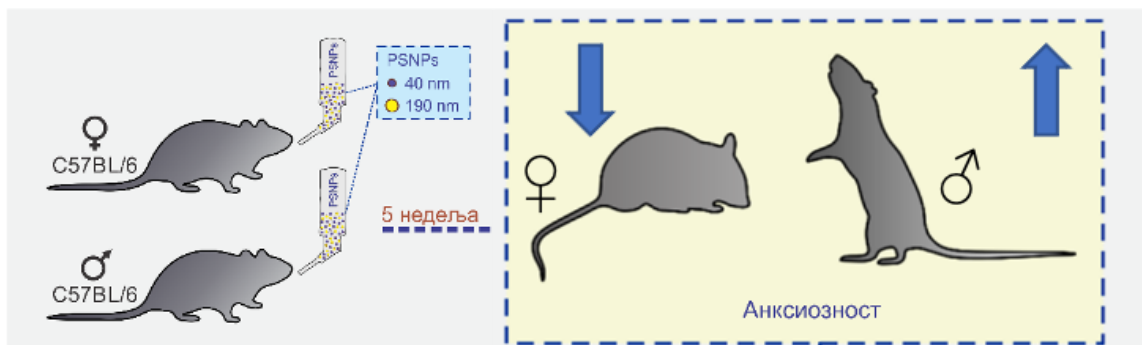


**Фигура 34. МТТ-тест.** Вијабилност спленocyта након третмана PS-MP/NP обележеним *Texas red* и FITC бојом, односно необележеним PS-MP/NP, у трајању од 24 и 72 сата.

Један од најинтригантнијих налаза у овој студији су промене у понашању мишева након примене PS-MP/NP *per os*. Познато је да PS честице могу да продру кроз крвно-мождану баријеру изазивајући промене у понашању и морфолошке промене код ваљкастих црва (102), риба (103) и ларви свилене бубе (104). Акумулација флуоресцентних PS честица од 5 и 20 nm у јетри, бубрезима и цревима миша након оралне примене изазвала је оксидативни стрес, поремећај енергетске равнотеже и неуротоксичност (105).

У овој студији, такође су испитивани основни механизми анксиогеног одговора на PS-MP/NP код мужјака мишева, коју су показали супротан одговор код женки мишева, након оралног узимања PS честица (Фигура 35). Ефекат честица пластике је зависио од пола, вероватно због разлике у нивоима хормона и недостатка физиолошког анксиогеног одговора на виши ниво тестостерона код женки мишева (106). Контрадикторни и неочекивани исходи понашања могу се приписати специфичној акумулацији PS честица у тестисима мужјака. Осим тога, значајна акумулација PS-MP/NP у ткиву тестиса узроковала је и значајан пад нивоа тестостерона у серуму (107). Према претходним резултатима која указују на анксиогени одговор на повећан ниво тестостерона код мужјака пацова, такав хормонални поремећај (108) може бити посредован нисходном регулацијом хипокампаљних андрогених рецептора са последичним падом GABA-ергијског садржаја (109), који се манифестује као анксиолитички ефекат унетих наночестица код мужјака мишева. Такође, показано је да код *C. Elegans* излагање PS честицама доводи до оштећења GABAергичних и холинергичких неурона (110).





**Фигура 35. Честице полистирена утичу на ниво анксиозности код мишева.**

Додатно објашњење за полне разлике у понашању третираних мишева може бити и значајан поремећај цитокинског профила, који се карактерише повећаним нивоима проинфламацијских цитокина и истовременим падом антиинфламацијских цитокина (41). Поремећај равнотеже цитокина хипокампуса у складу је са променом маркера апоптозе, као што је раније објављено (41). Дакле продужени унос PS-MP/NP праћен је повећањем релативне експресије про-апоптотичких гена и смањеном експресијом анти-апоптотичких маркера. У овој студији, про-апоптотичко дејство PS-MP/NP у хипокампалном ткиву је такође праћено значајним падом релативне генске експресије BDNF код женки мишева, што одговара негативној колерацији између апоптозе и BDNF у неуронима стијатума (111). Штавише, уочене промене у цитокинима хипокампуса могуће да су узроковале смањење BDNF у централном нервном систему, пошто је раније објављено да IL-6 и TNF- $\alpha$  смањују нивое BDNF у  $\beta$ -амилоидном моделу Алцхајмерове болести (111,112). Пад релативне експресије гена хипокампалног BDNF-а поклопио се смањењем GABA-A рецептора у хипокампусу женки мишева. Уочени одговор на PS-MP/NP у виду снижене експресије GABA-A рецептора је у складу са претходним студијама у којима је показано да је BDNF неопходан за правилан развој и опстанак GABAергичких неурона (113), као и да је GABAергични систем у мозгу регулисан путем BDNF/*Tropomyosin-related kinase B* (114). Стога, смањена релативна експресија гена GABA-AR у хипокампусу може посредовати у уоченом анксиогеном одговору на продужени унос PS-MP/NP јер активација GABAергијског система, преко (углавном) постсинаптичких GABA-A рецептора, доводи до инхибиционих постсинаптичких потенцијала (115) у хипокампусу (116) и последично утиче на ниво анксиозности (117,118).

Коначно, изложеност PS-MP/NP може да изазове оксидативни стрес, што може довести до оштећења ћелија и повећане осетљивости на развој неуронских поремећаја. Поред тога може доћи до инхибиције ацетилхолинестеразе и промене нивоа неуротрансмитера што доприноси променама у понашању (119). Жене са повишеним фталатима у урину (који се углавном користе као пластификатори), имају већу вероватноћу да развију постпорођајну депресију (120). Деца чије су мајке такође изложене фталатима током трудноће имају већу вероватноћу за успорен ментални и моторни развој и промене понашања (121). Дечаци који су пренатално изложени бисфенолу-А (BPA), индустријској хемикалији која се користила за прављење одређене пластике, имају већу вероватноћу да развију симптоме анксиозности и депресије (122). У *in vitro* условима, и мушки и женски кортикални неурони (мишији, пацовски и људски) осетљиви су на

дејство бисфенола-А (BPA), међутим, женски су подложнији токсичности хемикалије (123). У овој студији, у узорцима хипокампуса женки мишева третираних са PS-MP/NP примећено је смањење експресије *Tgf- $\beta$*  рецептора и *Bcl2* гена и повећана експресија гена *Bax* и *Nlrp3*, што указује на про-апоптотички и про-инфламаторни ефекат PS-MP/NP. Ако се овим резултатима дода смањена генска експресија *Bdnf* и *Gaba*, последица ових промена у експресији гена може бити анксиозност коју су тестови понашања потврдили.

Резултати добијени у овој докторској дисертацији би требало снажно да мотивишу будућа истраживања која би се бавила заштитом животне средине од загађења пластиком. Наиме, потребно је јасно дефинисати како загађење пластиком мења функцију ћелија, ткива и органа и последично утиче на здравље људи кроз систематско дефинисање облика, величине, концентрације, дужине излагања и других карактеристика MP/NP. Ова студија, такође, иницира нова *in vitro* и *in vivo* истраживања, на експлантима ткива, органоидима и другим животињским моделима, са циљем да се јасно дефинише механизам који се налази у основи штетних ефеката PS-MP/NP. Обзиром да је у овој дисертацији показано да постоји различита осетљивост на изложеност честицама PS између јединки мушког и женског пола, ова студија наводи на детаљна испитивања сложене везе између еколошког и интрацелуларног загађења пластиком, као и њиховог утицаја на настанак штетних генетских, епигенетских и промена у понашању међу врстама. Коначно, приказани резултати додатно подстичу детаљне еколошке и епидемиолошке студије о акутној и хроничној изложености људи различитим честицама пластике.

## 6. ЗАКЉУЧАК

- Ова студија је потврдила хипотезу о цитотоксичном ефекту PS-MP/NP. Коришћени тестови (MTT–тест, анализа ћелија у реалном времену (RTC), *Annexin V-PI*) за одређивање цитотоксичности су дали очекиване резултате тестирањем ћелија које су биле изложене третману нанопластиком у одређеном времену (24 и 72 сата) у обе концентрације 0,01 mg/ml и 0,1 mg/ml и обе величине од 40 и 200nm.
- Коришћењем Комет теста и TUNEL есеја потврђено је оштећене ДНК дејством PS-MP/NP, наиме обе концентрације PS-MP/NP (0,01 mg/ml и 0,1 mg/ml) значајно су повећале GDI у ћелијама мишева као и хуманим ћелијама ( $p < 0,001$ ) након излагања у трајању од 24 сата, односно повећан је степен фрагментације ДНК у обе третиране

групе ( женке и мужјаци мишева третирани PS-MP/NP имају више TUNEL позитивних ћелија него нетретиране животиње истог пола. Наиме, женке и мужјаци мишева третирани PS-MP/NP имају више TUNEL позитивних ћелија него нетретиране животиње истог пола.

- Полистиренске честице имају способност продирања и акумулације у ткивима миша. Конфокалном микроскопијом потврђена је акумулација PS-MP/NP у ткивима мишева који су третирани *per os* PS-MP/NP. Акумулација је потврђена у јејунуму, црвеној и белој пулпи слезине, тестисима, као и акумулацију и агрегацију у сензорним ћелијама са длачицама унутрашњег уха. Трансмисиона електронска микроскопија је потврдила интернализацију PS-MP величине од 200nm у комерцијалне мезенхималне матичне ћелије из коштане сржи C57BL/6 мишева.
- Обе примењене концентрације PS честица значајно су утицале на степен анксиозности код женки мишева, што је утврђено коришћењем директних индикатора анксиозности УВЗЦ и БУЦЗ. Такође су потврђене полне разлике у понашању третираних мишева узроковане поремећајем цитокинског профила, који се карактерише повећаним нивоима проинфламаторних цитокина и истовременим падом антиинфламаторних цитокина.

## 7. ЛИТЕРАТУРА

1. Liu Z, Liu W, Walker TR, Adams M, Zhao J. How does the global plastic waste trade contribute to environmental benefits: Implication for reductions of greenhouse gas emissions? J Environ Manage 2021; 287: 112283
2. Geyer R, Jambeck JR, Law KL. Production, use, and fate of all plastics ever made. Sci Adv 2017; 3: e1700782
3. Blair RM, Waldron S, Phoenix V, Gauchotte-Lindsay C. Micro- and Nanoplastic Pollution of 604 Freshwater and Wastewater Treatment Systems. Springer Science Reviews 2017; 5: 19-30

4. Song YK, Hong SH, Eo S, Han GM, Shim WJ. Rapid Production of Micro- and Nanoplastics by Fragmentation of Expanded Polystyrene Exposed to Sunlight. *Environ Sci Technol* 2020; 54: 11191-11200. 83
5. Stojkovic M, Stojkovic P, Stankovic KM. Human pluripotent stem cells - Unique tools to decipher the effects of environmental and intracellular plastic pollution on human health. *Environ Pollut* 2021; 269: 116144
6. Kik K, Bukowska B, Sicinska P. Polystyrene nanoparticles: Sources, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms. *Environ Pollut* 2020; 262: 114297
7. Li, X., He, E., Xia, B., Van Gestel, C.A.M., Peijnenburg, W.J.G.M., Cao, X., Qiu, H. Impact of CeO<sub>2</sub> nanoparticles on the aggregation kinetics and stability of polystyrene nanoplastics: Importance of surface functionalization and solution chemistry. *Water Res* 2020; 186: 116324.
8. Zhou, X.-X., He, S., Gao, Y., Chi, H.-Y., Wang, D.-J., Li, Z.-C., Yan, B. Quantitative Analysis of Polystyrene and Poly(methyl methacrylate) Nanoplastics in Tissues of Aquatic Animals. *Environ Sci Technol* 2021; 55: 3032-3040
9. Guimarães, A.T.B., Estrela, F.N., Rodrigues, A.S.d.L., Chagas, T.Q., Pereira, P.S., Silva, F.G., Malafaia, G. Nanopolystyrene particles at environmentally relevant concentrations causes behavioral and biochemical changes in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *J Hazard Mater* 2021; 403: 123864
10. Al-Sid-Cheikh, M., Rowland, S.J., Stevenson, K., Rouleau, C., Henry, T.B., Thompson, R.C., Uptake, Whole-Body Distribution, and Depuration of Nanoplastics by the Scallop *Pecten maximus* at Environmentally Realistic Concentrations. *Environ Sci Technol* 2018; 52: 14480-14486. 600
11. Amanda Pereira da Costa Araújo, Thiago Lopes Rocha, Daniela de Melo E Silva, Guilherme Malafaia. Micro(nano)plastics as an emerging risk factor to the health of amphibian: A scientometric and systematic review 2021 Nov;283:131090. doi:10.1016/j.chemosphere.2021.131090. Epub 2021 Jun 14.
12. 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: 124028.
13. Deng Y, Zhang Y, Lemos B, Ren H. Tissue accumulation of microplastics in mice and 644 biomarker responses suggest widespread health risks of exposure. *Sci Rep* 2017; 7: 46687.
14. Lee WS, Cho H-J, Kim E, Huh YH, Kim H-J, Kim B, et al. Correction: Bioaccumulation of polystyrene nanoplastics and their effect on the toxicity of Au ions in zebrafish embryos. *Nanoscale*. 2019;11(7):3396.
15. Loos C, Syrovets T, Musyanovych A, Mailänder V, Landfester K, Nienhaus GU, et al. Functionalized polystyrene nanoparticles as a platform for studying bio-nano interactions. *Beilstein J Nanotechnol*. 2014;5:2403–12.
16. van Midwoud PM, Janse A, Merema MT, Groothuis GMM, Verpoorte E. Comparison of biocompatibility and adsorption properties of different plastics for advanced microfluidic cell and tissue culture models. *Anal Chem*. 2012;84(9):3938–44.)
17. Bojic S, Falco MM, Stojkovic P, Ljubic B, Gazdic Jankovic M, Armstrong L, et al. Platform to study intracellular polystyrene nanoplastic pollution and clinical outcomes. *Stem Cells*. 2020. [published online ahead of print]. doi:10.1002/stem.3244).
18. Xu M, Halimu G, Zhang Q, Song Y, Fu X, Li Y, et al. Internalization and toxicity: A preliminary study of effects of nanoplastic particles on human lung epithelial cell. *Sci Total Environ*. 2019;694:13379).

19. Allen S, Allen D, Phoenix VR, Le Roux G, Durántez Jiménez P, Simonneau A, et al. Atmospheric transport and deposition of microplastics in a remote mountain catchment. *Nat Geosci.* 2019;12(5):339–44.)
20. Lehner R, Weder C, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B. Emergence of Nanoplastic in the Environment and Possible Impact on Human Health. *Environ Sci Technol.* 2019;53(4):1748–65. ;
21. Da Costa JP, Nunes AR, Santos PSM, Girão A V, Duarte AC, Rocha-Santos T. Degradation of polyethylene microplastics in seawater: Insights into the environmental degradation of polymers. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2018;53(9):866–75.).
22. Bouwmeester H, Hollman PCH, Peters RJB. Potential Health Impact of Environmentally Released Micro- and Nanoplastics in the Human Food Production Chain: Experiences from Nanotoxicology. *Environ Sci Technol.* 2015;49(15):8932–47.
23. Ritz S, Schöttler S, Kotman N, Baier G, Musyanovych A, Kuharev J, et al. Protein corona of nanoparticles: distinct proteins regulate the cellular uptake. *Biomacromolecules.* 2015;16(4):1311–21
24. Yang D, Shi H, Li L, Li J, Jabeen K, Kolandhasamy P. Microplastic Pollution in Table Salts from China. *Environ Sci Technol.* 2015;49(22):13622–7.).
25. Grossi M, Morgunova M, Cheung S, Scholz D, Conroy E, Terrile M, et al. Lysosome triggered near-infrared fluorescence imaging of cellular trafficking processes in real time. *Nat Commun.* 2016;7(1):10855.
26. Bhattacharjee S, Rietjens IMCM, Singh MP, Atkins TM, Purkait TK, Xu Z, et al. Cytotoxicity of surface-functionalized silicon and germanium nanoparticles: the dominant role of surface charges. *Nanoscale.* 2013;5(11):4870–83.
27. Terman A, Kurz T, Navratil M, Arriaga EA, Brunk UT. Mitochondrial Turnover and Aging of Long-Lived Postmitotic Cells: The Mitochondrial–Lysosomal Axis Theory of Aging. *Antioxid Redox Signal.* 2010;12(4):503–35.
28. Rodolfo C, Campello S, Cecconi F. Mitophagy in neurodegenerative diseases. *Neurochem Int.* 2018;117:156–66.
29. Galluzzi L, Kepp O, RRKroemer G. Enlightening the impact of immunogenic cell death in photodynamic cancer therapy. *EMBO J.* 2012;31(5):1055–7.
30. Ding F, Li Y, Liu J, Liu L, Yu W, Wang Z, et al. Overendocytosis of gold nanoparticles increases autophagy and apoptosis in hypoxic human renal proximal tubular cells. *Int J Nanomedicine.* 2014;9(1):4317–30.
31. Afeseh Ngwa H, Kanthasamy A, Gu Y, Fang N, Anantharam V, Kanthasamy AG. Manganese nanoparticle activates mitochondrial dependent apoptotic signaling and autophagy in dopaminergic neuronal cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011;256(3):227–40.
32. Brun E, Barreau F, Veronesi G, Fayard B, Sorieul S, Chanéac C, et al. Titanium dioxide nanoparticle impact and translocation through ex vivo, in vivo and in vitro gut epithelia. *Part Fibre Toxicol.* 2014;11(1):13. B
33. Jatana S, Callahan L, Pentland A, DeLouise L. Impact of Cosmetic Lotions on Nanoparticle Penetration through ex Vivo C57BL/6 Hairless Mouse and Human Skin: A Comparison Study. *Cosmetics.* 2016;3(1):6.
34. Lane ME. Skin penetration enhancers. *Int J Pharm.* 2013;447(1–2):12–21.
35. Prietl B, Meindl C, Roblegg E, Pieber TR, Lanzer G, Fröhlich E. Nano-sized and micro-sized polystyrene particles affect phagocyte function. *Cell Biol Toxicol.* 2014;30(1):1–16.
36. 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;684:657–69.
37. Yong CQY, Valiyaveetill S, Tang BL. Toxicity of Microplastics and Nanoplastics in Mammalian Systems. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(5):1509.

38. Tanzi RE, Bertram L. Twenty Years of the Alzheimer's Disease Amyloid Hypothesis: A Genetic Perspective. *Cell*. 2005;120(4):545–55.
39. Veljovic D, Matic T, Stamenic T et al. Mg/Cu co-substituted hydroxyapatite – Biocompatibility, mechanical properties and antimicrobial activity. *Ceramics International* 2019;45(17, Part A):22029-22039.
40. Hwang J, Choi D, Han S, Jung SY, Choi J, Hong J. Potential toxicity of polystyrene microplastic particles. *Sci Rep* 2020; 10: 7391.
41. Landegger LD, Pan B, Askew C, Wassmer SJ, Gluck SD, Galvin A, et al. A synthetic AAV vector enables safe and efficient gene transfer to the mammalian inner ear. *Nat Biotechnol* 2017b; 35: 280-284
42. Landegger LD, Dilwali S, Stankovic KM. Neonatal Murine Cochlear Explant Technique as an In Vitro Screening Tool in Hearing Research. *J Vis Exp* 2017a
43. Biljana Lujic, Marija Milovanovic, Vladislav Volarevic, Bridgid Murray, Diana Bugarski, Stefan Przyborski, Nebojsa Arsenijevic, Miodrag L. Lukic & Miodrag Stojkovic Human mesenchymal stem cells creating an immunosuppressive environment and promote breast cancer in mice *Scientific Reports*; 2013, 2298.
44. Petrovic A, Zivanovic M, Puchta R, Cocic D, Scheurer A, Milivojevic N, et al. Experimental and quantum chemical study small o, Cyrillicn the DNA/protein binding and the biological activity of a rhodium(iii) complex with 1,2,4-triazole as an inert ligand. *Dalton Trans* 2020; 49: 9070-9085.
45. Singh NT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low 757 levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 758 1988 Mar; 175:184-91
46. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and 629 limitations. *Mol Biotechnol* 2004; 26: 249-61
47. Laetitia Prut 1 CB. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety714 like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*. 715 2003 Feb 28; 463: 3-33
48. S Pellow PC, S E File, M Briley. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods*. 1985 Aug; 14: 149-
49. Stajic D, Selakovic D, Jovicic N, Joksimovic J, Arsenijevic N, Lukic ML, et al. The role of galectin-3 in modulation of anxiety state level in mice. *Brain Behav Immun* 2019; 78: 177-187
50. Crowley LC, Marfell BJ, Waterhouse NJ. Detection of DNA Fragmentation in Apoptotic 631 Cells by TUNEL. *Cold Spring Harb Protoc* 2016; 2016.
51. Hernandez LM, Xu EG, Larsson HCE, Tahara R, Maisuria VB, Tufenkji N. Plastic Teabag Release Billions of Microparticles and Nanoparticles into Tea. *Environ Sci Technol* 2019; 53: 12300-12310.
52. Oliveri Conti G, Ferrante M, Banni M, Favara C, Nicolosi I, Cristaldi A, et al. Micro- and nano-plastics in edible fruit and vegetables. The first diet risks assessment for the general population. *Environ Res* 2020; 187: 109677.
53. Pastorino P, Pizzul E, Bertoli M, Anselmi S, Kusce M, Menconi V, et al. First insights into plastic and microplastic occurrence in biotic and abiotic compartments, and snow from a high-mountain lake (Carnic Alps). *Chemosphere* 2021; 265: 129121
54. Ranjan VP, Joseph A, Goel S. Microplastics and other harmful substances released from disposable paper cups into hot water. *J Hazard Mater* 2021; 404: 124118
55. Shruti VC, Perez-Guevara F, Elizalde-Martinez I, Kutralam-Muniasamy G. Toward a unified framework for investigating micro(nano)plastics in packaged beverages intended for human consumption. *Environ Pollut* 2021; 268: 115811.
56. Zhang Q, Xu EG, Li J, Chen Q, Ma L, Zeng EY, et al. A Review of Microplastics in Table Salt, Drinking Water, and Air: Direct Human Exposure. *Environ Sci Technol* 2020; 54: 3740-3751

57. Zuccarello P, Ferrante M, Cristaldi A, Copat C, Grasso A, Sangregorio D, et al. Exposure to 880 microplastics
58. Chae Y, Kim D, Kim SW, An YJ. Trophic transfer and individual impact of nano-sized polystyrene in a four-species freshwater food chain. *Sci Rep* 2018; 8: 284.
59. Jiang B, Kauffman AE, Li L, McFee W, Cai B, Weinstein J, et al. Health impacts of environmental contamination of micro- and nanoplastics: a review. *Environ Health Prev Med* 2020; 25: 29. 698
60. Schwabl P, Koppel S, Konigshofer P, Bucsics T, Trauner M, Reiberger T, et al. Detection of Various Microplastics in Human Stool: A Prospective Case Series. *Ann Intern Med* 2019; 171: 453-457.
61. Zhang N, Li YB, He HR, Zhang JF, Ma GS. You are what you eat: Microplastics in the feces of young men living in Beijing. *Sci Total Environ* 2021; 767: 144345
62. YChen Y, Jamshidi R, Montazami R. Study of Partially Transient Organic Epidermal Sensors. *Materials (Basel)* 2020; 13.
63. Dahne et al., 2015Dahne L, Schneider J, Lewe D, Petersen H. Tailored surface engineering of pigments by layer-by-layer coating. *Curr Probl Dermatol* 2015; 48: 128-35.
64. Fujita H, Nishii Y, Yamashita K, Kawamata S, Yoshikawa K. The uptake and long-term storage of India ink particles and latex beads by fibroblasts in the dermis and subcutis of mice, with special regard to the non-inflammatory defense reaction by fibroblasts. *Arch Histol Cytol* 1988; 51: 285-94.
65. Taccola S, Poliziani A, Santonocito D, Mondini A, Denk C, Ide AN, et al. Toward the Use of Temporary Tattoo Electrodes for Impedancetric Respiration Monitoring and Other Electrophysiological RecorAs on Skin. *Sensors (Basel)* 2021; 21.
66. Wang L, Wu WM, Bolan NS, Tsang DCW, Li Y, Qin M, et al. Environmental fate, toxicity and risk management strategies of nanoplastics in the environment: Current status and future perspectives. *J Hazard Mater* 2021; 401: 123415.
67. Lee J, Moffett BS. Treatment of pediatric hyperkalemia with sodium polystyrene sulfonate. *Pediatr Nephrol* 2016; 31: 2113-7.
68. Ding Y, Zhang R, Li B, Du Y, Li J, Tong X, et al. Tissue distribution of polystyrene nanoplastics in mice and their entry, transport, and cytotoxicity to GES-1 cells. *Environ Pollut* 2021; 280: 116974.
69. Fournier SB, D'Errico JN, Adler DS, Kollontzi S, Goedken MJ, Fabris L, et al. Nanopolystyrene translocation and fetal deposition after acute lung exposure during late-stage pregnancy. *Part Fibre Toxicol* 2020; 17: 55.
70. Deng Y, Yan Z, Shen R, Wang M, Huang Y, Ren H, et al. Microplastics release phthalate esters and cause aggravated adverse effects in the mouse gut. *Environ Int* 2020; 143: 105916.
71. Bojic S, Volarevic V, Ljubic B, Stojkovic M. Dental stem cells--characteristics and potential. *Histol Histopathol* 2014; 29: 699-706.
72. Jin H, Ma T, Sha X, Liu Z, Zhou Y, Meng X, et al. Polystyrene microplastics induced male reproductive toxicity in mice. *J Hazard Mater* 2021; 401: 123430.
73. 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: 110133
74. Svechnikov K, Izzo G, Landreh L, Weisser J, Soder O. Endocrine disruptors and Leydig cell 841 function. *J Biomed Biotechnol* 2010; 2010.
75. Konstadoulakis MM, Syrigos KN, Baxevanis CN, Syrigou EI, Papamichail M, Peveretos P, et al. Effect of testosterone administration, pre- and postnatally, on the immune system of rats. *Horm Metab Res* 1995; 27: 275-8

76. Nowak-Kornicka J, Borkowska B, Pawlowski B. Masculinity and immune system efficacy in men. *PLoS One* 2020; 15: e0243777
77. Haibo Jin, Minghao Yan, Chun Pan, Zhenyu Liu, Xiaoxuan Sha, Chengyue Jiang, Luxi Li, Mengge Pan, Dongmei Li, Xiaodong Han & Jie Ding Chronic exposure to polystyrene microplastics induced male reproductive toxicity and decreased testosterone levels via the LH-mediated LHR/cAMP/PKA/StAR pathway *Particle and Fibre Toxicology* volume 19, Article number: 13 (2022)
78. Muhammad Umar Ijaz, Sabahat Shahzadi, Abdul Samad, Nazia Ehsan, Hussain Ahmed, Arfa Tahir, Humaira Rehman, Haseeb Anwar Dose-Dependent Effect of Polystyrene Microplastics on the Testicular Tissues of the Male Sprague Dawley Rats 2021 Jun 4;19(2):15593258211019882.
79. E. Bergami, A. Krupinski Emerenciano, M. González-Aravena, C. A. Cárdenas, P. Hernández, J. R. M. C. Silva, I. Corsi Polystyrene nanoparticles affect the innate immune system of the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* *Polar Biology*, 2019743–757 (2019)
80. Anne-Catherine Greven, Teresa Merk, Filiz Karagöz, Kristin Mohr, Markus Klapper, Boris Jovanović, Dušan Palić Polycarbonate and polystyrene nanoplastic particles act as stressors to the innate immune system of fathead minnow (*Pimephales promelas*) *Environ Toxicol Chem* 2016 Dec;35(12):3093-310
81. L F Marques-Santos, G Grassi, E Bergami, C Faleri, T Balbi, A Salis, G Damonte, L Canesi, I Corsi Cationic polystyrene nanoparticle and the sea urchin immune system: biocorona formation, cell toxicity, and multixenobiotic resistance phenotype *Nanotoxicology* 2018 Oct;12(8):847-867
82. Vania Manolova, Anna Flace, Monika Bauer, Katrin Schwarz, Philippe Saudan, Martin F Bachmann Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size *Eur J Immunol* 2008 May;38(5):1404-13.
83. Fuchs, A.-K., Syrovets, T., Haas, K.A., Loos, C., Musyanovych, A., Mailänder, V., Landfester, K., Simmet, T. Carboxyl- and amino-functionalized polystyrene nanoparticles differentially affect the polarization profile of M1 and M2 macrophage subsets. *Biomaterials* 2016; 85: 78-87.
84. Forte M, Iachetta G, Tussellino M, Carotenuto R, Prisco M, De Falco M, et al. Polystyrene nanoparticles internalization in human gastric adenocarcinoma cells. *Toxicol In Vitro* 2016; 31: 126-36.
85. D M Brown, M R Wilson, W MacNee, V Stone, K Donaldson Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001 Sep 15;175(3):191-9.
86. Qiao R, Sheng C, Lu Y, Zhang Y, Ren H, Lemos B. Microplastics induce intestinal inflammation, oxidative stress, and disorders of metabolome and microbiome in zebrafish. *Sci Total Environ* 2019; 662: 246-253.
87. Brown DM, Wilson MR, MacNee W, Stone V, Donaldson K. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 618 175: 191-9.
88. Sendra M, Pereiro P, Yeste MP, Mercado L, Figueras A, Novoa B. Size matters: Zebrafish (*Danio rerio*) as a model to study toxicity of nanoplastics from cells to the whole organism. *Environ Pollut* 2021; 268: 115769.



89. Yang Y, Du X, Wang Q, Liu J, Zhang E, Sai L, et al. Mechanism of cell death induced by silica nanoparticles in hepatocyte cells is by apoptosis. *Int J Mol Med* 2019; 44: 903- 912.
90. Hu M, Palic D. Micro- and nano-plastics activation of oxidative and inflammatory adverse outcome pathways. *Redox Biol* 2020; 37: 101620.
91. Gabriella F Schirinzi , Ignacio Pérez-Pomeda , Josep Sanchís , Cesare Rossini , Marinella Farré , Damià Barceló Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells *Environ Res.* 2017 Nov;159:579-587.
92. Hui-Wen Chiu , Tian Xia, Yu-Hsuan Lee, Chun-Wan Chen, Jui-Chen Tsai, Ying-Jan Wang Cationic polystyrene nanospheres induce autophagic cell death through the induction of endoplasmic reticulum stress *Nanoscale.* 2015 Jan 14;7(2):736-<sup>3</sup>
93. Tian Xia 1, Michael Kovoichich, Monty Liong, Jeffrey I Zink, Andre E Nel Cationic polystyrene nanosphere toxicity depends on cell-specific endocytic and mitochondrial injury pathways *ACS Nano.* 2008 Jan;2(1):85-96.
94. Xinda Liu , Xiaodong Tian , Xu Xu , Jianzhong Lu Design of a phosphinate-based bioluminescent probe for superoxide radical anion imaging in living cells *Luminescence.* 2018 Sep;33(6):1101-1106.
95. Fröhlich, E. The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 5577-5591.
96. Ahmed F, Ahmed A, Tamoor T, Hassan T. Comment on "Dual-Band Perfect Metamaterial Absorber Based on an Asymmetric H-Shaped Structure for Terahertz Waves *Materials (Basel)* . 2019 Nov 27;12(23):3914.
97. Victor Pavlovich Chelomin, Andrey Alexandrovich Mazur ORCID, Valentina Vladimirovna Slobodskova, Sergey Petrovich Kukla and Nadezda Vladimirovna Dovzhenko Genotoxic Properties of Polystyrene (PS) Microspheres in the Filter-Feeder Mollusk *Mytilus trossulus* (Gould, 1850) *J. Mar. Sci. Eng.* 2022, 10(2), 273;
98. Nagore González-Soto , Joseph Hatfield , Alberto Katsumiti , Nerea Duroudier , José María Lacave , Eider Bilbao , Amaia Orbea , Enrique Navarro , Miren P Cajaraville Impacts of dietary exposure to different sized polystyrene microplastics alone and with sorbed benzo[a]pyrene on biomarkers and whole organism responses in mussels *Mytilus galloprovincialis* *Sci Total Environ.* 2019 Sep 20;684:548-566
99. Tao Sun Junfei Zhan Fei Li Chenglong Ji Huifeng Wu Evidence-based meta-analysis of the genotoxicity induced by microplastics in aquatic organisms at environmentally relevant concentrations *Science of The Total Environment*, 20 August 2021, 147076
100. Joanna Rejman 1, Volker Oberle, Inge S Zuhorn, Dick Hoekstra Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis *Biochem J.* 2004 Jan 1;377(Pt 1):159-69. doi: 10.1042/BJ20031253.
101. Lei L, Wu S, Lu S, Liu M, Song Y, Fu Z, et al. Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. *Sci Total Environ* 2018; 619-620: 1-8.
102. Mattsson K, Johnson EV, Malmendal A, Linse S, Hansson LA, Cedervall T. Brain damage and behavioural disorders in fish induced by plastic nanoparticles delivered through the food chain. *Sci Rep* 2017; 7: 11452.
103. Parenti CC, Binelli A, Caccia S, Della Torre C, Magni S, Pirovano G, et al. Ingestion and effects of polystyrene nanoparticles in the silkworm *Bombyx mori*. *Chemosphere* 2020; 257: 127203.
104. 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; 7: 46687.

105. Celec, P., Ostatníková, D., Hodosy, J. On the effects of testosterone on brain behavioral functions. *Front Neurosci* 2015; 9: 12-12.)
106. Walczak AP, Hendriksen PJ, Woutersen RA, van der Zande M, Undas AK, Helsdingen R, et al. Bioavailability and biodistribution of differently charged polystyrene nanoparticles upon oral exposure in rats. *J Nanopart Res* 2015; 17: 231.
107. Selakovic D, Joksimovic J, Zaletel I, Puskas N, Matovic M, Rosic G. The opposite effects of nandrolone decanoate and exercise on anxiety levels in rats may involve alterations in hippocampal parvalbumin-positive interneurons. *PLoS One* 2017; 12: e0189595
108. Selakovic D, Joksimovic J, Jovicic N, Mitrovic S, Mihailovic V, Katanic J, et al. The Impact of Hippocampal Sex Hormones Receptors in Modulation of Depressive-Like Behavior Following Chronic Anabolic Androgenic Steroids and Exercise Protocols in Rats. *Front Behav Neurosci* 2019; 13: 19.
109. Lei L, Wu S, Lu S, Liu M, Song Y, Fu Z, et al. Microplastic particles cause intestinal damage and other adverse effects in zebrafish *Danio rerio* and nematode *Caenorhabditis elegans*. *Sci Total Environ* 2018; 619-620: 1-8
110. Petersen A, Hansson O, Puschban Z, Sapp E, Romero N, Castilho RF, et al. Mice transgenic for exon 1 of the Huntington's disease gene display reduced striatal sensitivity to neurotoxicity induced by dopamine and 6-hydroxydopamine. *Eur J Neurosci* 2001; 14: 1425-35
111. Prakash A, Kumar A. Role of nuclear receptor on regulation of BDNF and neuroinflammation in hippocampus of beta-amyloid animal model of Alzheimer's disease. *Neurotox Res* 2014b; 25: 335-47
112. Pillai A. Brain-derived neurotropic factor/TrkB signaling in the pathogenesis and novel pharmacotherapy of schizophrenia. *Neurosignals* 2008; 16: 183-93.
113. Xenos D, Kamceva M, Tomasi S, Cardin JA, Schwartz ML, Vaccarino FM. Loss of TrkB Signaling in Parvalbumin-Expressing Basket Cells Results in Network Activity Disruption and Abnormal Behavior. *Cereb Cortex* 2018; 28: 3399-3413.
114. Eder M, Rammes G, Zieglgansberger W, Dodt HU. GABA(A) and GABA(B) receptors on neocortical neurons are differentially distributed. *Eur J Neurosci* 2001; 13: 1065-9.
115. Alakuijala A, Alakuijala J, Pasternack M. Evidence for a functional role of GABA receptors in the rat mature hippocampus. *Eur J Neurosci* 2006; 23: 514-20.
116. Brambilla P, Barale F, Caverzasi E, Soares JC. Anatomical MRI findings in mood and anxiety disorders. *Epidemiol Psichiatr Soc* 2002; 11: 88-99.
117. Naseri MH, Hesami-Tackallou S, Torabi-Nami M, Zarrindast MR, Nasehi M. Involvement of the CA1 GABAA receptors in MK-801-induced anxiolytic-like effects: an isobologram analysis. *Behav Pharmacol* 2014; 25: 197-205.
118. Prust M, Meijer J, Westerink RHS. The plastic brain: neurotoxicity of micro- and nanoplastics. *Part Fibre Toxicol* 2020; 17: 24.
119. Jacobson MH, Stein CR, Liu M, Ackerman MG, Blakemore JK, Long SE, et al. Prenatal exposure to bisphenols and phthalates and postpartum depression: The role of neurosteroid hormone disruption. *J Clin Endocrinol Metab* 2021
120. Whyatt RM, Liu X, Rauh VA, Calafat AM, Just AC, Hoepner L, et al. Maternal prenatal urinary phthalate metabolite concentrations and child mental, psychomotor, and behavioral development at 3 years of age. *Environ Health Perspect* 2012;120: 2905.
121. Perera F, Nolte ELR, Wang Y, Margolis AE, Calafat AM, Wang S, et al. Bisphenol A exposure and symptoms of anxiety and depression among inner city children at 10-12 years of age. *Environ Res* 2016; 151: 195-202.

122. Yeo M, Berglund K, Hanna M, Guo JU, Kittur J, Torres MD, et al. Bisphenol A delays the perinatal chloride shift in cortical neurons by epigenetic effects on the *Kcc2* promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110: 4315-2

## **БИОГРАФИЈА**

Дипломирани хемичар за истраживање и развој Сандра Николић рођена је 14.04.1972. године у Крагујевцу. Завршила је основну школу „Милутин и Драгиња Тодоровић“ у Крагујевцу, средњу медицинску школу-општи смер „Сестре Нинковић“ у Крагујевцу. На Природно математичком факултету Универзитета у Крагујевцу- одсек хемија, дипломирала је 09.04.2009 године и стекла звање дипломирани хемичар за истраживање и развој.

Докторске академске студије је уписала 2009 године на Факултету медицинских наука Универзитета у Крагујевцу, изборно подручје Клиничка и експериментална фармакологија. Усмени докторски испит је положила 28.01.2014. године са оценом 8. Од 21.10.2009. године је запослена на Факултету медицинских наука као виши лаборант на Катедри за генетику. На Факултету медицинских наука у Крагујевцу завршила је обуку за Саветника за хемикалије. Укључена је у научно истраживачки рад на Факултету медицинских наука у Крагујевцу.

## **БИБЛИОГРАФИЈА**

1. **Nikolic S**, Gazdic-Jankovic M, Rosic G, Miletic-Kovacevic M, Jovicic N, Nestorovic N, Stojkovic P, Filipovic N, Milosevic-Djordjevic O, Selakovic D, Zivanovic M, Seklic D, Milivojević N, Markovic A, Seist R, Vasilijic S, Stankovic KM, Stojkovic M, Ljubic B. Orally administered fluorescent nanosized polystyrene particles affect cell viability, hormonal and inflammatory profile, and behavior in treated mice. *Environ Pollut.* 2022;305:119206. doi: 10.1016/j.envpol.2022.119206. **(M21a), IF 8.071**
2. Miloradovic D, Pavlovic D, Jankovic MG, **Nikolic S**, Papic M, Milivojevic N, Stojkovic M, Ljubic B. Human Embryos, Induced Pluripotent Stem Cells, and Organoids: Models to Assess the Effects of Environmental Plastic Pollution. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:709183. doi: 10.3389/fcell.2021.709183. **(M21), IF 6.684**
3. Postolovic K, Ljubic B, Miletic Kovacevic M, Đorđević S, **Nikolic S**, Zivanovic S, Stanic Z. Optimization, characterization, and evaluation of carrageenan/alginate/poloxamer/curcumin hydrogel film as a functional wound dressing material. *Materials Today Communications.* doi: 10.1016/j.mtcomm.2022.103528. **(M22), IF 3.383**
4. **Nikolić S**, Živanović S, Papić M, Gazdić Janković M, Stojković M, Ljujić B. Nanoplastics as a potential environmental health factor: from molecular interaction to altered cellular function and human disease. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research.* 2021; doi: 10.2478/sjecr-2020-0049. **M51**
5. Zivanović S, Rackov LP, Zivanović A, Jevtić M, **Nikolić S**, Kocić S. Cartilage oligomeric matrix protein - inflammation biomarker in knee osteoarthritis. *Bosn J Basic Med Sci.* 2011;11(1):27-32. doi: 10.17305/bjbms.2011.2619. **(M23), IF 0.489**
6. Zivanović S, **Nikolić S**, Jevtić M, Kocić S. Inflammation in knee osteoarthrosis--cause of aggravation. *Med Pregl.* 2010;63(9-10):668-73. **M51**

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да докторска дисертација под насловом:

In vivo и in vitro испитивања биотоксичности полистиренских микро- и наночестица

---

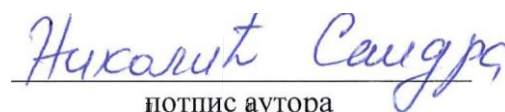
---

представља оригинално ауторско дело настало као резултат сопственог истраживачког рада.

Овом изјавом такође потврђујем:

- да сам једини аутор наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији нисам извршио/ла повреду ауторског нити другог права интелектуалне својине других лица,

У Крагујевцу 27.05.2022, године, \_\_\_\_\_



ПОТПИС АУТОРА

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСТОВЕТНОСТИ ШТАМПАНЕ И ЕЛЕКТРОНСКЕ ВЕРЗИЈЕ  
ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Изјављујем да су штампана и електронска верзија докторске дисертације под  
насловом:

— In vivo и in vitro испитивања биотоксичности полистиренских микро- и наночестица

---

---

---

---

истоветне.

У Крагујевцу 27.05.2022 године, \_\_\_\_\_

  
ПОТПИС АУТОРА

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Сандра Николић

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

In vivo и in vitro испитивања биотоксичности полистиренских микро- инаночестица

---

---

и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у

Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем преузимања.

Овом изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Уколико аутор шабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од Creative Commons ЛИЦЕНЦИ, то не искључује право припадника припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих Creative Commons лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада**

У Крагујевцу 27.05.2022, године, \_\_\_\_\_

  
ПОТПИС АУТОРА

<sup>2</sup> Молимо ауторе који су изабрали да дозволе припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од Creative Commons' ЛИЦЕНЦИ да заокруже једну од понуђених ЛИЦЕНЦИ. Детаљан садржај наведених ЛИЦЕНЦИ доступан је на: <http://creativecommons.org.rs/>

