



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Nikolina Peranić

**UČINCI KOMPLEKSNIH SMJESA NANOČESTICA
PLASTIKE NA ANDROGENE I ESTROGENE
RECEPTORE**

DOKTORSKI RAD

Mentor: naslovni izv. prof. dr. sc. Ivana Vinković Vrček, znanstveni savjetnik u
trajnom izboru

Zagreb, 2025.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Nikolina Peranić

EFFECTS OF COMPLEX MIXTURES OF PLASTIC NANOPARTICLES ON ANDROGEN AND ESTROGEN RECEPTORS

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor: Titular Associate Professor Ivana Vinković Vrček, Scientific
Advisor with Tenure, PhD

Zagreb, 2025

Zahvale

Prije svega želim zahvaliti mentorici nasl. izv. prof. dr. sc. Ivani Vinković Vrček na ukazanom povjerenju i pruženoj prilici. Hvala Vam na podršci, razumijevanju i savjetima tijekom cijelog doktorata. Hvala što ste mi omogućili da sudjelujem na zanimljivim projektima, konferencijama i usavršavanjima.

Hvala prof. dr. sc. Željku Debeljaku i njegovom timu iz Odjela za kliničku kemiju i kontrolu kvalitete KBC-a Osijek na pomoći prilikom provođenja LC-MS/MS eksperimenata i na ugodnoj atmosferi u laboratoriju.

Hvala dr. sc. Carlos Cuestas Ayllonu i prof. dr. sc. Jesus M de la Fuenteu s Instituta za znanost o materijalima u Zaragozi na pomoći prilikom snimanja SEM slika.

Hvala svim kolegama iz grupe na ugodnoj radnoj atmosferi i podršci na ovom putu. Hvala Ivanu na svim savjetima i dobrim kavama. Nikolini jer je divan suputnik od Osijeka do Dernbacha. Luciji na svojoj pomoći u labosu i van njega, na svim druženjima kad je fešta ali i kad je teško. Hvala vam što ste od kolega iz ureda postali prijatelji.

Mojim prijateljima hvala na podršci tijekom cijelog ovog puta i na mnoštvu lijepih trenutaka. Opućenin Novaljkamin hvala što ste uz mene od osnovnoškolskih dana i na svim druženjima u našoj metropoli koja su olakšavala povratak u Zagreb.

Najveće hvala mojoj obitelji na potpori, razumijevanju i bezbrižnom školovanju.

Viktoru na beskrajnom strpljenju, podršci i razumijevanju.

Sadržaj

SAŽETAK.....	X
ABSTRACT	XII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Nanočestice plastike	2
2.1.1. <i>Nanočestice plastike u okolišu</i>	<i>3</i>
2.2. Interakcija čestica plastike i konvencionalnih zagađivala.....	5
2.3. Ljudska izloženost plastici i učinak na zdravlje.....	6
2.4. Endokrini disruptori.....	9
2.4.1. <i>Ispitivanje endokrino-disruptivnog potencijala in vitro.....</i>	<i>11</i>
2.4.2. <i>Ispitivanje učinaka smjesa</i>	<i>14</i>
2.4.3. <i>Oksibenzon.....</i>	<i>14</i>
2.4.4. <i>Metilparaben.....</i>	<i>16</i>
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	18
3.1. Materijali	18
3.2. Fizikalno-kemijska karakterizacija nanočestica plastike.....	19
3.3. Karakteristike staničnih linija	20
3.3.1. <i>Stanična linija AR-EcoScreen GR KO M1.....</i>	<i>20</i>
3.3.2. <i>Stanična linija HeLa-9903</i>	<i>21</i>
3.3.3. <i>Stanična linija NCI-H295R.....</i>	<i>21</i>
3.4. Ispitivanje preživljenja stanica	21
3.5. Ispitivanje učinka PNP na aktivaciju receptora.....	23
3.5.1. <i>Učinak na aktivaciju androgenih receptora</i>	<i>23</i>
3.5.2. <i>Učinak na estrogene receptore</i>	<i>24</i>
3.6. Ispitivanje učinka PNP na proces steroidogeneze.....	25
3.6.1. <i>Određivanje ekspresije gena lančanom reakcijom polimeraze.....</i>	<i>26</i>
3.6.2. <i>Određivanje koncentracije steroidnih hormona</i>	<i>28</i>
3.7. Statistička obrada rezultata	29
§ 4. REZULTATI I RASPRAVA	31
4.1. Fizikalno-kemijska svojstva nanočestica plastike	31
4.2. Učinak PNP na stanično preživljenje	35

4.2.1. AR-EcoScreen stanična linija	35
4.2.2. HeLa-9903 stanična linija	38
4.2.3. NCI-H295R stanična linija	41
4.3. Učinak PNP na aktivaciju receptora	43
4.3.1. Androgeni receptori	43
4.3.2. Estrogeni receptori	46
4.4. Utjecaj PNP na endokrino-disruptivni profil oksibenzona i metilparabena	48
4.4.1. Androgeni receptori	48
4.4.2. Estrogeni receptori	57
4.5. Utjecaj PNP na proces steroidogeneze	66
4.5.1. Ekspresija gena uključenih u proces steroidogeneze	66
4.5.2. Kvantifikacija steroidnih hormona	72
§ 5. ZAKLJUČAK	79
§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA	81
§ 7. LITERATURNI IZVORI	83
§ 8. DODATAK	93
§ 9. ŽIVOTOPIS	130



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

UČINCI KOMPLEKSNIH SMJESA NANOČESTICA PLASTIKE NA ANDROGENE I ESTROGENE RECEPTORE

Nikolina Peranić

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Ksaverska cesta 2, Zagreb, Hrvatska

Prekomjerna upotreba plastičnih proizvoda i neprikladno gospodarenje plastičnim otpadom rezultirali su nakupljanjem mikro- i nanočestica plastike (PNP) u okolišu, čime je ugrožen i hranidbeni lanac čovjeka. Interakcija takvih čestica s ljudskim organizmom potvrđena je njihovom detekcijom u mnogim biološkim uzorcima ljudskog porijekla ali njihov učinak na zdravlje, posebice reproduktivno, nije u potpunosti razjašnjen. Zbog mogućnosti adsorpcije različitih kemikalija na površinu PNP izuzetno je važno proučavati utjecaj kompleksnih smjesa kojima je čovjek izložen. Ova doktorska disertacija je imala za cilj odrediti endokrino disruptivno djelovanje PNP ispitivanjem djelovanja pojedinih PNP i smjesa PNP na androgene i estrogene receptore te na proces steroidogeneze. Ispitivanja su provedena korištenjem 3 *in vitro* modela u skladu s relevantnim regulatornim smjernicama. U istraživanju je korišteno osam vrsta PNP različite veličine i polimernog sastava kako bi se ispitalo utječu li ta svojstva na njihove biološke učinke. Također, ispitan je endokrino-disruptivni učinak PNP u smjesama s oksibenzonom i metilparabenom u svrhu mogućeg otkrivanja sinergističkih i/ili antagonističkih učinaka takvih smjesa. Rezultati pokazuju da učinak PNP na receptore ovisi o vrsti polimera, a učinak je najizraženiji kod nanočestica polipropilena.

(144 stranica, 55 slika, 35 tablica, 189 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: androgeni / estrogene / metilparaben / nanočestice / oksibenzon / plastika / steroidogeneza

Mentor: naslovni izv. prof. dr. sc. Ivana Vinković Vrček, znanstveni savjetnik u trajnom izboru

Rad prihvaćen: [dan sjednice Vijeća KO PMF]

Ocjenitelji:

1. doc. dr. sc. Marko Močibob, PMF, Zagreb
2. prof. dr. sc. Davor Kovačević, PMF, Zagreb
3. dr. sc. Maja Dutour Sikirić, zn. savj., IRB, Zagreb



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

EFFECTS OF COMPLEX MIXTURES OF PLASTIC NANOPARTICLES ON ANDROGEN AND ESTROGEN RECEPTORS

Nikolina Peranić

Institute for Medical Research and Occupational Health, Ksaverska cesta 2, Zagreb, Croatia

Excessive use of plastic products and inappropriate management of plastic waste have resulted in the accumulation of plastic micro- and nanoparticles (PNP) in the environment, threatening also the human food chain. The interaction of such particles with the human organism has been confirmed by their detection in many human samples, but their effect on health, especially reproductive, has not been fully clarified. Due to the possibility of adsorption of various chemicals onto the surface of PNP, it is extremely important to study the impact of complex mixtures to which humans are exposed. This doctoral dissertation aimed to determine the endocrine disruptive effect of PNP by examining the interaction of individual PNPs and PNP mixtures with androgen and estrogen receptors and the process of steroidogenesis. Experiments were conducted using 3 *in vitro* models in accordance with relevant regulatory guidelines. The study used eight types of PNP of different sizes and polymer composition to examine whether these properties affect their biological effects. Also, the endocrine disrupting effect of PNP in mixtures with oxybenzone and methylparaben was evaluated by means of synergistic and/or antagonistic effects of such mixtures. The results show that the effect of PNP depends on the type of polymer and is most pronounced with polypropylene nanoparticles.

(144 pages, 55 figures, 35 tables, 189 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: androgen/ estrogen/ methylparaben/ nanoparticles/ oxybenzone/ plastic/ steroidogenesis

Supervisor: Titular Associate Professor Ivana Vinković Vrček, Scientific Advisor with Tenure, PhD

Thesis accepted: [dan sjednice Vijeća KO PMF]

Reviewers:

Dr. Marko Močibob, Assistant Professor

Dr. Davor Kovačević, Professor

Dr. Maja Dutour Sikirić, Scientific Adviser

§ 1. UVOD

Rast proizvodnje i potrošnje plastičnih materijala zadnjih godina rezultirao je nakupljanjem oko 346 milijuna tona plastičnog otpada u okolišu, što predstavlja ozbiljan ekološki izazov.¹ Razgradnjom većih komada plastike u okolišu nastaju nanočestice plastike (PNP, engl. *plastic nanoparticles*) koje vrlo lako ulaze u hranidbeni lanac čovjeka.² Na taj način, ljudi su izloženi PNP ali njihov učinak na ljudsko zdravlje još nije razjašnjen. U okoliš dospijevaju i mnoge kemikalije koje remete rad endokrinog sustava a mogu se i adsorbirati na površinu PNP.³ Stoga je proučavanje učinaka kompleksnih smjesa, odnosno smjesa PNP i okolišnih onečišćivala na ljudsko zdravlje od izuzetne važnosti.

Svrha ovog doktorskog rada je ispitati učinak PNP na androgene i estrogene receptore te na proces sinteze spolnih hormona. U tu svrhu ispitano je osam vrsta PNP različite veličine i polimernog sastava. Utjecaj navedenih nanočestica ispitan je korištenjem tri različita *in vitro* modela u skladu sa smjericama Organizacije za ekonomsku suradnju i razvoj (OECD, engl. *Organisation for Economic Cooperation and Development*) za testiranje endokrino-disruptivnih učinaka. Dodatno je ispitan i učinak smjesa PNP i čestih okolišnih zagađivala, oksibenzona i metilparabena. Ovo istraživanje polazi od hipoteze da učinak PNP na androgene i estrogene receptore ovisi o vrsti i veličini nanočestica, a njihova prisutnost u složenim smjesama mijenja endokrino-disruptivni profil pojedinačnih sastavnica smjese. Ovaj rad stoga doprinosi boljem razumijevanju učinka plastike na reproduktivno zdravlje čovjeka.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

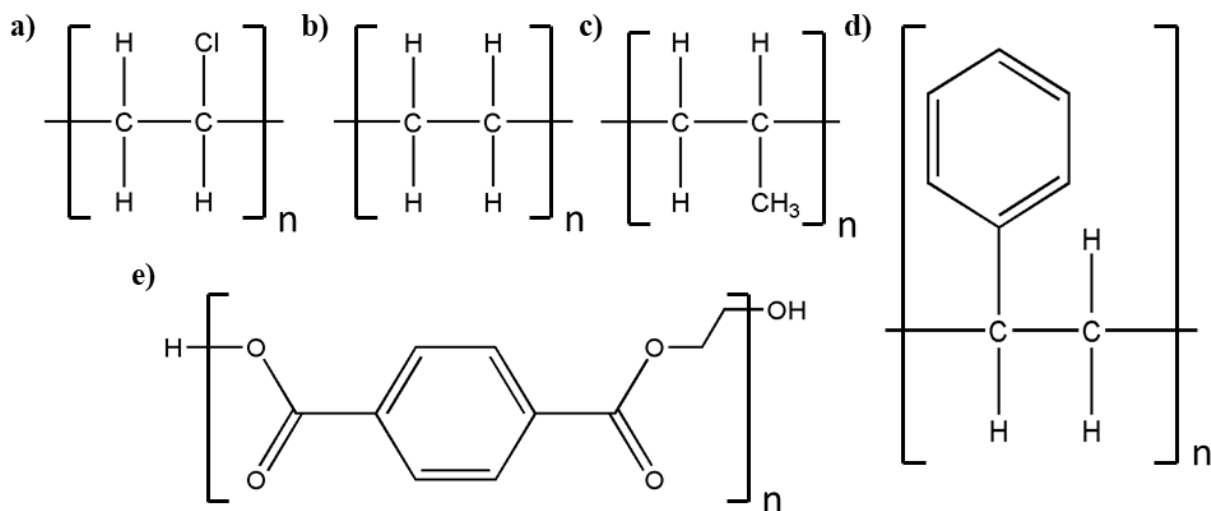
2.1. Nanočestice plastike

Različite su interpretacije raspona veličina koji odvaja PNP od mikročestica plastike (engl. *plastic microparticles*, PMP). Europska agencija za sigurnost hrane (engl. *European Food Safety Authority*, EFSA) definira nanoplastiku kao materijal bilo koje vanjske dimenzije na nanoskali (1-100 nm) a mikroplastiku kao heterogenu smjesu materijala različitog oblika u rasponu veličina 0,1-5000 μm .⁴ Druge definicije nanoplastikom smatraju nenamjerno proizvedeni materijal koji pokazuje koloidno ponašanje u rasponu veličina 1-1000 nm a sukladno tome za mikroplastiku se uzima raspon 1-5 μm .^{5,6} Ono što treba naglasiti je da ključna razlika između PMP i PNP proizlazi iz njihovih vrlo različitih fizikalno-kemijskih svojstava. PNP karakteriziraju svojstva koloidnih čestica poput velike specifične površine i Brownovog gibanja zbog kojih je njihovo ponašanje različito od PMP.^{7,8}

Polistiren (PS), polietilen (PE), polipropilen (PP), polietilentereftalat (PET) i poli(vinilklorid) (PVC) neki su od polimera koji se najčešće nalaze u sastavu PNP (slika 1). Jednokratni pribor za jelo, čaše, ambalaža za pakiranje hrane i dječje igračke neki su od primjera svakodnevnih predmeta od PS plastike.⁹ PE se uglavnom koristi za proizvodnju plastičnih vrećica i pakiranja proizvoda za osobnu njegu, dok su plastične boce i tekstilna vlakna glavna primjena PET plastike.^{10,11} PP se koristi prilikom proizvodnje medicinske opreme i automobilskih dijelova, a PVC u građevinskoj industriji.¹² Odabir polimera za određenu primjenu ovisiti će o svojstvima poput tvrdoće, gustoće, otpornosti na toplinu i kemijske inertnosti. Za postizanje željenih svojstava, prilikom proizvodnje plastike vrlo se često dodaju različita punila, stabilizatori ili usporivači gorenja.¹³

Za istraživanje učinaka na ljudsko zdravlje i mehanizama njihovih interakcija ključno je sintetizirati PNP precizno definirane veličine, kemijskog sastava i morfologije. Dva su glavna pristupa sintezi PNP: „odozgo prema dolje“ (engl. *top-down*) i „odozdo prema gore“ (engl. *bottom-up*). U pristup „odozgo prema dolje“ ubrajaju se metode poput mehaničkog mljevenja i laserske ablacije koje na određeni način smanjuju veće komade plastike. Primjerice, PET nanočestice mogu se pripremiti laserskom ablacijom PET filmova koja omogućava kontroliranje veličine i polidisperznosti dobivenih sustava.¹⁴ Suprotno tome, pristup „odozdo prema gore“ sastoji se od polimerizacije plastičnih monomera ili precipitacije polimernih lanaca

u čestice kontrolirane veličine. Merdy i suradnici¹⁵ precipitacijom polimernih lanaca PE, PVC i PP pripremili su pripadajuće nanočestice i njihovu veličinu odredili analizom praćenja nanočestica (engl. *nanoparticle tracking analysis*, NTA) koja se često koristi prilikom proučavanja PNP. Od ostalih metoda koje se koriste prilikom karakterizacije svakako valja spomenuti dinamičko (engl. *dynamic light scattering*, DLS) i elektroforetsko raspršenje svjetlosti (engl. *electrophoretic light scattering*, ELS) kao i skenirajuću (engl. *scanning electron microscopy*, SEM) i transmisijsku elektronsku mikroskopiju (engl. *transmission electron microscopy*, TEM). Za određivanje kemijskog sastava najčešće se koriste infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier transform infrared spectroscopy*, FTIR) i Ramanova spektroskopija.¹⁶



Slika 1. Strukture najčešćih vrsta plastičnih polimera: a) PVC, b) PE, c) PP, d) PS i e) PET. Izrađeno u programu ChemDraw.

2.1.1. Nanočestice plastike u okolišu

Jednostavnost obrade, cjenovna pristupačnost, izdržljivost i otpornost su svojstva plastičnih materijala koja su im omogućila globalnu primjenu. Danas je plastika središnji materijal u gotovo svakoj industriji, od prehrambene i farmaceutske sve do tekstilne i automobilske. Proizvodnja plastike narasla je otprilike 200 puta u zadnjih 50 godina a procijenjeno je kako će se udvostručiti u idućih 20 godina ukoliko ne dođe do značajnih promjena u trendu proizvodnje.^{9,17} Prekomjerna upotreba i kemijska otpornost zajedno s neadekvatnim zbrinjavanjem otpada rezultirali su jednim od najvećih ekoloških izazova.¹⁸ U Europskoj uniji

(EU) taj je problem visoko na listi prioriteta i pokrenuti su mnogi programi s ciljem smanjivanja štetnih učinaka gospodarstvenih aktivnosti na ekosustav. Jedan od takvih programa je Strategija za plastiku u kružnom gospodarstvu predstavljena 2018. godine kojoj je cilj do 2030. godine promijeniti način na koji se plastični proizvodi dizajniraju, proizvode i recikliraju u EU.¹⁹ Također, 2021. godine usvojen je Akcijski plan EU-a: „Prema postizanju nulte stope onečišćenja zraka, vode i tla“ kojem je cilj do 2030. godine smanjiti količinu plastičnog otpada u moru za 50% i količinu plastike koja se ispušta u okoliš za 30%.²⁰ Osim toga, 2019. godine donesena je Direktiva o smanjenju utjecaja određenih plastičnih proizvoda na okoliš koja ograničava proizvodnju i smanjuje potrošnju plastičnih proizvoda za jednokratnu upotrebu.²¹ Te inicijative EU ključne su za zaštitu okoliša, zdravlje ljudi i održivi razvoj.

Poseban problem za okoliš predstavlja razgradnja plastike do razine nanočestica. Iako je to dugotrajan postupak, konstantno se odvija kombinacijom fizikalnih i kemijskih procesa kao što su mehaničko trošenje, fotoliza i oksidacija.²² Osim toga, neki mikroorganizmi poput bakterija i gljivica izlučuju enzime koji mogu različitim biokemijskim procesima razgraditi plastiku.²³ Prema načinu na koji dopijevaju u okoliš PMP i PNP možemo podijeliti na primarne i sekundarne. Primarne u okoliš dopijevaju u svom izvornom obliku poput plastičnih peleta, kuglica ili vlakana korištenih u proizvodima za osobnu njegu, tekstilnoj ili industriji abraziva. U obliku granula, PMP pronađene su u pastama za zube, gelovima za umivanje i pilinzima za lice.^{24,25} Suprotno primarnim, sekundarne PMP i PNP nastaju u okolišu postepenom razgradnjom većih komada plastike koji su nepropisno reciklirani.^{26,27} Zbog vrlo male veličine, krajnje produkta raspada plastike, mnogi organizmi vrlo lako unose putem hrane što rezultira bioakumulacijom i kruženjem plastike u okolišu.

Procijenjeno je da 79% ukupno proizvedene plastike završava u okolišu²⁸ što je količina od 346 milijuna tona ako se uzme u obzir da se godišnje proizvede oko 438 milijuna tona plastike.¹ Dakle, okoliš je u potpunosti kontaminiran s PMP i PNP te ne iznenađuje činjenica da je njihova prisutnost detektirana u vodenim ekosustavima, tlu i sedimentu pa čak i na mjestima s ograničenom ljudskom aktivnosti poput Antarktike i Arktika.^{29–33} Izmjerene koncentracije variraju ovisno o geografskoj lokaciji, blizini urbanog središta i vremenskim uvjetima. Tako je primjerice izmjerena koncentracija od 1430–3410 PMP na kg poljoprivrednog tla u kineskoj pokrajini Shaanxi dok je u blizini Valencije u Španjolskoj određeno 930–1100 čestica/kg tla.^{34,35} Na površini mora u Tihom oceanu izmjerene su koncentracije u rasponu od 640–42000 čestica/km² dok se u mediteranskim morima taj broj penje do 100000 čestica/km².^{36,37} U

navedenim istraživanjima detektirane su različite vrste plastičnih polimera, a najčešće polistiren PS, PE, PP, PET i PVC.^{38,39} Osim razlika u kemijskom sastavu i veličini, čestice plastike pronađene u okolišu razlikuju se i u morfologiji. Najčešće pronađeni oblici su vlakna, fragmenti i filmovi a oblik koji postižu ovisi o uvjetima pri kojim dolazi do trošenja plastike u okolišu.⁴⁰

2.2. Interakcija čestica plastike i konvencionalnih zagađivala

Dodatni problem plastike u okolišu predstavlja mogućnost adsorpcije drugih okolišnih zagađivala na njezinu površinu.⁴¹ Velika specifična površina i hidrofobna svojstva PNP, olakšavaju adsorpciju različitih organskih onečišćivača, poput policikličkih aromatskih ugljikovodika iz ispušnih plinova vozila, polikloriranih bifenila koji nastaju kao otpad u elektroindustriji, polibromiranih difenil etera i pesticida.⁴² Isto tako, pokazano je kako se mnogi farmaceutici, uključujući antibiotike, nesteroidne protuupalne lijekove i antidepresive mogu akumulirati na površini PMP i PNP,^{43–45} kao i teški metali.^{46,47} Adsorpcija okolišnih zagađivala najviše je proučavana na česticama PS, PE, PVC i PET.

Mnogi parametri iz okoliša kao i fizikalno-kemijska svojstva čestica plastike utjecati će na interakciju s drugim kemikalijama u okolišu. Kao jedan od najvažnijih čimbenika ističe se pH vrijednost sustava o kojoj će ovisiti reaktivnost funkcionalnih skupina pojedinih zagađivala ali i površinski naboj čestica plastike.⁴⁸ Nadalje, ionska jakost sustava utjecati će na stupanj agregacije čestica plastike a samim time i na proces adsorpcije. Također, na površini plastike može doći do nastajanja biofilma koji se ponaša kao barijera i inhibira adsorpciju drugih molekula. Uz navedene okolišne čimbenike, utjecaj na adsorpciju svakako imaju i svojstva polimera od kojih su sačinjene čestice plastike. Kristaliničnost polimera određuje njegova mehanička, termička i difuzijska svojstva o kojima će interakcija značajno ovisiti. Isto tako, o tipu polimera odnosno funkcionalnim skupinama koje ga čine, ovisi površinski naboj čestica plastike, polarnost i reaktivnost površine.⁴⁹ Sterička svojstva pojedinog polimera također treba uzeti u obzir. U okolišnim uvjetima važnu ulogu ima i stupanj raspada plastike. Kao što je spomenuto u ranijim poglavljima, u okolišu plastika podliježe mnogim fizikalno-kemijskim procesima koji utječu na njezina svojstva. Oksidacijom u okolišu dolazi do uvođenja novih funkcionalnih skupina u strukturu polimera koje će utjecati na afinitet adsorpcije.⁵⁰ Veličina samih čestica svakako je parametar koji treba uzeti u obzir prilikom razmatranja ovakvih interakcija. Manje čestice imaju veću tendenciju za agregiranje što može utjecati na brzinu i kapacitet adsorpcije.

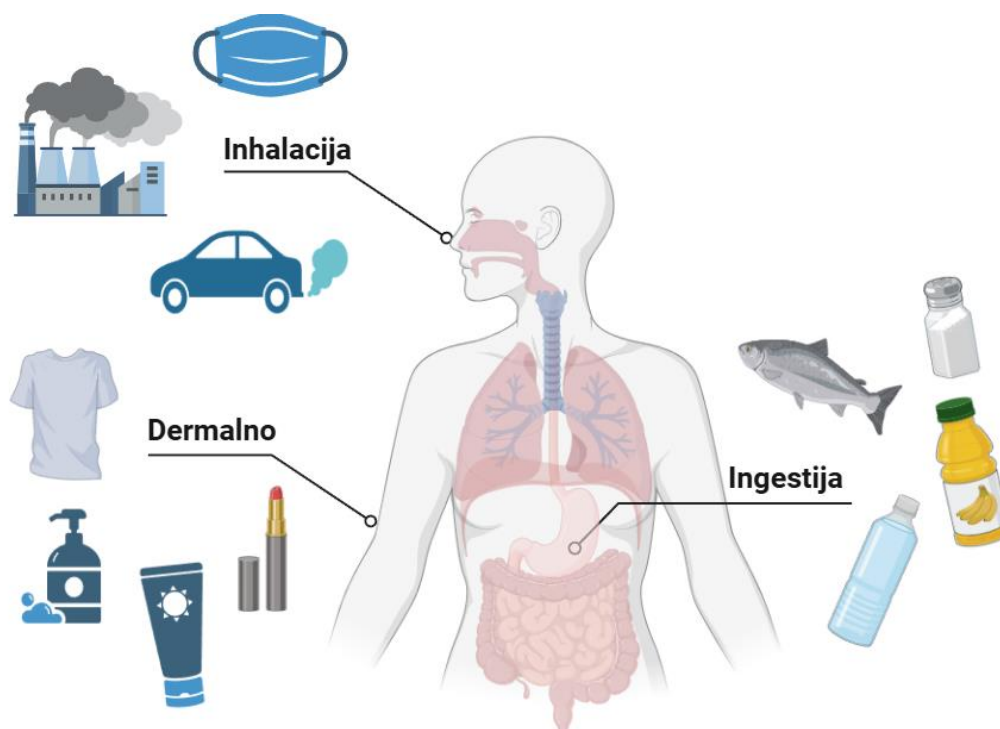
Interakcije kojima se odvija adsorpcija pretežno su hidrofobne i elektrostatske ali mogu se ostvariti i druge nekovalentne interakcije poput vodikovih veza, π - π interakcija ili van der Waalsovih sila. Vrsta i jakost interakcija ovisiti će o prirodi polimera i kemijskim svojstvima zagađivala koje se adsorbira.

Zbog velikog afiniteta adsorpcije, plastične čestice olakšavaju transport zagađivala u okolišu a mehanizmi takvih interakcija nisu u potpunosti razjašnjeni što otežava procjenu rizika PMP i PNP za okoliš i ljudsko zdravlje jer se u obzir trebaju uzeti učinci, aktivnost i toksičnost kompleksnih smjesa odnosno kombinacije plastike i štetnih kemikalija.

2.3. Ljudska izloženost plastici i učinak na zdravlje

Budući da je okoliš u potpunosti kontaminiran česticama plastike, neizbježan je njezin ulazak u hranidbeni lanac čovjeka. Prethodna istraživanja pokazala su da postrojenja za pročišćavanje voda uklanjaju otprilike 80% plastike a ostatak konzumiramo u vodi. Nedavno ispitivanje koncentracije plastike u flaširanoj vodi pokazalo je da broj čestica plastike može doseći 100000/L vode a prisutnost plastike detektirana je i u gaziranim pićima.⁵¹⁻⁵³ Zagađenje okoliša rezultiralo je i prisutnošću plastike u uzorcima ribe i morskih plodova, soli, meda, vrećica čaja i ostalog.⁵⁴⁻⁵⁶ Iz svega navedenog može se zaključiti da je jedan od glavnih puteva ljudske izloženosti plastici upravo unos hrane i pića. Osim toga, ljudi su izloženi inhalaciji čestica plastike iz zraka i unošenju dermalnim putem odnosno nošenjem odjeće ili korištenjem proizvoda za osobnu njegu (slika 2).⁵⁷ Procijenjeno je kako odrasla osoba u prosjeku godišnje konzumira između 39000 i 52000 čestica plastike, odnosno 5 g tjedno a ta je količina i veća kod industrijskih radnika.⁵⁸

Interakcija ljudskog organizma s plastikom potvrđena je studijama koje su detektirale različite PMP i PNP u ljudskim uzorcima. Primjerice, tehnikom plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (engl. *gas chromatography - mass spectrometry*, GC-MS) izmjerene su koncentracije čestica manjih od 700 nm u krvi 22 zdrava sudionika istraživanja.⁵⁹ U krvi 17 od 22 sudionika najčešće detektirani polimeri bili su PET, PS, PE i poli(metil-metakrilat) (PMMA) a koncentracija PP bila je ispod limita kvantifikacije. Najveće koncentracije određene su u slučaju PE (7,1 $\mu\text{g/mL}$), PS (4,8 $\mu\text{g/mL}$) i PET (2,4 $\mu\text{g/mL}$). Ovom studijom dokazano je da ljudska izloženost plastici rezultira adsorpcijom u krvotok, a vjerojatno je da se putem krvotoka čestice plastike mogu transportirati do organa.



Slika 2. Putevi ljudske izloženosti PNP. Kreirano u programu BioRender.

Prolazak PMP kroz krvno-moždanu barijeru potvrđen je njihovom detekcijom u ljudskom mozgu. Nihart i suradnici su već spomenutom GC-MS tehnikom odredili koncentracije PMP akumulirane u uzorcima mozga iz 2016. i 2024. godine.⁶⁰ Medijan koncentracije PMP u uzorcima iz 2016. godine je 3345 μg PMP/g tkiva, dok je u slučaju 2024. godine 4917 μg PMP/g tkiva. Takav rezultat posljedica je prethodno opisanog porasta proizvodnje plastike zadnjih godina a samim time i veće izloženosti ljudi. Mjerena je koncentracija 12 različitih polimera a najčešće su detektirani PE, PP i PVC. U istoj studiji mjerena je koncentracija PMP u uzorcima jetre i bubrega a rezultati su također pokazali veću koncentraciju u uzorcima iz 2024. godine nego u onima iz 2016. godine. Činjenicu da je inhalacija jedan od puteva ljudske izloženosti plastici, potvrdili su Jenner i suradnici detekcijom PMP u uzorcima ljudskih pluća.⁶¹ Analiza uzoraka provedena je infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier transform infrared spectroscopy*, FTIR), a određene su koncentracije 12 polimera u različitim zonama pluća. Nadalje, čestice plastike pronađene su i u reproduktivnom sustavu odnosno testisima i sjemenoj tekućini ali i u probavnom sustavu odnosno uzorcima debelog crijeva.^{62,63} Dermalni kontakt potvrđen je kao jedan od načina izloženosti u studiji koja je pokazala prisutnost plastike na koži lica i ruku.⁶⁴

Od navedenih studija posebno zabrinjavajuće su one koje detektiraju prisutnost plastike u posteljici te ukazuju na mogućnost prolaska placentne barijere.^{65,66} Naglasak ovih studija je na prikupljanju informacija o izvorima i ponašanju PMP u posteljici te procjeni zdravstvenih učinaka na rani razvoj fetusa. Zajedno s time, prisutnost PMP u majčinom mlijeku potiče na produbljivanje znanja o učincima plastike na osjetljive skupine poput dojenčadi.⁶⁷

Za potpuno razumijevanje učinaka plastike na ljudsko zdravlje, prethodno moraju biti razjašnjeni mehanizmi apsorpcije, distribucije, metabolizma i izlučivanja (engl. *absorption, distribution, metabolism, excretion, ADME*).⁶⁸ Izlučivanje putem gastrointestinalnog trakta potvrđeno je analizom ljudskog izmeta a mnoge studije pokazale su da je plastika prisutna i u urinu.^{69,70} Iako ograničeni, podaci o apsorpciji, distribuciji i izlučivanju plastike iz organizma postoje, a ono što svakako treba dodatno istraživati je metabolizira li se plastika i na koji način u ljudskom organizmu.

Iako su mnogobrojne studije dokazale da je ljudski organizam u interakciji s plastikom, učinci na ljudsko zdravlje i posljedice takvih interakcija nisu razjašnjeni. Ponašanje takvih čestica ovisi o njihovoj veličini, površinskoj funkcionalizaciji i vrsti molekula s kojom stupaju u interakciju.⁷¹ Veličina PNP smatra se ključnim faktorom o kojem ovise apsorpcija, bioakumulacija, biodistribucija a time i toksičnost PNP. Poznato je kako manje čestice imaju veću specifičnu površinu, reaktivnije su i lakše prolaze biološke barijere, što ih čini potencijalno opasnijim od PMP.⁷² Unatoč tome, broj istraživanja koja proučavaju PNP daleko je manji od onih koja se bave PMP što se može pripisati nedostatku adekvatnih tehnika za njihovu vizualizaciju i kvantifikaciju u različitim biološkim uzorcima. Također, iako je dokazano da toksičnost može ovisiti o tipu polimera, veličini i obliku, sferične PMP i PNP polistirena najčešći su predmet istraživanja zbog njihove dostupnosti i jednostavnosti funkcionalizacije površine.^{73,74}

Istraživanja utjecaja PMP i PNP na ljudsko zdravlje uglavnom su fokusirana na ispitivanje citotoksičnosti, imunotoksičnosti, genotoksičnosti i oksidativnog stresa.⁷⁵ *In vivo* studije na modelu štakora pokazale su da se PMP i PNP mogu akumulirati u jetri te uzrokovati upalu i metaboličke poremećaje.⁷⁶ U istraživanjima neurotoksičnosti pokazano je kako PMP prolaze krvno-moždanu barijeru i akumuliraju se u mozgu nakon sedmodnevnog tretmana oralnim putem.⁷⁷ Samo mali broj istraživanja donosi podatke o učincima plastičnih čestica na reproduktivno zdravlje, te pokazuje da PMP i PNP mogu utjecati na proizvodnju i kvalitetu spermija kod miševa kao i smanjiti razine testosterona što se smatra jednim od ključnih faktora

reproduktivne toksičnosti.^{78,79} Također, potvrđen je negativni utjecaj na sazrijevanje oocita, plodnost i razvoj embrija u ženskih miševa ali i uzrokuju fibrozu maternice izazvanu oksidativnim stresom.^{80,81} Obzirom da neke studije pokazuju da čestice plastike prolaze placentnu barijeru, važno je osim toksičnosti u roditeljskoj generaciji, ispitati i kakav je učinak na potomstvo. Yang i suradnici⁸² ispitali su tako učinak polistirenskih PMP i PNP na fetalni razvoj mozga i pokazali kako manje čestice prelaze placentnu barijeru te uzrokuju apoptozu stanica posredovanu oksidativnim stresom. Isto tako, utvrđeno je da izloženost PNP u trudnoći dovodi do smanjenja porođajne težine, hepatotoksičnosti i narušavanja spermatogeneze u novorođenčadi.⁸³ Prilikom analize takvih studija svakako treba uzeti u obzir činjenicu da su doze kojima su životinje tretirane uglavnom mnogo veće nego što su to okolišno relevantne koncentracije PMP i PNP. Nadalje, jako je važno razlučiti da je biološki učinak PMP i PNP koje nastaju trošenjem plastike u okolišu, zasigurno drugačiji nego onaj komercijalno dostupnih čestica.

Iako se intenzivno provode istraživanja mehanizama toksičnosti PMP i PNP posebice korištenjem laboratorijskih životinja i staničnih linija različitog podrijetla, dobiveni podaci i dalje su nedostatni za adekvatnu procjenu rizika.

2.4. Endokrini disruptori

Endokrino disruptivne kemikalije (EDC, engl. *endocrine disrupting chemicals*) definirane su kao tvari koje utječu na funkciju hormonskog sustava i tako uzrokuju štetne učinke na ljudsko zdravlje.⁸⁴ Njihovo djelovanje može utjecati na sintezu, metabolizam, eliminaciju i transport prirodnih hormona zaslužnih za održavanje homeostaze.⁸⁵ Mehanizmi kojima EDC djeluju vrlo su kompleksni i uključuju interakcije s različitim hormonskim receptorima poput androgenog (AR), estrogenog (ER), tiroidnog (TR) i progesteronskog (PR). Jedan od načina djelovanja je direktna interakcija s hormonskim receptorom koja vodi do stimulacije (agonizam) ili inhibicije (antagonizam) aktivnosti receptora.⁸⁶ Rezultat interakcija tih kemikalija s organizmom su poremećaji metabolizma, živčanog, kardiovaskularnog i reproduktivnog sustava.⁸⁷ Posljedica takvih poremećaja je razvoj bolesti poput dijabetesa, pretilosti i neplodnosti ali i povećani rizik od razvoja hormonski ovisnih tumora.⁸⁸⁻⁹⁰

Istraživanje EDC dobilo je snažan zamah nakon takozvane krize dietilstilbestrola (DES) koja se i danas smatra jednom od najvećih šteta nanesenih od strane medicinske terapije. DES je sintetski estrogen koji je bio prepisivan trudnicama za sprječavanje pobačaja i drugih

komplikacija u trudnoći u razdoblju od 1940. do 1971. godine.⁹¹ Njegovo pozitivno djelovanje postalo je upitno pojavom prvih dokaza o povezanosti njegove primjene sa širokim rasponom defekata u potomaka izloženih majki. U ženskih potomaka uočena je pojava rijetkog oblika adenokarcinoma svijetlih stanica rodnice u dobi od 13 do 24 godine dok se u muških potomaka izloženost DES-u očitovala u većoj učestalosti genitalnih abnormalnosti.⁹² Kod žena kojima je bio prepisivan, kao i kod njihovih ženskih potomaka, uočeno je i povećanje rizika od razvoja tumora dojke. Posljedice izloženosti uočene su i kod treće generacije žena koje su uzimale DES a neka istraživanja ispituju i učinak na četvrtu generaciju.⁹³ DES katastrofa i drugi slični slučajevi imali su snažan utjecaj na regulatorne agencije što je rezultiralo uvođenjem strožih protokola za testiranje reproduktivne toksičnosti, teratogenosti i endokrino-disruptivnih učinaka kemikalija.

U skupinu EDC svrstane su kemikalije poput pesticida, ftalata, lijekova, konzervansa i proizvoda za osobnu njegu koji svoju primjenu nalaze u različitim područjima.⁹⁴ Mnoge kemikalije koje se koriste prilikom proizvodnje plastike za poboljšanje njezinih svojstava, ostvaruju endokrino disruptivno djelovanje. Zbog svoje široke primjene, te kemikalije stalno su prisutne u okolišu a ljudi su neprestano izloženi njihovim učincima korištenjem različitih proizvoda ili unosom hrane i pića.⁹⁵ Kontinuirani rast znanstveno utemeljenih dokaza koji povezuju EDC s negativnim učincima na zdravlje ljudi doveo je do usvajanja dva strateška dokumenta: Rezolucije Europskog parlamenta o sveobuhvatnom okviru EU-a za endokrine disruptore (2019/2683(RSP)) i Komunikacije Komisije o endokrinim disruptorima.^{96,97} Dodatno, regulatorne odredbe o endokrinim disruptorima obuhvaćene su Uredbom REACH (engl. *Registration, Evaluation, Authorization, and Restriction of Chemicals*) kojom se utvrđuju postupci za prikupljanje i procjenu informacija o opasnostima tvari.⁹⁸ Europska agencija za kemikalije (engl. *European Chemicals Agency*, ECHA) oformila je Stručnu skupinu za endokrine disruptore (engl. *Endocrine Disruptor Expert Group*) koja provodi evaluaciju prikupljenih informacija i provodi procjenu rizika za odabrane kemikalije. Agencija za zaštitu životne sredine Sjedinjenih Država (engl. *United States Environmental Protection Agency*, U.S. EPA) razvila je Program testiranja endokrinih disruptora (engl. *Endocrine Disruptor Screening Programme*, EDSP) koji se sastoji od dvije razine testiranja endokrino-disruptivnih učinaka. Prva razina uključuje ispitivanje utjecaja kemikalija na signale puteve različitih hormona pomoću *in vitro* i *in vivo* modela. U slučaju ostvarivanja negativnih učinaka na prvoj razini, pristupa se drugoj razini ispitivanja koja uključuje detaljnije istraživanje utjecaja reproduktivne

i razvojne toksičnosti. Takva istraživanja provode se na nekoliko generacija animalnih modela kako bi se dobio uvid o utjecajima na tijek trudnoće, razvoj ploda i postnatalni razvoj potomaka.⁹⁹

U Europi je na snazi OECD program *Conceptual Framework for the Screening and Testing of Endocrine Disrupting Chemicals* koji uključuje standardizirane metode za ispitivanje endokrino-disruptivnih učinaka. Program se sastoji od validiranih protokola za različita *in vitro* i *in vivo* ispitivanja podijeljenih u pet razina.^{100,101} Prva razina uključuje prikupljanje informacija o fizikalno-kemijskim svojstvima kemikalije koja se ispituje, a u drugoj razini provode se *in vitro* ispitivanja. *In vitro* smjernice temelje se na korištenju različitih staničnih linija kao modelnih sustava za određivanje afiniteta vezanja određenih kemikalija na receptore te ispitivanje aktivacije ili inhibicije ER, AR i TR.¹⁰¹ Treća razina ispitivanja uključuje *in vivo* ispitivanja kratkoročne toksičnosti i protokole za uterotropni i Hershberger test koji se provode korištenjem malih sisavaca kao laboratorijskih životinja.^{102,103} Toksičnost nakon ponavljanja doze 28 ili 90 dana, reproduktivna i razvojna toksičnost uslijed različitih puteva izloženosti ispituju se u četvrtoj razini. Zadnja razina sastoji se od ispitivanja toksičnosti u dvije generacije i uglavnom se provodi korištenjem zebra ribica kao animalnog modela.

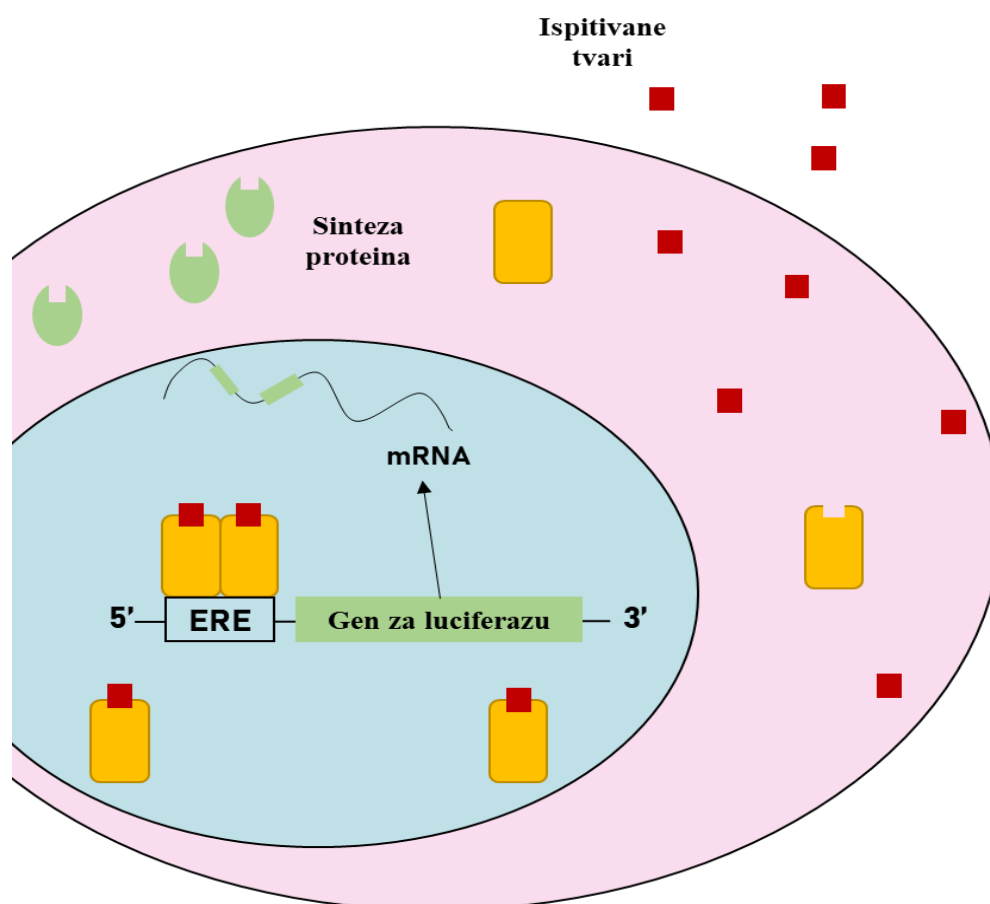
Korištenje validiranih smjernica nužno je kako bi se osigurala dosljednost u provođenju ispitivanja učinaka na ljudsko zdravlje i interpretaciji dobivenih rezultata. Također, osim složenih mehanizama djelovanja, EDC otežavaju procjenu rizika zbog toga jer često ne prate klasičnu koncentracija-odgovor dinamiku te moguće latencije između izloženosti i odgovora. Navedeni razlozi osobito naglašavaju važnost validacije protokola za istraživanje ovakvih kemikalija.^{104,105} Prilikom izrade ovog doktorskog rada korištene su tri smjernice OECD-a koje spadaju u drugu razinu ispitivanja i detaljnije su opisane u idućem poglavlju.

2.4.1. Ispitivanje endokrino-disruptivnog potencijala *in vitro*

Razvoj *in vitro* testova za ispitivanje učinaka EDC od izuzetne je važnosti jer takvi testovi predstavljaju bržu i jednostavniju analizu velikog broja uzoraka istodobno u usporedbi s testiranjem na laboratorijskim životinjama. Također, zbog modifikacija staničnih linija uvođenjem ili isključivanjem specifičnih gena za pojedine receptore, moguće je dobiti visoko selektivne sustave i poboljšati razumijevanje mehanizama kojim EDC djeluju.¹⁰⁶

Smjernica OECD-a broj 455 validirani je protokol je za određivanje agonista i antagonista ER.¹⁰⁷ Interakcija kemikalija koje se ponašaju poput estrogena s ER može utjecati na

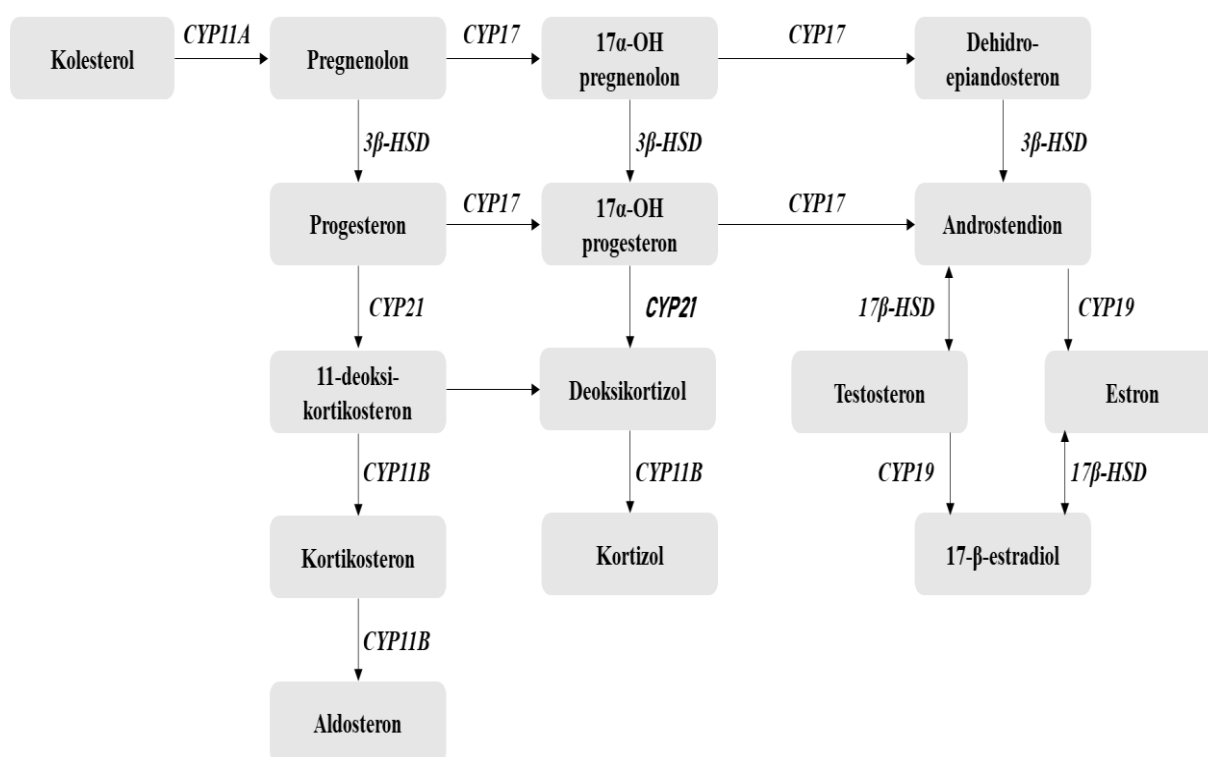
transkripciju gena koje kontrolira estrogen i time inducirati ili inhibirati stanične procese ključne za proliferaciju stanica, fetalni razvoj i reproduktivno zdravlje. Estrogeni djeluju kroz dva glavna tipa receptora: ER α i ER β , pri čemu je većina modela za određivanje aktivacije ER razvijena za nuklearni ER α . Na Slici 3 prikazan je shematski prikaz principa testa bioluminiscentne aktivnosti luciferaze. Proces započinje vezanjem liganda na ER i dimerizacijom dva ER s vezanim ligandima. Tako dimerizirani receptori vežu se u jezgri na element odgovora na estrogen (engl. *estrogen responsive element*, ERE) na konstrukt reporterskog gena te aktiviraju ekspresiju gena za luciferazu. Dodavanjem supstrata luciferina detektira se prisutnost sintetizirane luciferaze i dolazi do pojave luminiscentnog signala čija je jačina proporcionalna aktivnosti ER. Kao *in vitro* modele za aktivaciju i inhibiciju ER, smjernica OECD-a predlaže jednu od tri stanične linije: HeLa-9903, VM7Luc ili ER α CALUX. Sve tri stanične linije imaju ugrađen reporterski gen za luciferazu i detekcija aktivacije ER odvija se na način prikazan na slici 3.



Slika 3. Shematski prikaz vezanja liganda na ER i aktivacija kaskade koja rezultira produkcijom luciferaze. Izrađeno u programu PowerPoint.

Ispitivanje aktivacije i inhibicije AR opisano je u smjernici OECD-a broj 458.¹⁰⁸ Ta metoda razvijena je za detekciju agonista i antagonista AR s mjerenjem luciferazne aktivnosti kao krajnje točke testa. Princip metode isti je kao u prethodno opisanom slučaju ER. Nakon vezanja liganda, kompleks receptor-ligand premješta se u jezgru gdje se veže za specifičan DNK element odgovora i aktivira ekspresiju gena za luciferazu što povećava staničnu ekspresiju enzima luciferaze. Dodatkom supstrata luciferina potvrđuje se prisutnost luciferaze i mjeri se luminiscencija produkta.

Određivanje utjecaja pojedinih kemikalija na produkciju steroidnih hormona validirano je postupcima opisanim u smjernici OECD-a broj 456.¹⁰⁹ Ispitivanje se provodi na *in vitro* modelu koji koristi NCI-H295R staničnu liniju, odabranu zato što eksprimira sve enzime koji sudjeluju u procesu sinteze steroidnih hormona (slika 4). Uz određivanje koncentracije pojedinog steroidnog hormona moguće je utvrditi i promjene u ekspresiji gena koji kataliziraju reakcije uključene u proces steroidogeneze.



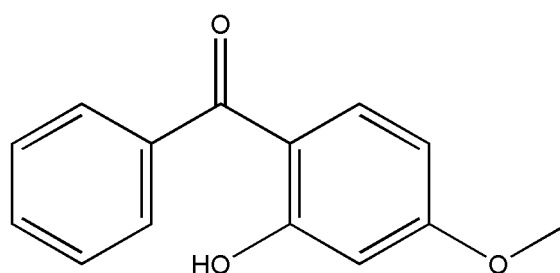
Slika 4. Shematski prikaz procesa steroidogeneze. Preuzeto i prilagođeno iz smjernice OECD-a 456 (ref. 109).

2.4.2. Ispitivanje učinaka smjesa

Iako su učinci pojedinačnih kemikalija na zdravlje čovjeka intenzivno istražuju, sve je veći naglasak regulatornih agencija na važnosti proučavanja toksikoloških učinaka složenih smjesa budući da to predstavlja realniji scenarij ljudske izloženosti. U tu svrhu razvijeno je nekoliko metodoloških okvira za ispitivanje potencijalno štetnih učinaka smjesa.^{110,111} Unatoč tome, broj dostupnih istraživanja koja se bave učincima kompleksnih smjesa i dalje je ograničen. Razlog tome je što su procesi procjene rizika za kompleksne smjese izrazito dugotrajni i opsežni. Problemi s kojima se suočavaju znanstvenici prilikom proučavanja smjesa započinju već kod dizajna eksperimenta. Parametri poput odabira doze i vremena izloženosti kao i adekvatna metoda za kvalitativnu i kvantitativnu analizu kompleksnih smjesa neke su od odluka koje se trebaju donijeti. Dodatni izazov kod proučavanja smjesi različitih kemikalija predstavlja interpretacija dobivenih rezultata. Interakcije u koje stupaju komponente smjese opisuju se kao aditivne, sinergističke ili antagonističke. Kao aditivni učinak opisuje se onaj u kojem komponente smjese djeluju istim mehanizmom te se njihovi pojedinačni učinci zbrajaju.¹¹² Sinergističko odnosno antagonističko djelovanje podrazumijevaju jače odnosno slabije djelovanje u odnosu na aditivni učinak. Za analizu koriste se modeli adicije koncentracije i nezavisne akcije. Odabir modela ovisi o dizajnu eksperimenta, ispitivanim koncentracijama pojedinih komponenti te o broju komponenti u smjesi.

2.4.3. Oksibenzon

Oksibenzon ili benzofenon-3 (BP-3) je kemijski spoj koji se koristi kao filter ultraljubičastog (UV, engl. *ultraviolet*) zračenja u kremama za sunčanje, kozmetičkim i proizvodima za osobnu njegu (slika 5). Osim toga, upotrebu nalazi kao UV stabilizator u proizvodima za premazivanje, punilima i bojama.^{113,114} Budući da je uporaba tih proizvoda, posebice krema za sunčanje, značajno porasla zadnjih godina, u porastu je i koncentracija oksibenzona u okolišu.^{115,116}



Slika 5. Struktura oksibenzona. Izrađeno u programu ChemDraw.

U nekim istraživanjima procijenjeno je da se kroz kožu apsorbira oko 4% oksibenzona iz primijenjenih krema za sunčanje a ostatak se ispire i završava u okolišu.^{117–119} Posljedica nakupljanja u vodenim ekosustavima su dugoročni štetni učinci na mnoge organizme uključujući koraljne grebene, ribe i druge morske organizme. Dokazano je kako oksibenzon i ostali UV filteri poput oktokrilena uzrokuju izbjeljivanje koralja i oštećuju reproduktivno zdravlje morskih organizama zbog čega je njegova upotreba u mnogim zemljama zabranjena.^{120–122} Toksični učinci na druge vrste potaknuli su istraživanja utjecaja na ljudsko zdravlje te ograničavanje i regulaciju upotrebe oksibenzona u kozmetičkim i drugim proizvodima. Primjerice, američka Agencija za hranu i lijekove (FDA, engl. *Food and Drug Administration*) ograničila je koncentraciju oksibenzona kao aktivnog sastojka u proizvodima za sunčanje na 6%.¹²³ Europska komisija je na temelju mišljenja EU Znanstvenog odbora za sigurnost potrošača (SCCS, engl. *Scientific Committee on Consumer Safety*) regulirala koncentracije oksibenzona prema kategorijama proizvoda. U proizvodima poput krema za lice i ruke dozvoljeni je udio oksibenzona od 6% dok je u kremama i sprejevima za tijelo taj udio 2,2%.^{124,125} Također, ECHA provodi postupke procjene ovog spoja kao endokrinog disruptora.¹²⁶ Zajednički istraživački centar (engl. *Joint Research Centre*, JRC) Europske komisije svrstava oksibenzon na popis tvari koje su potencijalno opasne za vodeni ekosustav a za koje dostupni podaci nisu dovoljni da bi se zaključilo o stvarnom riziku koji predstavljaju (engl. *surface water Watch List*).¹²⁷

Prisutnost oksibenzona potvrđena je u ribi i morskim plodovima, vodi za piće, sokovima i gaziranim pićima.^{128–131} S obzirom na to, ljudi su izloženi unosom hrane i pića i dermalnim putem prilikom korištenja proizvoda za zaštitu od sunca i kozmetike. Dokazano je kako ovaj spoj prolazi kožnu i placentnu barijeru te je njegova prisutnost potvrđena u ljudskoj plazmi, serumu, urinu, tkivu dojke, majčinom mlijeku i amnionskoj tekućini.^{132–136} Spomenuta istraživanja izazivaju zabrinutost zbog nerazjašnjenih rizika za ljudsko zdravlje ali i potiču dodatna ispitivanja štetnih učinaka ovog spoja na različitim modelnim sustavima. U studijama u kojima su ispitivane razine tiroidnih i spolnih hormona nakon topikalne primjene krema za sunčanje koje sadržavaju oksibenzon, pokazano je kako nema značajne razlike u koncentracijama hormona prije i nakon primjene.^{137,138} Broj radova koji su ispitivali učinke oksibenzona u ljudi nakon primjene očekivano je malen, ali mnogo je studija istraživalo njegova endokrino disruptivna svojstva *in vitro* pomoću različitih staničnih linija i *in vivo* na nekoliko životinjskih vrsta.¹³⁹ Da oksibenzon može ostvariti učinak poput estrogena i antiandrogena

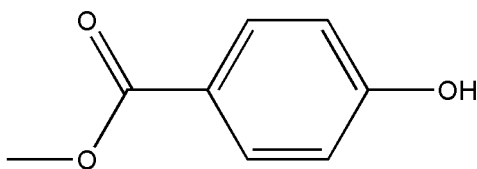
dokazano je uterotrofnim testom provedenim na štakorima i miševima nakon oralne primjene.^{140,141} Studije provedene na ribama pokazale su estrogenu aktivnost, reproduktivnu toksičnost i poremećaje u razini spolnih hormona ali u koncentracijama većim od okolišno relevantnih (16 µg/L).^{142,143} *In vitro* studije rezultirale su sličnim ishodima. Na estrogen-ovisnim MCF-7 i estrogen-neovisnim MDA-MB-21 staničnim linijama tumora dojke ostvaren je estrogeni učinak.^{140,144,145} Nadalje, pokazano je agonističko djelovanje na ER i antagonističko na AR različitim metodama poput transaktivacijskog testa na receptorskim modelima.^{146–149}

2.4.4. Metilparaben

Metilparaben često je korišten konzervans u hrani, proizvodima za osobnu njegu, kozmetičkim i farmaceutskim pripravcima (slika 6).^{150,151} Koristi se sam ili u kombinaciji s drugim parabenima a u kozmetici je najčešće primjenjivani antimikrobni konzervans. Europska komisija u veljači 2024. godine objavila je mišljenje SCCS-a u kojem se navodi da je sigurna koncentracija metilparabena kao konzervansa u kozmetici do 0,4%.¹⁵² Suprotno tome, FDA nije postavila specifičnu maksimalnu dozu metilparabena jer ga smatra sigurnim u koncentracijama koje se uobičajeno koriste u kozmetičkim pripravcima. Kao i oksibenzon, ECHA i ovaj spoj procjenjuje kao endokrini disruptor.¹⁵³ Ipak, nijedno od navedenih regulatornih tijela ne pokriva okolišni aspekt sigurnosti metilparabena a njegova široka primjena dovela je do zagađenja tla, zraka, površinskih i podzemnih voda.^{154–156} Međutim, trenutno se ne nalazi na prethodno spomenutom popisu JRC-a odnosno na „*Watch listi*“ površinskih voda.

Putevi kojima su ljudi izloženi metilparabenu su ingestija, inhalacija i dermalni put. Budući da je izloženost neizbježna ne iznenađuje činjenica da je njegova prisutnost detektirana u plazmi, urinu, tkivu dojke i posteljice.^{157–161} Što se prethodnih istraživanja tiče, endokrino disruptivna svojstva metilparabena pokazana su *in vitro* i *in vivo*. Sun i suradnici¹⁶² ispitali su estrogeni učinak metilparabena uz pomoć laboratorijskih štakora u koncentracijama koje odgovaraju prihvatljivom dnevnom unosu (engl. *acceptable daily intake*, ADI). Rezultati uterotrofnog testa pokazali su povećanje mase maternice štakora što upućuje na estrogeni učinak metilparabena *in vivo*. Slični rezultati dobiveni su nakon provođenja istog testa uz pomoć laboratorijskih miševa.¹⁶³ Ispitivanjem endokrino-disruptivnog profila metilparabena u *in vitro* uvjetima, dobiveno je da metilparaben promovira estrogen ovisnu proliferaciju MCF-7 stanica i inducira luciferaznu aktivnost u MLVN stanica.^{164,165} Također, istraživanjem steroidogeneze s NCI-

H295R stanicama uočeno je da tretman metilparabenom uzrokuje povećanje koncentracije estradiola i testosterona.¹⁶⁴ Sposobnost inhibicije AR ispitana je mjerenjem luciferazne aktivnosti 2933Y stanica nakon tretmana i pokazano je kako metilparaben ostvaruje antagonistički učinak na AR.¹⁶⁶



Slika 6. Struktura metilparabena. Izrađeno u programu ChemDraw.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

U radu su korištene sljedeće kemikalije:

- nanočestice polistirena promjera 50 nm, PSNP 50 nm, CD Bioparticles
- nanočestice polistirena promjera 150 nm, PSNP 150 nm, CD Bioparticles
- nanočestice polistirena promjera 350 nm, PSNP 350 nm, CD Bioparticles
- nanočestice polietilena promjera 50 nm, PENP 50 nm, CD Bioparticles
- nanočestice polietilena promjera 350 nm, PENP 350 nm, BAM
- nanočestice polipropilena promjera 50 nm, PPNP 50 nm, CD Bioparticles
- nanočestice polipropilena promjera 180 nm, PPNP 180 nm, BAM
- nanočestice polietilentereftalata promjera 80 nm, PET, ICP-CSIC
- fetalni goveđi serum, FBS, Sigma Aldrich
- antibiotik higromicin B, InvivoGen
- antibiotik zeocin, InvivoGen
- DMEM-F/12 stanični medij, Gibco
- DMEM stanični medij, Gibco
- fetalni goveđi serum pročišćen aktivnim ugljenom, CS-FBS, Sigma Aldrich
- antibiotik kanamicin sulfat, Sigma Aldrich
- antibiotik penicilin streptomycin, Sigma Aldrich
- ITS+ Premix, Corning
- tripsin-etilendiamintetraoctena kiselina, tripsin-EDTA, Sigma Aldrich
- boja tripan plavo, Sigma Aldrich
- metilparaben ($\geq 99\%$), Sigma Aldrich
- oksibenzon ($\geq 98\%$), Sigma Aldrich
- dimetilsulfoksid (*p.a.*), DMSO, Kemika
- puferirana fiziološka otopina, PBS, Sigma Aldrich
- 5- α -dihidrotestosteron ($\geq 99\%$), DHT, Sigma Aldrich
- hidroksiflutamid ($\geq 98\%$), HF, Sigma Aldrich
- estradiol ($\geq 98\%$), Sigma Aldrich

3.2. Fizikalno-kemijska karakterizacija nanočestica plastike

Nanočestice polistirena (PSNP, 10000 mg/L) promjera 50 nm, 150 nm i 350 nm komercijalno su nabavljene od tvrtke CD Bioparticles (Shirley, NY, USA) kao i nanočestice polietilena (PENP, 10000 mg/L) i polipropilena (PPNP, 10000 mg/L) promjera 50 nm. Nanočestice polietilentereftalata (PET, 1600 mg/L) promjera 80 nm dobivene su u suradnji sa španjolskim Institutom za katalizu i petrokemiju (Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, Madrid) a postupak njihovog dobivanja objavljen je ranije.¹⁶⁷ Znanstveno-istraživačka grupa Saveznog zavoda za istraživanje i ispitivanje materijala (BAM, njem. *Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung*) iz Berlina, Njemačka, pripremila je u okviru Obzor Europa projekta PlasticsFatE (broj 965367) i ustupila za istraživanje PPNP promjera 180 nm (40 mg/L) i PENP promjera 350 nm (80 mg/L). Postupak pripreme ranije je opisan u literaturi.¹⁶⁸ Sve korištene nanočestice bile su u obliku suspenzija u deioniziranoj vodi.

U svrhu dobivanja informacija o veličini, obliku i zeta potencijalu PNP, provedena je fizikalno-kemijska karakterizacija različitim tehnikama. Hidrodinamički promjer (d_H) i njegova raspodjela određeni su metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS, engl. *dynamic light scattering*). Istom metodom praćena je i stabilnost PNP i njihovih smjesa u ultračistoj vodi i u staničnom mediju. Iako hidrodinamički promjer ne odražava stvarnu veličinu nanočestica jer uključuje i solvacijsku ovojnicu oko nanočestice koja se giba s njom, vrlo je korisna veličina koja može dati informacije o ponašanju nanočestica u različitim medijima. Metodom elektroforetskog raspršenja svjetlosti (ELS, engl. *electrophoretic light scattering*) određen je zeta potencijal nanočestica plastike, u ultračistoj vodi i mediju korištenom prilikom staničnih eksperimenata. Koncentracija svih PNP za DLS i ELS mjerenja iznosila je 10 mg/L a pripremljene su razrijeđivanjem polaznih suspenzija u ultračistoj vodi i staničnom mediju bez boje fenol crveno. Hidrodinamički promjer određen je kao srednja vrijednost 6 mjerenja za svaku koncentraciju pojedinih PNP. Mjerenja su odrađena na uređaju Zetasizer Ultra (Malvern Panalytical, Malvern, UK) a rezultati obrađeni korištenjem programskog paketa ZS Xplorer 3.21 (Malvern Panalytical).

Skenirajuća (pretražna) elektronska mikroskopija (SEM, engl. *scanning electron microscopy*) korištena je za određivanje morfologije i primarne veličine PNP. Uzorci su snimljeni pretražnim elektronskim mikroskopom s emisijom polja elektrona (FE-SEM, engl. *field emission scanning electron microscope*) na uređaju Inspect F50 (Thermo Fisher Scientific, San Diego, SAD). Svi uzorci snimljeni su u polaznim koncentracijama, bez daljnjeg razrijeđivanja. Kako bi se

osigurala kvaliteta snimki i spriječilo nakupljanje naboja na površini uzorka, za pripremu uzoraka korišteni su silicijski podlošci. Prije nakapavanja uzorka, podlošci su temeljito isprani etanolom i osušeni preko noći u čistom okruženju. Na očišćene podloške nanese se pet mikrolitara suspenzije nanočestica plastike i ponovno ostavljeno na sušenju u čistom okruženju preko noći. Budući da nanočestice plastike nisu provodljive, na njihovu površinu nanese se tanki sloj vodljivog paladija. Nakon pripreme, uzorci su snimljeni pri različitim naponima ubrzavanja elektrona i uvećanjima kako bi se dobila detaljna analiza njihove morfologije. Mjerenja su provedena na Institutu za znanost o materijalima u Zaragozi uz vodstvo dr. sc. Carlosa Cuestas-Ayllona.

3.3. Karakteristike staničnih linija

Prilikom ovog istraživanja korištene su tri stanične linije koje su služile kao modelni sustavi za ispitivanje endokrino-disruptivnog učinka nanočestica plastike i kompleksnih smjesa. Sve 3 linije predložene su odgovarajućim smjernicama OECD-a kao prikladne za ispitivanje učinka različitih kemikalija na AR, ER i proces steroidogeneze.

3.3.1. Stanična linija AR-EcoScreen GR KO M1

AR-EcoScreen GR KO M1 stanična linija komercijalno je nabavljena iz banke stanica JCRB (engl. *Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank*, Osaka, Japan). Ta stanična linija nastala je kao mutant stanične linije AR-EcoScreen izolirane iz jajnika kineskog hrčka. AR-EcoScreen stanice karakterizira stabilna ekspresija AR a transfekcijom je ugrađen reporterski gen za luciferazu. Stanična kultura uspostavljena je odmrzavanjem i nasađivanjem originalne bočice stanica u plosnatu posudu za uzgoj stanica T-25 (Sarstedt, Njemačka). Uzgoj i održavanje stanica provedeno je prema predloženom protokolu iz banke stanica. Ukratko, stanice su uzgajane u kompletnom mediju koji se sastoji od: DMEM/F-12 medija, 10% volumnog udjela fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum*, FBS), 25 µg/mL antibiotika higromicina B i 50 µg/mL antibiotika zeocina. Nakon otapanja i otprilike 90% konfluentnosti, stanice su presađene u plosnatu posudu za uzgoj stanica T-75 (Sarstedt, Njemačka) u kakvima su dalje uzgajane do eksperimenta.

3.3.2. Stanična linija HeLa-9903

HeLa-9903 stanična linija izolirana je iz karcinoma vrata maternice i komercijalno dostupna u JCRB banci stanica. Staničnu liniju karakterizira stabilna ekspresija humanog estrogenog receptora alfa (engl. *human estrogen receptor alpha*, hER α), a transfekcijom je ugrađen reporterski gen za luciferazu. Originalna bočica stanica odmrznuta je i stanice su nasađene u plosnatu posudu za uzgoj stanica T-25 a kasnije uzgajana u plosnatim posudama za uzgoj stanica T-75. Stanice su uzgajane u mediju koji se sastoji od: DMEM medija, 10% volumnog udjela FBS-a pročišćenog aktivnim ugljenom (engl. *charcoal-stripped fetal bovine serum*, CS-FBS) i 60 μ g/mL antibiotika kanamicin sulfata.

3.3.3. Stanična linija NCI-H295R

NCI-H295R stanična linija nabavljena je iz banke stanica ATCC (engl. *American Type Culture Collection*) i održavana prema protokolu. Stanična linija izolirana je iz tumora kore nadbubrežne žlijezde i važan je model za proučavanje procesa steroidogeneze. Odmrzavanjem i nasađivanjem stanica u plosnatu posudu za uzgoj stanica T-25 uspostavljena je stanična kultura. Stanice su uzgajane u mediju sljedećeg sastava: DMEM/F-12, 10% volumnog udjela FBS-a, 1% volumnog udjela otopine penicilina streptomcina te 1% volumnog udjela otopine ITS+ Premix.

3.4. Ispitivanje preživljenja stanica

Prije određivanja endokrino-disruptivnog učinka nanočestica plastike i kompleksnih smjesa na AR, ER i steroidogenezu, ispitan je utjecaj odabranih koncentracija (10, 5, 1 i 0,1 mg/L) na preživljenje stanica. Koncentracije koje će se koristiti odabrane su na temelju literature a u obzir su uzimane i polazne koncentracije suspenzija PNP.^{169,170} Budući da se interakcije s receptora mogu proučavati samo u vijabilnim stanicama, ključno je ispitivanje samo onih koncentracija koje ne oštećuju stanice i smanjuju njihovu vijabilnost. U suprotnom može doći do pogreške prilikom interpretacije rezultata. U svrhu određivanja odnosa koncentracije i preživljenja stanica, korišten je MTS test. Ta je metoda vrlo često korištena, a bazira se na redukciji žuto obojenog 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolija u smeđe obojeni formazan. Takva redukcija odvija se samo u živim i metabolički aktivnim stanicama, te se tako prema količini nastalog produkta određuje postotak živih stanica.¹⁷¹ Količina formazana određuje se mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 490 nm.

Tom metodom ispitana je vijabilnost AR-EcoScreen GR KO M1 i HeLa-9903 stanica nakon tretmana s PNP i njihovim smjesama te nakon tretmana s testnim kemikalijama metilparabenom i oksibenzonom. Također, tom metodom određen je utjecaj PNP i njihovih smjesa na preživljenje NCI-H295R stanica prije ispitivanja njihovog učinka na proces steroidogeneze.

Isti protokol pripreme stanica za eksperiment primijenjen je za sve tri stanične linije. Kada su dostigle otprilike 90% konfluentnosti u plosnatoj posudi za uzgoj stanica T-75, stanice su odvojene od podloge dodatkom 3 mL tripsin-etilendiamintetraoctene kiseline (tripsin-EDTA). Nakon odljepljivanja dodano je 7 mL kompletnog staničnog medija (opisano u poglavlju 3.2.) i centrifugirano na $300 \times g$ 5 minuta. Supernatant je odbačen a stanice su potom resuspendirane u 10 mL svježeg medija. Broj stanica određen je bojanjem stanica s bojom tripan plavo i mjerenjem na brojaču stanica (TC20 Automated Cell Counter, Bio-Rad, Hercules, SAD). Stanice su nasađene u prozirne pločice s 96 jažica (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) u volumenu od 100 μ L i koncentraciji stanične suspenzije od 4×10^4 stanica/mL. Nakon sađenja, ostavljene su 24 sata na 37°C i 5 % CO₂ u inkubatoru (HERACELL VIOS 160i, Thermo Fisher Scientific, San Diego, SAD) kako bi se prihvatile za podlogu u jažicama. Po završetku inkubacije stanični medij je uklonjen a stanice su isprane PBS-om kako bi se uklonile one koje se eventualno nisu prihvatile za podlogu. Dodan je određeni volumen svježeg staničnog medija, kao i odgovarajuće koncentracije PNP, njihovih smjesa ili testnih spojeva. Otopine metilparabena i oksibenzona pripremljene su otapanjem izvaga u dimetilsulfoksidu (DMSO) i razrijeđivanjem u vodi do željene završne koncentracije. Suspenzije nanočestica razrijeđene su do željene koncentracije osim u slučaju PPNP (180 nm) i PENP (350) koje su direktno dodavane u jažice zbog male polazne koncentracije suspenzija. Stanice koje nisu tretirane korištene su se kao negativna kontrola, dok su one tretirane 10%-tnom otopinom DMSO smatrane pozitivnom kontrolom. Po isteku 24 sata, stanični medij koji sadrži tretmane je uklonjen a stanice isprane puferiranom fiziološkom otopinom (engl. *phosphate buffered saline*, PBS) dva puta te im je dodano 100 μ L svježeg medija. MTS test proveden je sukladno uputama iz komercijalno dostupnog kompleta reagensa CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, SAD). Komplet reagensa se sastoji od MTS reagensa i otopine fenazin metosulfata (engl. *phenazine methosulfate*, PMS) koji se pomiješani u omjeru 20:1 i volumenu od 20 μ L dodaju u 100 μ L staničnog medija. Osim u jažice sa stanicama koje su prethodno tretirane, smjesa MTS-a i PMS-a dodana je u jažice koje su sadržavale samo čisti stanični medij. Dodatno, ispitane su interferencije PNP s ovom metodom na način da je dodana boja u jažice

koje su sadržavale stanični medij i PNP, bez stanica. Nakon dodavanja reagensa, pločica je inkubirana 3 sata na 37°C i 5 % CO₂ kako bi se razvila boja. Kada je boja u pločici postala stabilna, pomoću čitača mikrotitarskih pločica Victor3 (Perkin Elmer, Waltham, SAD) izmjerena je apsorbancija pri valnoj duljini od 490 nm.

3.5. Ispitivanje učinka PNP na aktivaciju receptora

3.5.1. Učinak na aktivaciju androgenih receptora

Ispitivanje aktivacije AR provedeno je pomoću *in vitro* modela koji koristi AR-EcoScreen GR KO M1 staničnu liniju i u skladu sa smjernicom OECD-a broj 458.¹⁰⁸ Nakon odmrzavanja, stanice su održavane najmanje dvije pasaže prije sađenja za pokus u mediju opisanom u poglavlju 3.2.1. U trenutku u kojem su stanice dostigle otprilike 90% konfluentnosti, odvojene su od podloge dodatkom 3 mL tripsin-EDTA otopine. Djelovanje tripsina inaktivirano je dodatkom 7 mL staničnog medija a stanična je suspenzija zatim centrifugirana na 300×g 5 minuta. Supernatant je odbačen a stanice su resuspendirane u mediju koji sadrži: DMEM/F-12 medij, 5% volumnog udjela FBS-a pročišćenog aktivnim ugljenom, 25 µg/mL antibiotika higromicina B i 50 µg/mL antibiotika zeocina. Korištenje FBS-a pročišćenog aktivnim ugljenom preporučeno je kako bi se izbjegle interferencije serumskih hormona koje mogu rezultirati lažno pozitivnim rezultatima. Koncentracija stanica od 1×10⁴ stanica po jažici nasadena je u volumenu od 100 µL u neprozirne NuncTM bijele pločice sa 96 jažica (Thermo Fisher Scientific, San Diego, SAD) i stanice su ostavljene u inkubatoru tijekom 24 sata. Nakon inkubacije, stanični je medij je uklonjen, stanice su isprane sa 100 µL PBS-a i dodan je određeni volumen svježeg medija. Volumen dodanog medija ovisio je o tome čime su stanice tretirane. U slučaju kada je ispitivan učinak PSNP (50 nm, 150 nm, 350 nm), PPNP (50 nm), PENP (50 nm) i PET, dodano je 90 µL medija i 10 µL 10 puta veće koncentracije nanočestica. Kada su stanice tretirane PPNP (180 nm) dodano je 75 µL medija i 25 µL suspenzije nanočestica koncentracije 40 mg/L a 87,5 µL medija i 12,5 µL suspenzije nanočestica (80 mg/L) prilikom tretmana s PENP (350 nm). Za ispitivanje smjesa PNP volumen medija prilagođen je sukladno broju komponenti u smjesi, na način da je smanjivan povećavanjem broja sastojaka smjese. Radne otopine PNP pripremljene su razrjeđivanjem u staničnom mediju kako bi se izbjegao suvišan dodatak vode u mediju i time ostvario citotoksični učinak. Smjese PNP dobivene su njihovim dodavanjem direktno u jažice tako da konačna koncentracija svake od komponenata

smjese bude ista. Učinak PNP na endokrino-disruptivni profil oksibenzona i metilparabena ispitan je njihovim miješanjem s PNP u određenim koncentracijama. Radne otopine tih spojeva pripremljene su otapanjem u DMSO i razrjeđivanjem u vodi do željene koncentracije. Kao pozitivna kontrola, odnosno agonist AR, korišten je 5- α -dihidrotestosteron (DHT), koji je pripremljen otapanjem u DMSO i razrjeđivanjem u sterilnoj vodi do željene koncentracije. Antagonist AR, hidroksiflutamid (HF), korišten je prilikom ispitivanja antagonističkog djelovanja na AR a pripremljen je na isti način kao i DHT. Koncentracija DHT-a u svim ispitivanjima bila je 10 nmol/L a HF-a 1 μ mol/L, kao što je predloženo u smjernici OECD-a. Antagonizam testnih spojeva ispitan je dodavanjem 500 pmol/L DHT-a u sve jažice te praćenjem smanjenja njegove luminiscencije. Nakon 24 sata inkubacije sa spojevima, stanični medij je odbačen a stanice isprane dva puta sa 100 μ L PBS-a. Nadalje, stanice su pripremljene prema uputama iz kompleta reagensa *Luciferase Assay System* (Promega, Madison, SAD) za provedbu testa bioluminiscentne aktivnosti luciferaze. Komplet reagensa sadrži supstrat i pufer za luciferazni test, kao i pufer za lizu stanica koji je potrebno razrijediti 5 puta u destiliranoj vodi prije korištenja. Svi reagensi iz kompleta reagensa za provedbu testa bioluminiscentne aktivnosti luciferaze trebaju biti termostatirani na 25°C da bi postigli temperaturu idealnu za rad enzima. Kada su stanice isprane dodano je 20 μ L razrijeđenog pufera za lizu stanica a pločica je centrifugirana pri 300 rpm 20 minuta u centrifugi Eppendorf 5810R (Eppendorf, Hamburg, Njemačka). Reagens za luciferazni test pripremljen je miješanjem supstrata u obliku liofiliziranog praha s pripadajućim puferom. Tako pripremljeni reagens stavlja se u injektorski sustav čitača mikropločica SpectraMax iD3 (Molecular Devices, San Jose, SAD). U sučelju programskog paketa postavljeni su parametri mjerenja tako da se u svaku od jažica injektira 100 μ L reagensa, pločica se trese u periodu od dvije sekunde i nakon toga slijedi mjerenje luminiscentnih signala u trajanju od 10 sekundi. Po završetku mjerenja rezultati su analizirani prema uputama iz smjernice OECD-a.

3.5.2. Učinak na estrogene receptore

Ispitivanje učinka testnih kemikalija na ER provedeno je pomoću HeLa-9903 stanične linije. Od otapanja do provođenja eksperimenata stanice su propagirane barem dvije pasaže kako bi se svojstva stanične linije stabilizirala. Kada je postignuta konfluentnost stanica od 90%, stanice su odvojene od podloge, centrifugirane i resuspendirane u istom mediju u kojem su i održavane (opisano u poglavlju 3.2.2.). U neprozirne NuncTM bijele pločice sa 96 jažica nasadeno je 1×10^4

stanica po jažici u volumenu od 100 μL i ostavljeno u inkubatoru na 3 sata. Nakon 3 sata u inkubatoru stanicama su dodane željene koncentracije testnih spojeva, bez prethodnog uklanjanja staničnog medija. Kao što je to propisano u smjernici OECD-a br. 458, sve kemikalije dodane su u volumenu od 50 μL , tako da ukupni volumen u jažici iznosi 150 μL . Radne otopine PNP pripremljene su razrjeđivanjem u staničnom mediju na način da je koncentracija radne otopine bila 3 puta veća od željene u jažici. Otopina E2 pripremljena je otapanjem u DMSO i serijskim razrjeđivanjem u istom otapalu do koncentracije od 1 $\mu\text{mol/L}$. Razrjeđivanjem te zadnje otopine u staničnom mediju dobivena je željena koncentracija E2 od 1 nmol/L koja je korištena kao pozitivna kontrola. Otopine metilparabena i oksibenzona pripremljene su otapanjem u DMSO i razrjeđivanjem u staničnom mediju do koncentracije 3 puta veće od željene. Nakon tretmana u trajanju od 24 sata, stanice su pripremljene za mjerenje kako je opisano u poglavlju 3.4.1.

3.6. Ispitivanje učinka PNP na proces steroidogeneze

U svrhu ispitivanja utjecaja PNP na sintezu spolnih hormona korištena je stanična linija NCI-H295R i protokol opisan u smjernici OECD-a br. 456. Prije samih eksperimenata stanice su uzgajane 4 pasaže u mediju opisanom u poglavlju 3.2.3. Za provođenje ovih ispitivanja stanice su nasadene u prozirne pločice s 24 jažice (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) u koncentraciji od 2×10^5 stanica po jažici u 1 mL kompletnog staničnog medija. Takva gustoća stanica odabrana je kako bi tijekom 24 sata od sađenja postigle razinu konfluentnosti u rasponu 50-60%, potrebnu za provođenje eksperimenata. Kada je prošlo 24 sata od sađenja, stanični medij je uklonjen a stanice isprane s 300 μL PBS-a. Nakon toga stanice su tretirane PNP i njihovim smjesama te forskolinom (Sigma Aldrich) i proklorazom (Sigma Aldrich) kao pozitivnom i negativnom kontrolom. Prokloraz djeluje kao inhibitor enzima *CYP17* i *CYP19* koji sudjeluju u procesu sinteze spolnih hormona, a posljedično smanjuje koncentraciju krajnjih produkata steroidogeneze odnosno testosterona i estradiola.¹⁷² Forskolin ima suprotno djelovanje, odnosno aktivira enzime u procesu steroidogeneze i stimulira sintezu testosterona i estradiola.¹⁷³ Obje kontrolne otopine pripremljene su otapanjem u DMSO i razrjeđivanjem do 10 mmol/L u slučaju forskolina te 1 mmol/L u slučaju prokloraza. Konačne koncentracije otopina pomiješane su u volumenu od 1 μL s 999 μL staničnog medija u plastičnoj tubici (Eppendorf, Hamburg, Njemačka), nakon čega je tubica vorteksirana a sadržaj dodan u odgovarajuću jažicu. Razrjeđivanjem polaznih suspenzija PNP u staničnom mediju

pripremljene su njihove potrebne koncentracije u volumenu od 1 mL koji je direktno dodavan u jažice. Inkubacija s testnim spojevima u slučaju ovog eksperimenta trajala je 48 sati. Nakon inkubacije stanični medij prikupljen je u označene plastične tubice koje su pohranjene u zamrzivaču na -80°C da bi se očuvala stabilnost steroidnih hormona čija će se koncentracija u tom mediju određivati. Stanicama koje su ostale u jažici izolirana je RNA a postupak je opisan u idućem poglavlju.

3.6.1. Određivanje ekspresije gena lančanom reakcijom polimeraze

Postupak određivanja ekspresije gena uključenih u proces steroidogeneze sastoji se od nekoliko koraka. Proces započinje izolacijom ukupne RNA iz stanica koja se reverznom transkripcijom prevodi u komplementarnu DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) potrebnu za kvantitativnu lančanu reakciju polimeraze (engl. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR).

Nakon uklanjanja staničnog medija, iz preostalih stanica izolirana je ukupna RNA pomoću kompleta reagensa Aurum Total RNA Mini (Bio-Rad, Hercules, SAD). Komplet reagensa se sastoji od pufera za lizu stanica (engl. *lysis solution*), kolonica za pročišćavanje RNA, dviju otopina za ispiranje (engl. *low and high stringency wash solution*), otopine DNAze I te otopine za eluciju RNA (engl. *elution solution*). Izolacija RNA započeta je dodatkom 350 µL pufera za lizu stanica u svaku jažicu i provjerom potpunosti lize stanica pod mikroskopom. Liziranim stanicama dodano je 350 µL 70%-tnog etanola visoke čistoće koji je prethodno razrijeđen sa sterilnom vodom bez RNA-za. Sadržaj svake jažice temeljito je izmiješan i pomoću automatske pipete prenesen u označene kolonice za pročišćavanje RNA. Kolonice su oprezno postavljene na centrifugiranje pri 12000 x g 30 sekundi. Nakon centrifuge uslijedilo je dodavanje 700 µL prve otopine za ispiranje (engl. *low stringency wash solution*) te ponovno centrifugiranje pri istim uvjetima. U svaku kolonicu zatim je dodano 80 µL otopine DNAze I nakon čega je uslijedila inkubacija na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 minuta. Po završetku inkubacije u svaku je kolonicu dodano 700 µL druge otopine za ispiranje (engl. *high stringency wash solution*) i sve su centrifugirane pri 12000 x g 30 sekundi. Nakon toga slijedilo je dodavanje 700 µL prve otopine za ispiranje i centrifugiranje pri već spomenutim uvjetima. Dodatno, nakon uklanjanja otopine, prazne kolonice su centrifugirane pri 12000 x g 2 minute da bi se osiguralo uklanjanje svih prethodno dodanih otopina. Za kraj, na kolonice je nanoseno 40 µL otopine za eluciju RNA (engl. *elution solution*) a dobivena RNA sakupljana je u plastične tubice. Kolonice su zajedno s pripadajućim tubicama centrifugirane pri 12000 x g 2 minute kako bi se eluirala

željena RNA. Iz svake tubice izdvojeno je po 5 μ L RNA u svrhu određivanja koncentracije i čistoće RNA na NanoDrop uređaju (Thermo Fisher Scientific).

Komercijalno dostupan komplet reagensa iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad) korišten je za prevođenje izolirane RNA u cDNA. U pločice za PCR s 96 jažica ispipetirano je 15 μ L razrijeđenog iScript reagensa (4 μ L reagensa i 11 μ L vode bez RNAza) i 5 μ L izolirane RNA. Jažice u pločici su zatvorene a pločica je stavljena u ThermoMixer C (Eppendorf) pomoću kojeg je provedena reakcija reverzne transkripcije. Na ThermoMixeru C namještena su 4 koraka reakcije: prvi korak 5 minuta na 25°C, zatim 20 minuta na 46°C te 1 minutu na 95°C. Kao zadnji korak postavljeno je hlađenje na 4°C da se potpuno spusti temperatura u pločici, nakon čega je pločica pohranjena u zamrzivaču na temperaturi od -20°C do provođenja PCR reakcije.

Prije samog provođenja PCR reakcije s uzorcima, koncentracije početnica odabrane prema Hilscherova et al.¹⁷² optimirane su na uzorku netretiranih stanica. Za kvantifikaciju umnažanja ciljnih gena korištena je fluorescentna boja SYBR Green (Roche, Basel, Švicarska). Početnice su pripremljene na način da je u plastične tubice PCR čistoće (Eppendorf) dodan odgovarajući volumen uzvodne (engl. *forward*) i nizvodne (engl. *reverse*) početnice ciljnog ili referentnog gena, voda bez nukleaza i 10 μ L boje SYBR Green. Slijedovi početnica i njihova priprema za reakciju prikazani su u tablici 1. Disocijacijske krivulje (slika 48 u poglavlju Dodatak) pružaju uvid u homogenost nastalih produkata PCR reakcija i specifičnost umnažanja. U pločicu za PCR s 96 jažica dodano je 5 μ L cDNA i 15 μ L reakcijske smjese odgovarajuće početnice. Osim u jažice koje su sadržavale cDNA željenih uzoraka, reakcijska smjesa svake početnice dodana je i u jažice koje su sadržavale 5 μ L vode bez nukleaza. Jažice s vodom i početnicama predstavljaju kontrolu reakcije (engl. *no template control*). Kvantitativna lančana reakcija polimeraze provedena je na uređaju Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, SAD) i sastojala se od nekoliko koraka. Za početak, pločica je inkubirana na 95°C 10 minuta nakon čega je uslijedilo 40 koraka amplifikacije u dva koraka: 95°C 15 sekundi i 60°C 60 sekundi. Po završetku amplifikacije, nastupila je disocijacijska faza u tri koraka: 95°C 15 sekundi, 60°C 60 sekundi i ponovno 95°C 15 sekundi.

Tablica 1. Slijedovi (engl. *forward*, F i *reverse*, R) i priprema početnica korištenih u reakcijskim smjesama za ispitivanje ekspresije gena uključenih u steroidogenezu.

Gen	Slijed	c (nM)	V _{F, R} (μL)	V _{vode} (μL)
CYP19	F: AGGTGCTATTGGTCATCTGCTC	400	0,8	3,40
	R: TGGTGAATCGGGTCTTTATGG			
CYP17	F: AGCCGCACACCAACTATCAG	600	1,20	2,60
	R: TCACCGATGCTGGAGTCAAC			
CYP11	F: GAGATGGCACGCAACCTGAAG	400	0,8	3,40
	R: CTTAGTGTCTCCTTGATGCTGGC			
3β-HSD	F: TGCCAGTCTTCATCTACACCAG	400	0,8	3,40
	R: TTCCAGAGGCTCTTCTTCGTG			
17β-HSD	F: TGC GGGATCACGGATGACTC	400	0,8	3,40
	R: GCCACCATTCTCCTCACAACCTC			
β-aktin	F: CACTCTTCCAGCCTTCCTTCC	200	0,4	4,20
	R: AGGTCTTTGCGGATGTCCAC			

3.6.2. Određivanje koncentracije steroidnih hormona

Koncentracija steroidnih hormona u staničnom mediju nakon tretmana NCI-H295R stanica određena je pomoću MassChrom® Steroids kompleta reagensa (Chromsystems, Gräfelfing, Njemačka) i vezanog sustava tekućinska kromatografija - tandemna spektrometrija masa (engl. *liquid chromatography tandem - mass spectrometry*, LC-MS/MS). Priprema uzoraka odrađena je prema uputama iz kompleta reagensa koji se sastoji od kolonica za pročišćavanje uzorka (engl. *sample clean up columns*), svih pufera potrebnih za pripremu uzoraka te mobilne faze za kromatografiju. Ono što nije sadržano u kompletu reagensa a potrebno je, su analitička kolona (Chromsystems) te set odgovarajućih kalibratora i kontrola (Chromsystems). Ovom su metodom određene koncentracije 6 steroidnih hormona: progesterona, 17- α -hidroksiprogesterona (17-OHP), dehidroepiandrosterona (DHEA), androstendiona, estradiola i testosterona.

Pripremi uzorka prethodila je priprema kolonica za pročišćavanje na način da je prvo u sve kolonice dodano 700 μL prvog reagensa za ekvilibraciju i centrifugirano pri 400 x g 1 minutu. Isti je postupak ponovljen s drugim ekvilibracijskim reagensom. Nadalje, u plastičnoj tubici (Eppendorf) pomiješano je 50 μL unutarnjeg standarda, 450 μL ekstrakcijskog pufera i 500 μL uzorka. Dobivena smjesa vorteksirana je 1 minutu kako bi se sve komponente dobro izmiješale. U slučaju kontrolnih uzoraka i kalibratora primijenjen je isti postupak. Nakon vorteksiranja sadržaj tubica oprezno je nanesen na označene kolonice i one su centrifugirane 400 x g 1 minutu. Dodavanjem 700 μL pufera za ispiranje u dva koraka i centrifugiranjem, prvo pri 400 x g 1 minutu a zatim pri 3000 x g 2 minute, uklonjene su eventualne nečistoće zaostale na kolonicama. Kolonice su potom prebačene u staklene posudice (Chromsystems) te im je dodano 1 mL pufera za eluciju uzorka (engl. *elution buffer*). Staklene posudice i kolonice zajedno su centrifugirane pri 400 x g 1 minutu kako bi eluat dospio u staklene posudice. Priprema uzoraka završava uparavanjem eluata u staklenim posudicama do suhog pri 50°C i otapanjem u 100 μL pufera za rekonstituciju (engl. *reconstitution buffer*). Uzorci su snimljeni na uređaju Nexera X2 (Shimadzu, Kyoto, Japan) uz prethodno validiranu metodu za određivanje koncentracije steroidnih hormona i pomoć izv. prof. dr. sc. Željka Debeljaka u KBC-u Osijek. Mobilna faza korištena je iz kompleta reagensa a njezin protok podešen je na 0,5 mL/min. Volumen injektiranja uzorka postavljen je na 40 μL . Kromatogrami pozitivne i negativne kontrole te netretiranih stanica prikazani su u Dodatku (slike 49-51).

3.7. Statistička obrada rezultata

Rezultati dobiveni DLS i ELS mjerenjima analizirani su na način da je izračunata srednja vrijednost i standardna devijacija 6 mjerenja. Preživljenje stanica, odnosno rezultati MTS testa izraženi su u odnosu na negativne kontrole i izračunati kao srednja vrijednost šest mjerenja iz dvaju neovisnih eksperimenata s odgovarajućom standardnom devijacijom. Mjerenja luciferazne aktivnosti obrađena su prema uputstvima iz odgovarajućih smjernica OECD-a. U slučaju oba receptora rezultati su izračunati kao relativna promjena u odnosu na pozitivnu kontrolu a odgovor koji su postigle same stanice, bez dodavanja tretmana, oduzet je od odgovora svih uzoraka. U slučaju ER, tretmani koji su ostvarili barem 10% aktivnosti 1 nM E2 smatrani su agonistima ER. Suprotno, u slučaju AR, za tretmane koji su inhibirali odgovor 500 pM DHT barem 30% smatralo se kako imaju antagonističko djelovanje. Koeficijenti adicije koncentracije izračunati su prema formuli preuzetoj iz rada koji su objavili Ritz i suradnici:

$$D_{DA} = E_{AB} - E_A - E_B + E_0 \quad (3.7.1)$$

gdje je D_{DA} koeficijent adicije koncentracije, E_{AB} odgovor smjese, E_A odgovor pojedinačne komponente A, E_B odgovor pojedinačne komponente B a E_0 odgovor netretiranih stanica. Ukoliko je D_{DA} vrijednost manja od 0 učinak smjese smatra se antagonističkim a suprotno, ukoliko je veća od 0 učinak je sinergistički.¹¹²

Promjene u ekspresiji gena, određene PCR tehnikom, analizirane su metodom koju su predložili Livak i suradnici.¹⁷³ Prvo je za sve uzorke izračunata vrijednost ΔC_T koja je dobivena oduzimanjem koncentracije referentnog gena u uzorku od koncentracije ciljnog gena u uzorku. Zatim se za sve uzorke izračuna $\Delta\Delta C_T$ vrijednost koja je rezultat oduzimanja koncentracije ciljnog gena u negativnoj kontroli (netretirane stanice) od koncentracije ciljnog gena u uzorku. Konačno, izračuna se $2^{-\Delta\Delta C_T}$ vrijednost koja se uspoređuje s onom izračunatom za netretirane stanice. Ta vrijednost za negativnu kontrolu iznosi 1 te ako je dobivena vrijednost za tretmane veće od 1 smatra se da je ekspresija ciljnog gena pojačana u odnosu na netretirane stanice. Suprotno, ukoliko je dobivena $2^{-\Delta\Delta C_T}$ vrijednost manja od 1, rezultat se tumači tako da tretman stanica smanjuje ekspresiju ciljnog gena. Svi eksperimenti provedeni su u triplicatima i ponovljeni dvaput a rezultati su srednja vrijednost sa standardnom devijacijom. Statistička značajnost dobivenih rezultata ispitana je metodom ANOVA (engl. *analysis of variance*). Nakon toga, pomoću Dunettovog post-hoc testa, utvrđeno je postoje li statistički značajne razlike između tretiranih i netretiranih stanica. Nakon analize uzoraka medija iznad stanica tretiranih različitim PNP tekućinskom kromatografijom dobiveni rezultati prikazani su kao koncentracija steroidnog hormona. Za određivanje statističke značajnosti korištena je ANOVA a za utvrđivanje razlike u odnosu na netretirane stanice korišten je Dunettov post-hoc test.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Fizikalno-kemijska svojstva nanočestica plastike

Određivanje hidrodinamičkog promjera i zeta potencijala PNP provedeno je metodama raspršenja svjetlosti, DLS i ELS. Primarno su ta svojstva određena u ultračistoj vodi koja je disperzni medij za sve vrste PNP. Uz to, mjerenja su prvo odrađena u ultračistoj vodi kako bi se veličina PNP usporedila s onom iz certifikata analize dostavljenog s njima. Tablica 2 prikazuje dobivene rezultate za hidrodinamički promjer, zeta potencijal i indeks polidisperznosti (engl. *polydispersity index*, PDI). Rezultati ukazuju kako je dobiveni d_H u skladu s veličinama PNP iz njihovih certifikata. Zeta potencijal svih PNP osim PS50 i PS150 niži je od -30 mV što upućuje na koloidnu stabilnost.¹⁷⁴

Tablica 2. Hidrodinamički promjer (d_H), indeks polidisperznosti (PDI) i zeta potencijal (ζ) nanočestica polistirena, polietilena, polipropilena i polietilentereftalata određeni u ultračistoj vodi. Mjerenja su provedena pri $\Theta = 25^\circ\text{C}$ odmah nakon razrijeđivanja suspenzije do koncentracije 10 mg/L.

Vrsta nanočestica	Ultračista voda, $t = 0$ h		
	d_H (nm)	PDI	ζ potencijal (mV)
PS50	$47,3 \pm 0,7$	0,1	$-6,1 \pm 0,2$
PS150	$208,4 \pm 6,6$	0,2	$-5,2 \pm 1,2$
PS350	$401,4 \pm 29,5$	0,3	$-42,8 \pm 1,1$
PE50	$62,5 \pm 0,8$	0,1	$-52,7 \pm 1,0$
PE350	$351,1 \pm 14,2$	0,2	$-32,6 \pm 1,6$
PP50	$53,7 \pm 0,9$	0,2	$-43,4 \pm 2,9$
PP180	$186,0 \pm 1,7$	0,1	$-31,1 \pm 0,5$
PET	$86,5 \pm 0,9$	0,1	$-62,4 \pm 0,8$

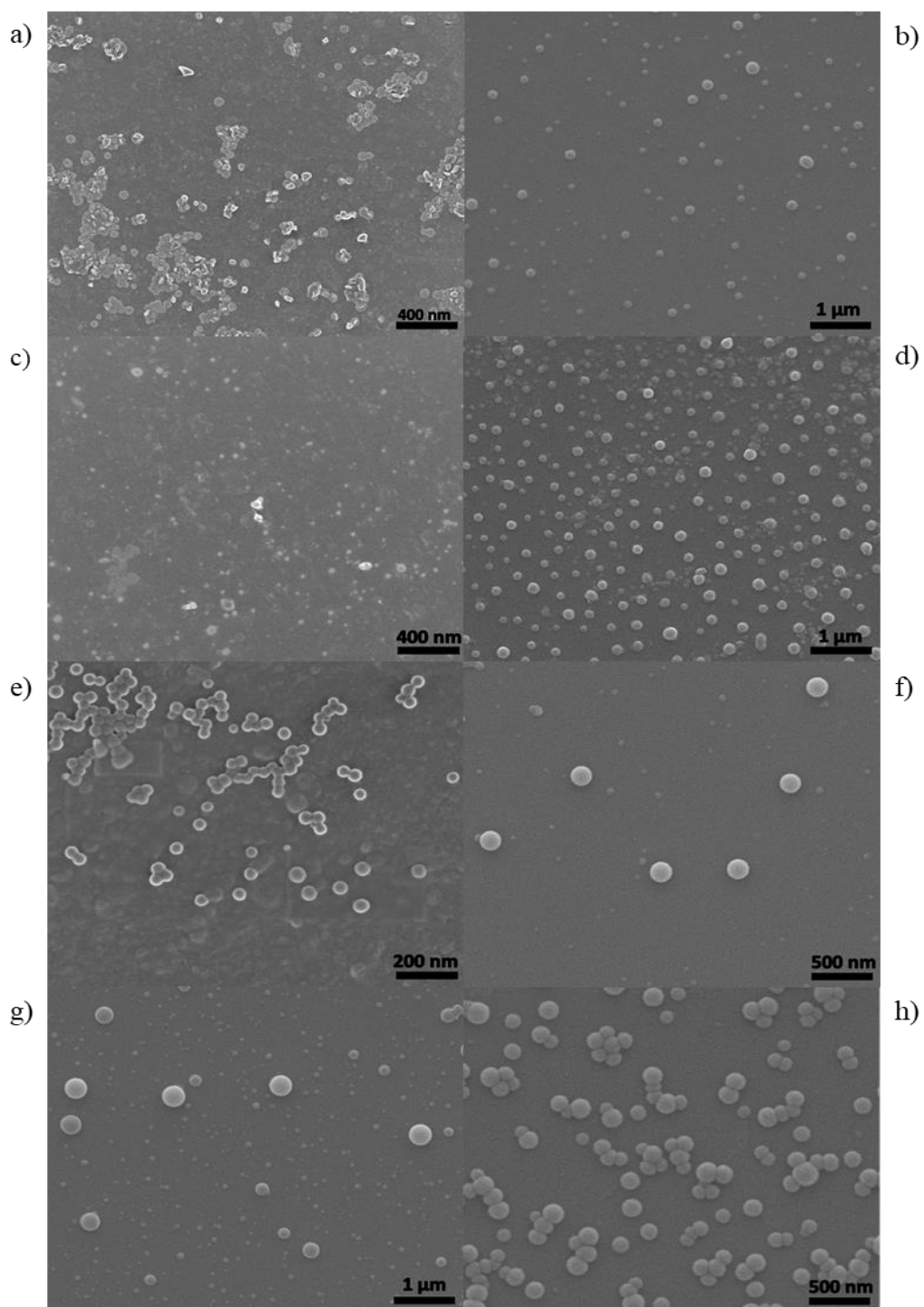
Kako bi se što bolje procijenilo ponašanje nanočestica prilikom tretmana stanica, hidrodinamički promjer i zeta potencijal određeni su i u staničnom mediju (MEM bez fenol crvenog + 5% FBS-a pročišćenog aktivnim ugljenom). Budući da veličina, oblik, površinski naboj i funkcionalizacija površine nanočestica utječu na njihovu interakciju sa stanicama, važno je proučavati njihova svojstva u biološkim medijima.¹⁷⁵ Izloženost nanočestica biološkom mediju rezultira njihovom interakcijom s proteinima iz medija i nastajanjem proteinske korone. Zbog adsorpcije proteina iz medija, hidrodinamički promjer nanočestica određen u staničnom mediju biti će veći od onoga određenog u vodi.¹⁷⁸ Sastav proteinske korone mijenja se s vremenom te ovisi o svojstvima nanočestica i proteina iz medija. Iz navedenih razloga, stabilnost PNP u staničnom mediju evaluirana je i nakon 24 sata koliko je trajanje tretmana stanica u eksperimentima aktivacije receptora. U tablici 3 prikazani su dobiveni rezultati koji ukazuju da su vrijednost d_H u staničnom mediju veće u odnosu na one u ultračistoj vodi što se može objasniti nastajanjem proteinske korone na PNP.¹⁷⁵

Također, osim u slučaju PPNP 50 nm i smjese MIX350, može se uočiti kako ne dolazi do značajnih razlika u promjeru nakon 24 sata što upućuje na stabilnost u staničnom mediju. Za PPNP 50 nm i smjesu MIX350 može se zaključiti da dolazi do agregiranja u 24 sata. PDI vrijednosti veće su u usporedbi s vrijednostima dobivenim mjerenjem u ultračistoj vodi što se može objasniti detektiranjem proteina prisutnih u staničnom mediju. Usporedbom vrijednosti zeta potencijala iz tablice 2 i 3 očite su razlike kod svih PNP osim PSNP 50 nm i PSNP 150 nm. Zeta potencijal određen u ultračistoj vodi za sve PNP osim PSNP 50 nm i PSNP 150 nm negativniji je što upućuje na veću koloidnu stabilnost tih čestica u ultračistoj vodi u odnosu na stanični medij.

Tablica 3. Hidrodinamički promjer (d_H), indeks polidisperznosti (PDI) i zeta potencijal (ζ) nanočestica polistirena, polietilena, polipropilena i polietilentereftalata određeni u staničnom mediju. Mjerenja su provedena odmah po pripremi suspenzije i 24 sata nakon. Koncentracija svih PNP je bila 10 mg/L a mjerenja su odrađena pri $\Theta = 25^\circ\text{C}$.

Vrsta nanočestica	CCM, $t = 0$ h			CCM, $t = 24$ h		
	d_H (nm)	PDI	ζ potencijal (mV)	d_H (nm)	PDI	ζ potencijal (mV)
PS50	$58,5 \pm 6,4$	0,3	$-11,5 \pm 1,6$	$56,0 \pm 6,2$	0,4	$-8,0 \pm 0,8$
PS150	$483,1 \pm 34,6$	0,9	$-10,0 \pm 0,3$	$451,7 \pm 36,7$	0,5	$-9,5 \pm 1,8$
PS350	$774,2 \pm 66,0$	0,7	$-9,9 \pm 0,6$	$702,5 \pm 35,0$	0,7	$-7,1 \pm 0,5$
PE50	$81,1 \pm 5,0$	0,5	$-10,4 \pm 2,2$	$86,0 \pm 2,5$	0,5	$-8,4 \pm 0,8$
PE350	$377,4 \pm 11,7$	0,6	$-16,4 \pm 1,2$	$377,7 \pm 7,1$	0,6	$-16,2 \pm 1,3$
PP50	$67,5 \pm 5,2$	0,5	$-6,4 \pm 2,2$	$113,2 \pm 20,4$	0,7	$-3,4 \pm 1,6$
PP180	$226,4 \pm 7,8$	0,2	$-14,0 \pm 0,4$	$225,2 \pm 4,1$	0,2	$-12,8 \pm 1,5$
PET	$121,9 \pm 3,9$	0,3	$-11,7 \pm 0,4$	$119,0 \pm 6,3$	0,3	$-7,3 \pm 0,9$
MIX 50	$119,6 \pm 1,5$	0,2	$-13,3 \pm 0,7$	$110,7 \pm 2,1$	0,2	$-13,3 \pm 2,4$
MIX 150	$192,6 \pm 18,0$	0,2	$-11,4 \pm 1,1$	$193,7 \pm 8,9$	0,2	$-12,4 \pm 0,6$
MIX 350	$354,5 \pm 33,6$	0,6	$-13,7 \pm 1,1$	$665,5 \pm 35,3$	0,6	$-16,2 \pm 0,6$

Oblik PNP određen je pomoću SEM-a. Iz slike 7 vidljivo je kako su sve PNP osim PENP 50 nm i PPNP 50 nm, sferičnog oblika. U slučaju PENP 50 nm i PPNP 50 nm vidi se da je morfologija mješovita. Zastupljene su čestice sferičnog oblika ali zasigurno je veći broj onih čiji je oblik nepravilan.



Slika 7. SEM slike: a) PENP 50 nm, b) PENP 350 nm, c) PPNP 50 nm, d) PPNP 180 nm, e) PSNP 50 nm, f) PSNP 150 nm, g) PSNP 350 nm i h) PET.

4.2. Učinak PNP na stanično preživljenje

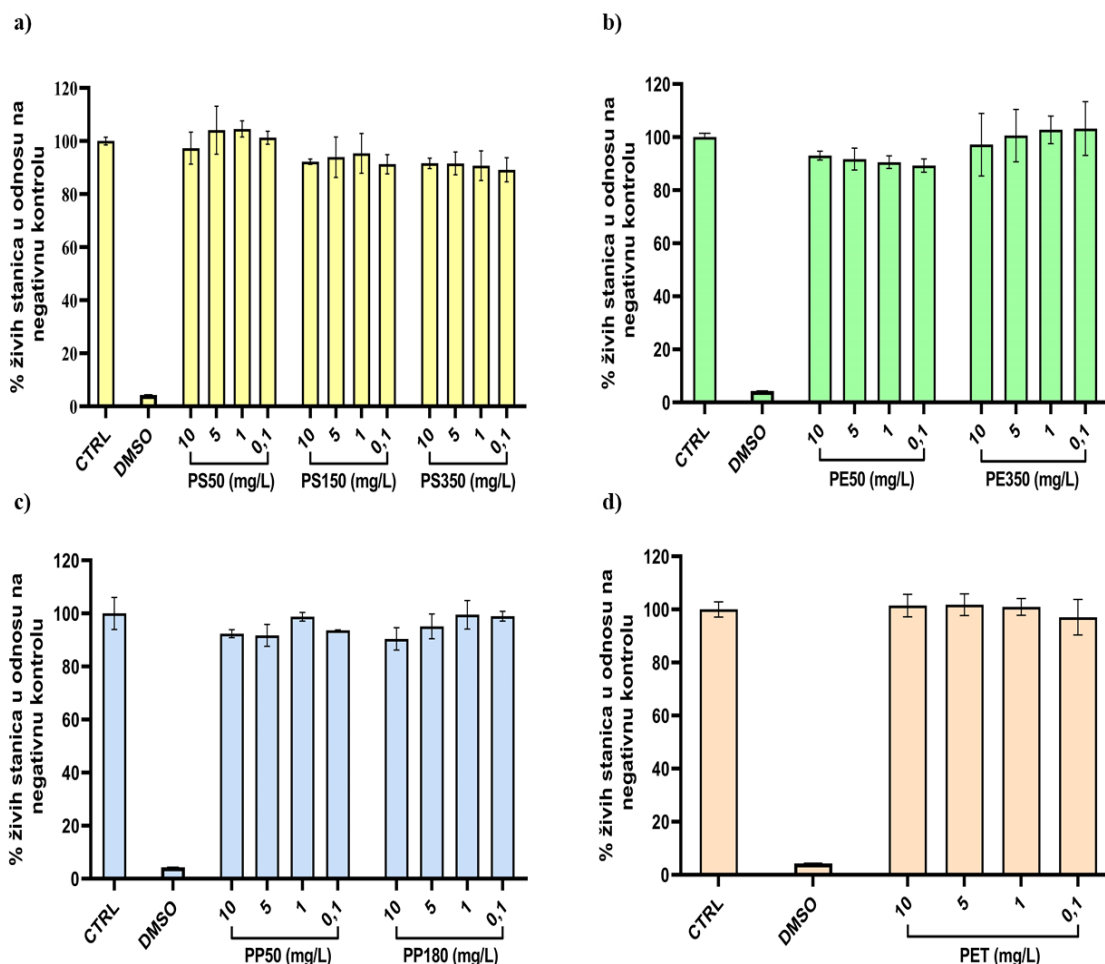
Kako bi se ispitala sigurnost odabranih koncentracija PNP za stanice, proveden je MTS test. Citotoksičnost željenog koncentracijskog raspona PNP i njihovih smjesa ispitana je na obje stanične linije koje su korištene kao modeli receptora. Uz to, prije pokusa steroidogeneze, potvrđena je sigurnost tih koncentracija za NCI-H295R stanice. Osim navedenog, toksičnost oksibenzona i metilparabena ispitana je za modele AR i ER. Kriterij koji je korišten za određivanje netoksičnosti neke koncentracije je da tretman ne smanjuje vijabilnost stanica ispod 90% u odnosu na negativnu kontrolu, odnosno netretirane stanice.

S obzirom da nanomaterijali mogu interferirati s mnogim *in vitro* testovima, posebice kolorimetrijskim, ispitana je mogućnost interferencija s MTS testom.^{176,177} Način na koji je provedeno ispitivanje interferencija je dodavanje pojedine PNP i smjesa u stanični medij s bojom i uspoređivanje apsorbancije s apsorbancijom samog staničnog medija. Budući da je apsorbancija u oba slučaja bila jednaka može se zaključiti kako PNP ne reagiraju s MTS reagensom i time ne utječu na rezultate testa. Dodatno, pretragom literature utvrđeno je kako je MTS često korištena metoda pri ispitivanju citotoksičnosti PNP.¹⁷⁸ Iz navedenih razloga, a i zbog velikog broja uzoraka, korišten je MTS test kao visokoprotlačna metoda u usporedbi s protlačnom citometrijom koja daje više informacija.

4.2.1. AR-EcoScreen stanična linija

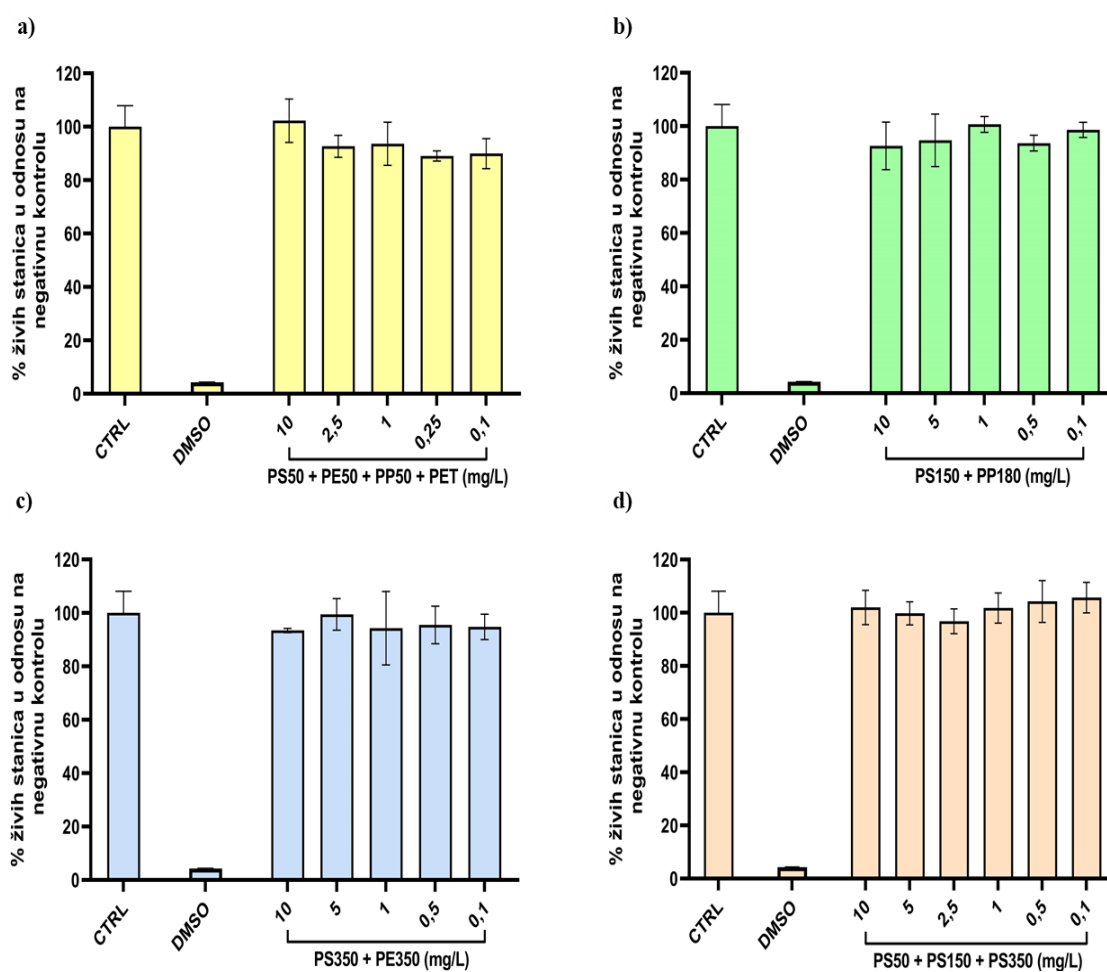
Slika 8. prikazuje rezultate MTS testa provedenog na AR-EcoScreen GR KO M1 stanicama nakon 24-satnog tretmana s različitim PNP u koncentracijama 10, 5, 1 i 0,1 mg/L. Iz navedenih rezultata vidljivo je da nijedna vrsta PNP u ovim koncentracijama nije toksična za stanice. U nedavnoj studiji van Boxel i suradnici¹⁷⁹ testirali su toksičnost PSNP različitih veličina i koncentracija na ovoj staničnoj liniji i pokazali su kako PSNP promjera 50 nm nisu toksične čak ni u koncentraciji od 100 mg/L. Također, Lu i suradnici¹⁸⁰ određivali su toksičnost PSNP promjera 100 i 500 nm u koncentracijama 5, 10, 25, 50 i 100 mg/L na endotelnim stanicama pupčane vrpce HUVEC. Njihovi rezultati pokazali su kako navedene koncentracije ne smanjuju značajno vijabilnost stanica u periodu inkubacije od 24 sata. Nadalje, citotoksičnost PENP ispitana je MTS testom na 9 različitih staničnih linija s najvećom koncentracijom od 200 mg/L i pokazalo se kako ni u jednom slučaju nema značajnog smanjenja vijabilnosti stanica.¹⁸¹ U istraživanju Božičević i suradnika¹⁷⁰ ispitana je toksičnost PPNP protlačnom citometrijom u koncentracijama 10, 1, 0,1, 0,01 i 0,001 mg/L na staničnoj liniji T47D-KBluc. Nakon tretmana

s najvećom koncentracijom PNP 84% stanica je bilo živo i ta je koncentracija korištena u ostalim eksperimentima.



Slika 8. Preživljenje AR-EcoScreen GR KO M1 stanica nakon tretmana s 10, 5, 1 i 0,1 mg/L: a) PSNP 50, 150 i 350 nm, b) PENP 50 i 350 nm, c) PPNP 50 i 180 nm i d) PET. Rezultati su prikazani kao postotak živih stanica u odnosu na negativnu kontrolu a dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

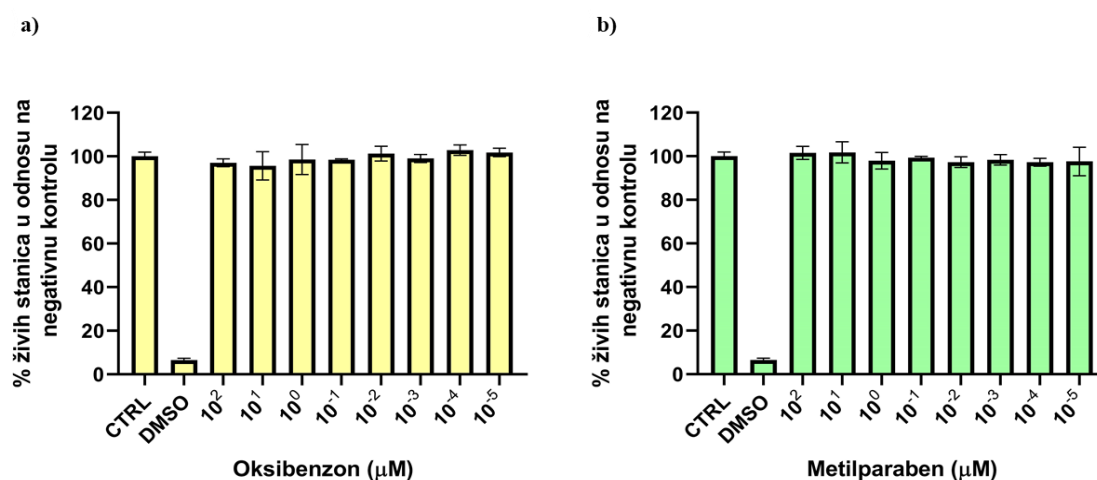
Na slici 9. prikazani su rezultati preživljenja stanica uslijed tretmana s različitim smjesama PNP. Smjese su pripremljene dodatkom svake pojedine PNP na način da konačna koncentracija svake u jažici bude ista. Očito je kako se čak ni u takvim uvjetima vijabilnost stanica ne smanjuje ispod 90%. Iz tog razloga sve koncentracije navedenih smjesa korištene su u daljnjim eksperimentima.



Slika 9. Preživljenje AR-EcoScreen GR KO M1 stanica nakon tretmana s: a) smjesom PSNP 50 nm, PENP 50 nm, PPNP 50 nm i PET, b) smjesom PSNP 150 nm i PPNP 180 nm, c) smjesom PSNP 350 nm i PENP 350 nm i d) smjesom PSNP 50, 150 i 350 nm. Rezultati su prikazani kao postotak živih stanica u odnosu na negativnu kontrolu a dobiveni su iz tripplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

Citotoksičnost oksibenzona i metilparabena u rasponu koncentracija od 10^2 do 10^{-5} μM prikazana je na slici 10. Postotak živih stanica u odnosu na negativnu kontrolu nije se smanjio uslijed tretmana s navedenim koncentracijama. Testirani raspon koncentracija odabran je prema prethodnim ispitivanjima toksičnosti tih spojeva na *in vitro* modelima.^{164,166} Veće koncentracije spojeva nisu ispitivane zbog slabe topljivosti spojeva u vodi, stoga nije bilo moguće odrediti LD₅₀ (engl. *lethal dose* 50) odnosno koncentraciju koja ubija 50% stanica. *In vivo* ispitivanja toksičnosti metilparabena nakon oralne primjene odredila su LD₅₀ od 2100 mg/kg tjelesne mase

na štakorskom modelu a za oksibenzon razina bez opaženog štetnog učinka (engl. *no observed adverse effect level*, NOAEL) iznosila je 411 mg/kg tjelesne mase.^{124,152}

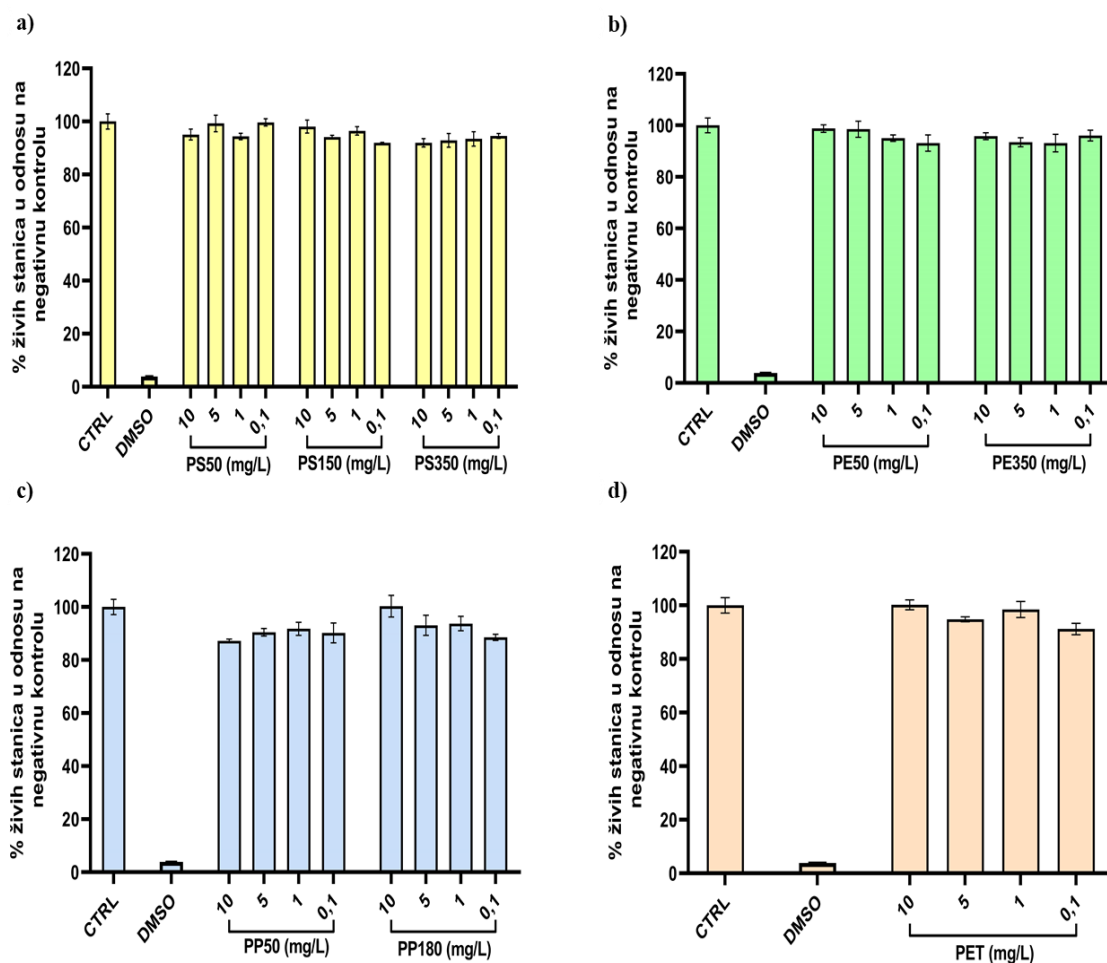


Slika 10. Preživljenje AR-EcoScreen GR KO M1 stanica nakon tretmana s: a) oksibenzonom i b) metilparabenom. Rezultati su prikazani kao postotak živih stanica u odnosu na negativnu kontrolu a dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

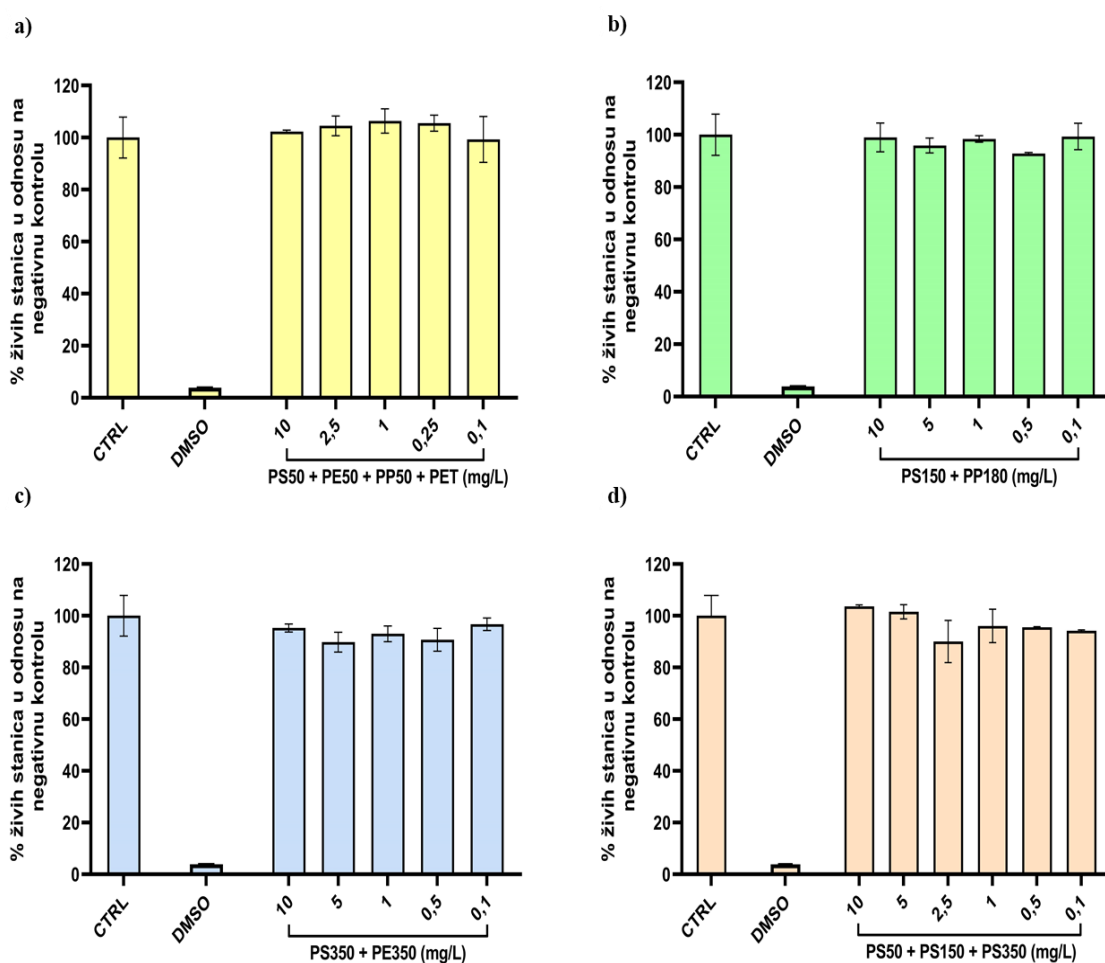
4.2.2. HeLa-9903 stanična linija

Slike 11. i 12. prikazuju rezultate MTS testa provedenog na HeLa-9903 staničnoj liniji. Pokazano je kako koncentracije samostalnih PNP od 10, 5, 1 i 0,1 mg/L ne smanjuju vijabilnost stanica ispod 90%. U istraživanju toksičnosti smjesa PNP ispitane su koncentracije od 10, 2,5, 1, 0,25 i 0,1 mg/L u slučaju MIX50 (PSNP 50 nm, PENP 50 nm, PPNP 50 nm i PET), 10, 5, 1, 0,5, 0,1 mg/L u slučaju MIX150 (PSNP 150 nm i PPNP 180 nm) i MIX350 (PSNP 350 nm i PENP 350 nm) te 10, 5, 2,5, 1, 0,5, 0,1 mg/L u slučaju MIXPS (PSNP 50, 150 i 350 nm). Navedene smjese pripremljene su na način da je svaka pojedina PNP dodana u jažicu tako da joj konačna koncentracija odgovara prethodno spomenutima. Nijedna od ispitivanih smjesa nije pokazala toksičnost odnosno smanjila postotak živih stanica u odnosu na negativnu kontrolu na manje od 90%. Iz navedenog razloga sve su koncentracije korištene u eksperimentima aktivacije receptora. Ruan i suradnici ispitivali su citotoksičnost PSNP različitih veličina (10, 15, 25, 40, 50 i 500 nm) u koncentracijama od 1, 10, 20, 40, 80, 100, 200 i 500 mg/L koristeći HeLa staničnu liniju.¹⁸² Dobiveni rezultati, u skladu s prijašnjima, pokazali su da su manje PSNP toksičnije od većih. PSNP veličine 40, 50 i 500 nm nisu pokazale značajno smanjenje vijabilnosti ni u jednoj od testiranih koncentracija, dok je koncentracija od 500 mg/L PSNP promjera 25 nm smanjila vijabilnost za 10%. U slučaju PSNP promjera 15 nm već je

koncentracija od 80 mg/L značajno smanjila vijabilnost a kod najmanjih PSNP promjera 10 nm čak i 40 mg/L. Također, pokazali su kako toksičnost su manje PSNP uzrokovale nastajanje reaktivnih kisikovih vrsta (engl. *reactive oxygen species*, ROS) što je i pretpostavljeni mehanizam njihove toksičnosti. Njihovi rezultati u dobrom su slaganju s dobivenima jer pokazuju netoksičnost PSNP u testiranom koncentracijskom rasponu i veličinama.

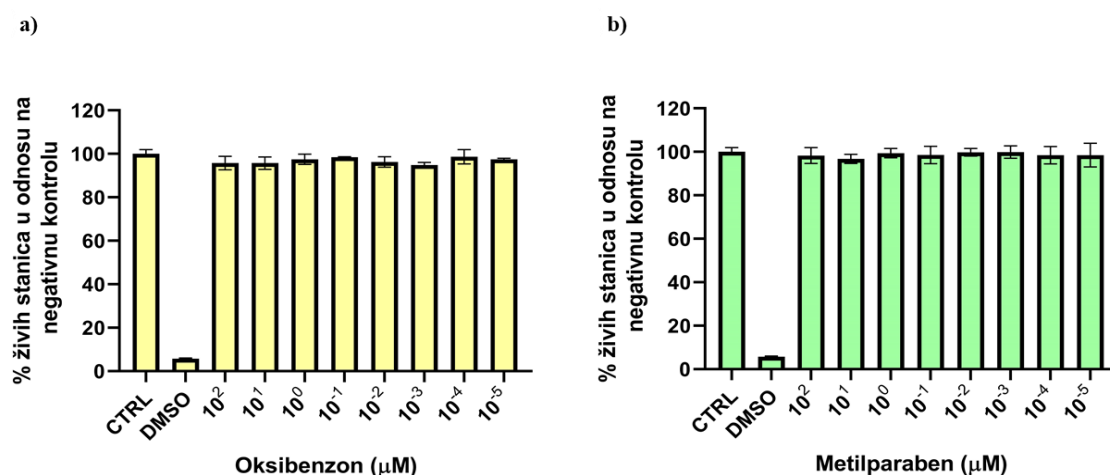


Slika 11. Preživljenje HeLa-9903 stanica nakon tretmana s 10, 5, 1 i 0,1 mg/L: a) PSNP 50, 150 i 350 nm, b) PENP 50 i 350 nm, c) PPNP 50 i 180 nm i d) PET. Rezultati su prikazani kao postotak živih stanica u odnosu na negativnu kontrolu a dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.



Slika 12. Preživljenje HeLa-9903 stanica nakon tretmana s: a) smjesom PSNP 50 nm, PENP 50 nm, PPNP 50 nm i PET, b) smjesom PSNP 150 nm i PPNP 180 nm, c) smjesom PSNP 350 nm i PENP 350 nm i d) smjesom PSNP 50, 150 i 350 nm. Rezultati su prikazani kao postotak živih stanica u odnosu na negativnu kontrolu a dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

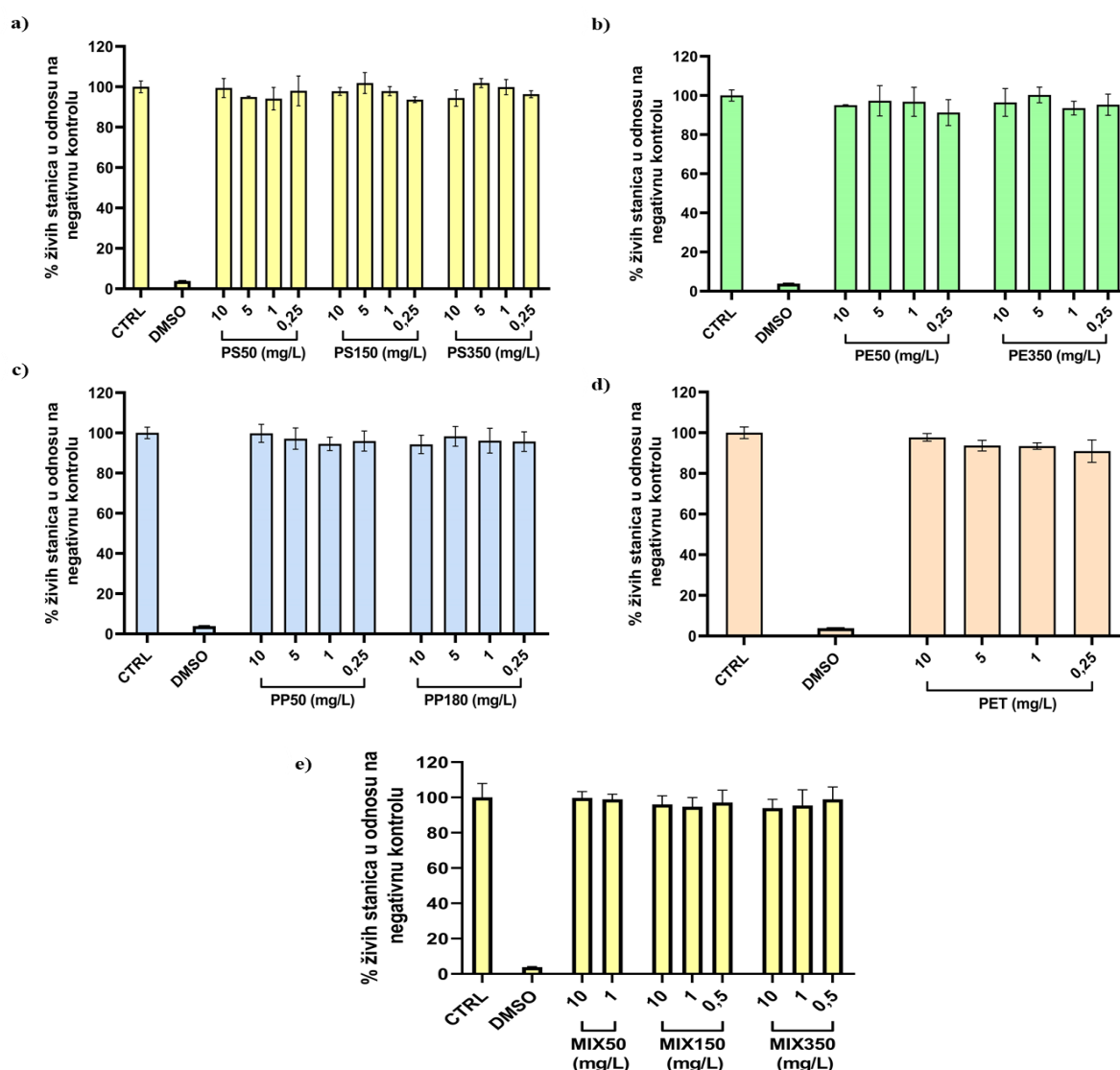
Prije ispitivanja utjecaja PNP na endokrino diruptivni profil metilparabena i oksibenzona, njihova je citotoksičnost testirana zasebno. Utjecaj spomenutih kemikalija na preživljenje HeLa-9903 stanica prikazan je na slici 13. Iz prikazanih rezultata može se zaključiti kako raspon koncentracija od 10^2 do 10^{-5} μM ne narušava vijabilnost stanica i može se koristiti u daljnjim eksperimentima.



Slika 13. Preživljenje HeLa-9903 stanica nakon tretmana s: a) oksibenzonom i b) metilparabenom. Rezultati su prikazani kao postotak živih stanica u odnosu na negativnu kontrolu a dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

4.2.3. NCI-H295R stanična linija

MTS test korišten je i za određivanje preživljenja NCI-H295R stanica uslijed tretmana s PNP i njihovim smjesama. Same PNP korištene su u koncentracijama od 10, 5, 1 i 0,25 mg/L a koncentracije smjesa MIX150 i MIX350 bile su 10, 1 i 0,5 mg/L. Stanice su tretirane smjesom MIX50 u koncentracijama 10 i 1 mg/L. Slika 14. prikazuje dobivene rezultate iz kojih je očito kako ni same PNP, ni odabrane smjese, ne smanjuju vijabilnost stanica ispod 90%. Iz tog razloga sve koncentracije bile su sigurne za korištenje u ispitivanju utjecaja PNP i njihovih smjesa na proces steroidogeneze. Dobiveni rezultati u skladu su s nedavnim ispitivanjem koje je potvrdilo netoksičnost PSNP za NCI-H295R stanice u ovim koncentracijama.¹⁷⁹ Naime, jedina značajna promjena u vijabilnosti bilo je povećanje uslijed tretmana s 100 mg/L PSMP veličine 1 μM. Koncentracije od 100, 10, 1, 0,1 i 0,01 mg/L u slučaju čestica PS promjera 50 i 200 nm te 10 μM nisu uzrokovale nikakvu značajnu promjenu u vijabilnosti.



Slika 14. Preživljenje NCI-H295R stanica nakon tretmana s: a) PSNP 50, 150 i 350 nm, b) PENP 50 i 350 nm, c) PPNP 50 i 180 nm, d) PET i e) smjesama MIX50, MIX150 i MIX350. Rezultati su prikazani kao postotak živih stanica u odnosu na negativnu kontrolu a dobiveni su iz tripplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

4.3. Učinak PNP na aktivaciju receptora

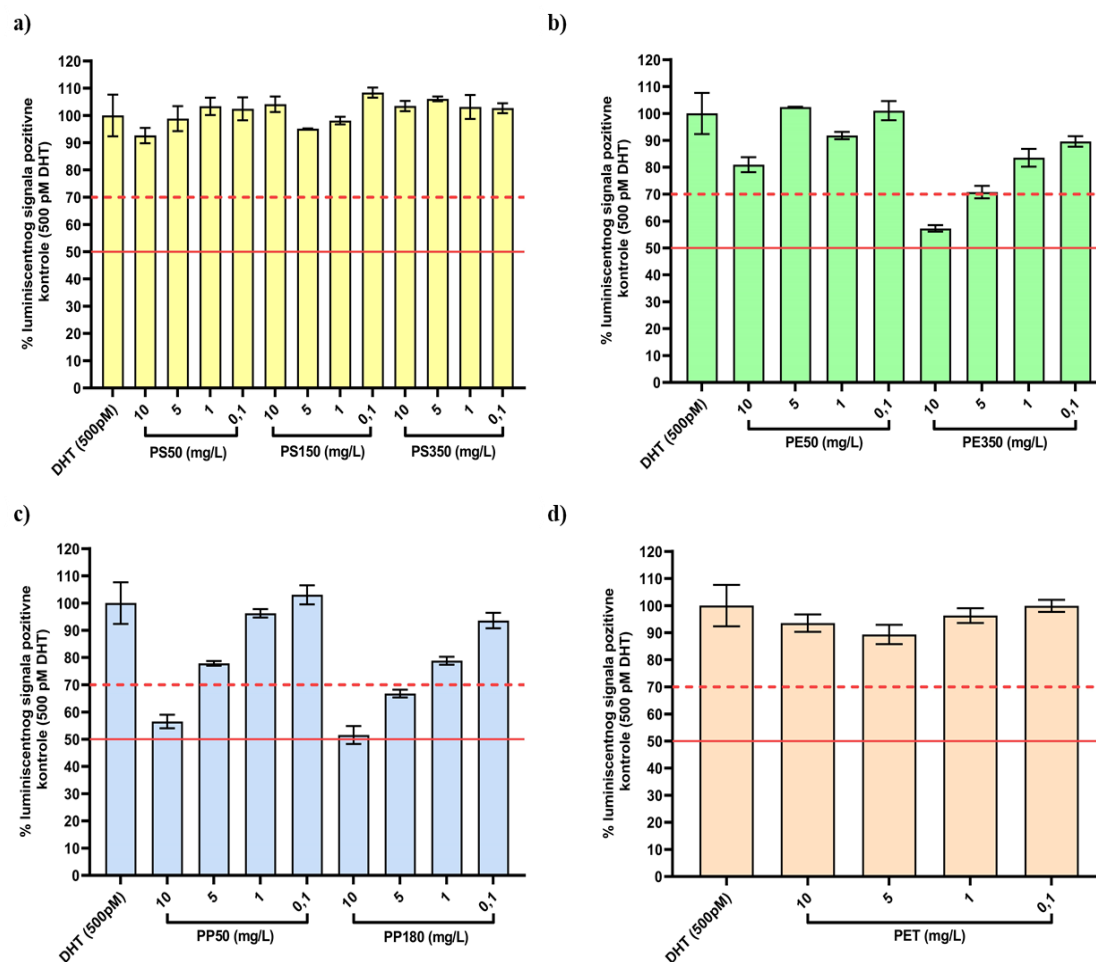
Aktivacija AR i ER uslijed tretmana s različitim PNP ispitana je provođenjem testa bioluminiscentne aktivnosti luciferaze na staničnim linijama AR-EcoScreen GR KO M1 i HeLa-9903. U ovim eksperimentima stanice su tretirane različitim PNP u koncentracijama od 10, 5, 1 i 0,1 mg/L kao i njihovim smjesama u različitim koncentracijama. Inkubacija s tretmanima trajala je 24 sata nakon čega je mjerena luciferazna aktivnost. Smjesa MIX50 sastojala se od PSNP 50 nm, PENP 50 nm, PPNP 50 nm i PET koje su za tretmane pomiješane tako konačna koncentracija svih PNP u jažici bude ista. Komponente MIX150 smjese su PPNP 180 nm i PSNP 150 nm a smjese MIX350 PENP 350 nm i PSNP 350 nm. Smjesu MIXPS čine PSNP triju različitih promjera: 50, 150 i 350 nm.

4.3.1. Androgeni receptori

Određivanje antagonističkog djelovanja PNP na AR provedeno je sukladno uputama smjernice OECD-a br. 458. Interpretacija rezultata ovog testa temelji se na postotku odgovora koji inducira testna kemikalija. Ukoliko je taj odgovor jednak ili veći od 10% odgovora koji inducira pozitivna kontrola, odnosno DHT, kemikalija se smatra agonistom AR. U slučaju PNP, taj kriterij nije zadovoljen, zbog čega je provedeno ispitivanje antagonističkog djelovanja. U ovom slučaju, kriterij je takav da kemikalija mora inhibirati odgovor DHT-a za barem 30%, da bi se smatrala antagonistom AR. Na slici 15. prikazani su rezultati provedenog antagonističkog testa na AR-EcoScreen GR KO M1 staničnoj liniji. Vidljivo je da PSNP nema antagonističko djelovanje na AR, bez obzira na veličinu nanočestica, kao i PET. Dobiveni rezultati u skladu su s nedavnim istraživanjem koje su proveli van Boxel i suradnici.¹⁷⁹ U tom radu ispitivan je antagonistički utjecaj PSNP promjera 50 i 200 nm ali i 1 i 10 μm u koncentracijama od 100, 10, 1, 0,1 i 0,01 mg/L. Pokazano je kako PSNP neovisno o veličini i koncentraciji ne inhibiraju odgovor DHT-a.

Suprotno tome, u slučaju PENP, nanočestice većeg promjera inhibirale su odgovor DHT-a za više od 40% te se mogu smatrati antagonistom AR. U njihovom slučaju inhibicija odgovora DHT-a ovisila je o koncentraciji na način da je veća koncentracija više inhibirala, odnosno može se reći da je krivulja doza-odgovor linearna. PENP promjera 50 nm također su inhibirale odgovor DHT-a ali za samo otprilike 20% što nije dovoljno za ispunjavanje kriterija. Iz slike 15 također je vidljivo da obje veličine PPNP u najvećim koncentracijama inhibiraju odgovor DHT-a više od 40% i tako zadovoljavaju kriterij za antagonističko djelovanje na AR. Nadalje,

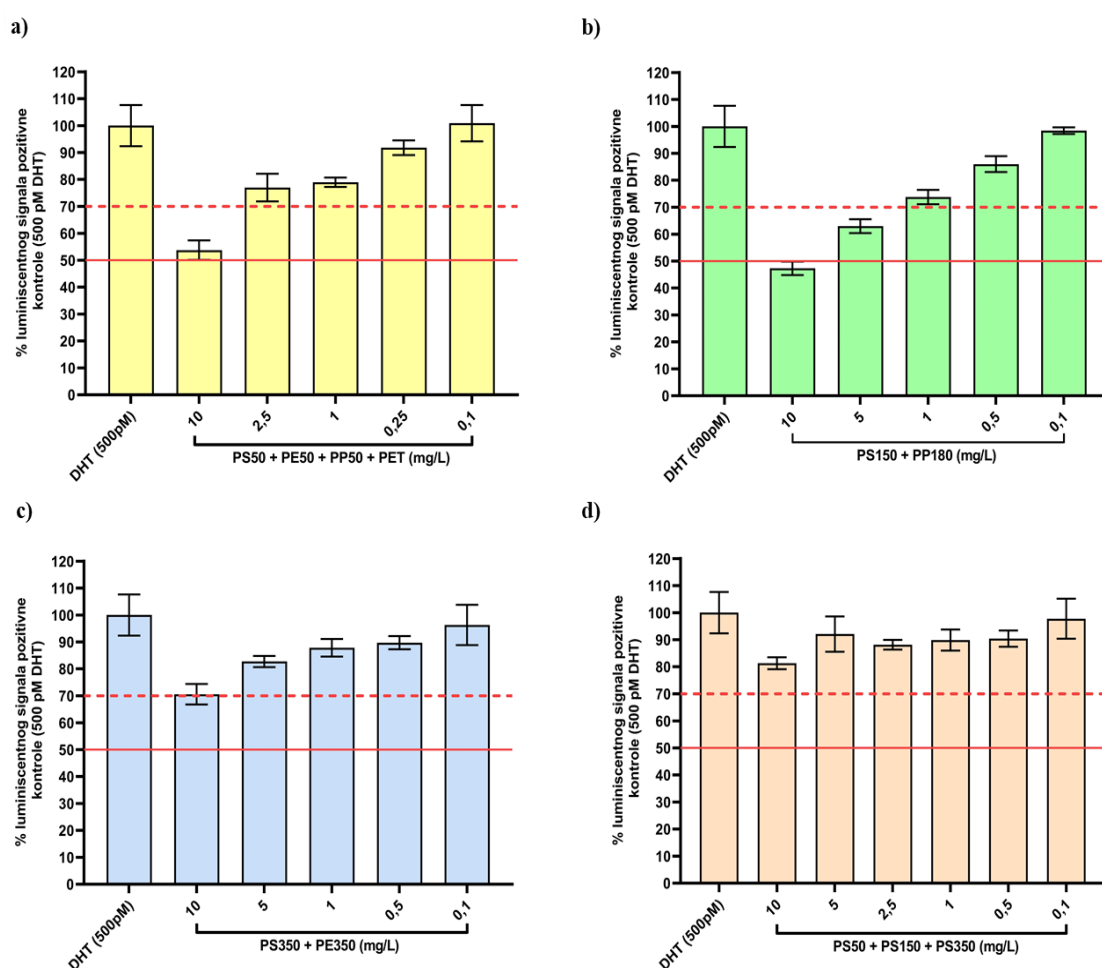
kao i kod PENP promjera 350 nm, postotak inhibicije odgovora ovisi o koncentraciji PPNP i smanjuje se smanjivanjem koncentracije.



Slika 15. Inhibicija AR nakon tretmana stanica s: a) PSNP promjera 50, 150 i 350 nm, b) PENP promjera 50 i 350 nm, c) PPNP promjera 50 i 180 nm i d) PET. Isprekidana crvena linija predstavlja 30% inhibicije a puna crvena linija 50% inhibicije. Rezultati su prikazani kao postotak luminescentnog signala pozitivne kontrole, 500 pM DHT, a dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

Slika 16. prikazuje rezultate dobivene uslijed tretmana stanica s različitim smjesama PNP. Smjese MIX50 i MIX150 uvelike inhibiraju odgovor DHT-a, s čime smjesa MIX150 čak više od 50%. Postotak inhibicije DHT-a u slučaju smjese MIX50 je između 40 i 50% što je i više nego dovoljno da bi se taj učinak proglasio antagonističkim. Kao i u slučaju samih PNP, i ovdje je vidljivo kako postotak inhibicije odgovora DHT-a ovisi o koncentraciji PNP u smjesi.

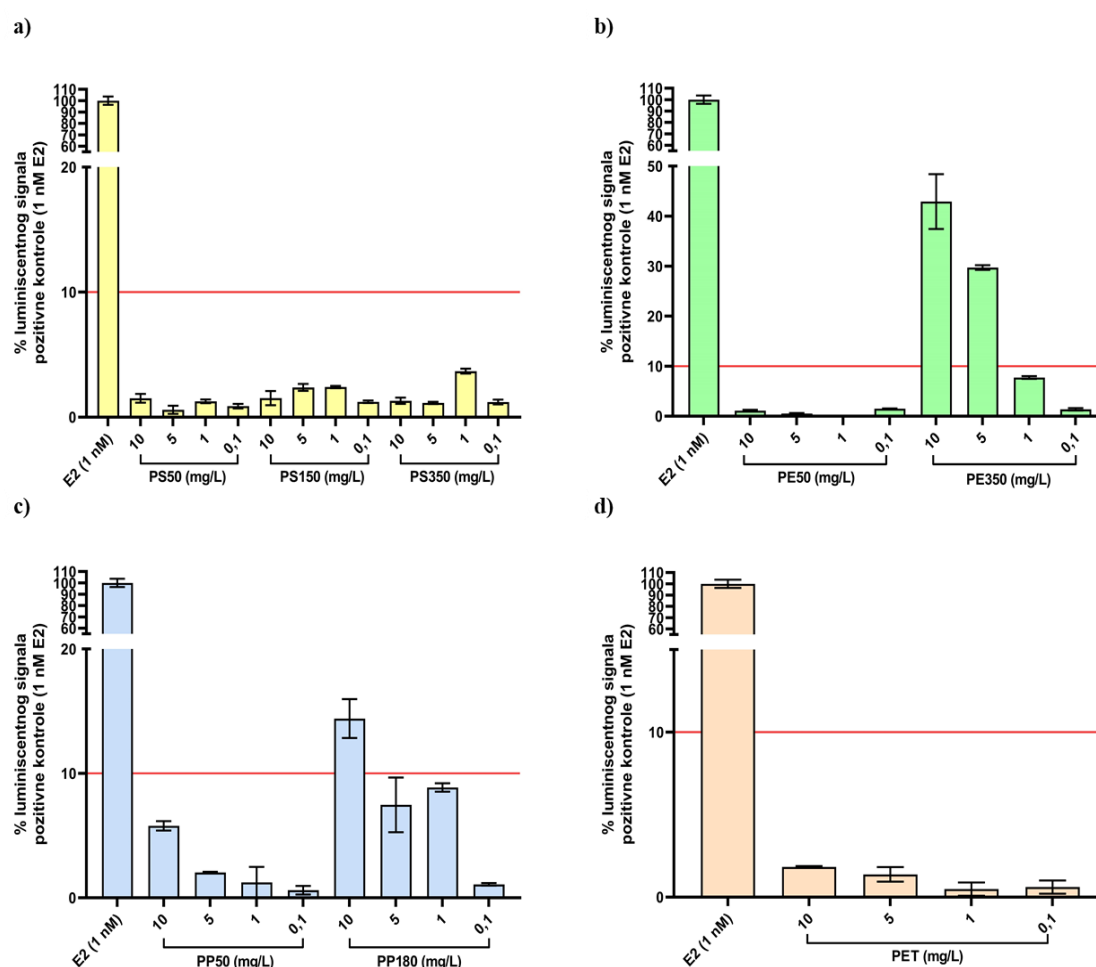
Postotak inhibicije u slučaju smjese MIXPS ne ispunjava zadane uvjete ni u jednoj od koncentracija s kojima su stanice tretirane. Postotak inhibicije DHT-a u slučaju najveće koncentracije smjese MIX350, odnosno 10 mg/L PSNP 350 nm i 10 mg/L PENP 350 nm, je točno 30%. Budući da je kriterij smjernice OECD-a zahtijeva da postotak inhibicije bude 30% ili više, i ovaj se rezultat uključuje te se za smjesu MIX350 može reći da ostvaruje antagonistički učinak na ovom staničnom modelu AR.



Slika 16. Inhibicija AR nakon tretmana stanica s: a) smjesom PSNP 50 nm, PENP 50 nm, PPNP 50 nm i PET, b) smjesom PSNP 150 nm i PPNP 180 nm, c) smjesom PSNP 350 nm i PENP 350 nm i d) smjesom PSNP 50, 150 i 350 nm. Isprekidana crvena linija označava 30% inhibicije a puna crvena linija 50% inhibicije androgenih receptora. Rezultati su prikazani kao postotak luminescentnog signala pozitivne kontrole, 500 pM DHT, a dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

4.3.2. Estrogeni receptori

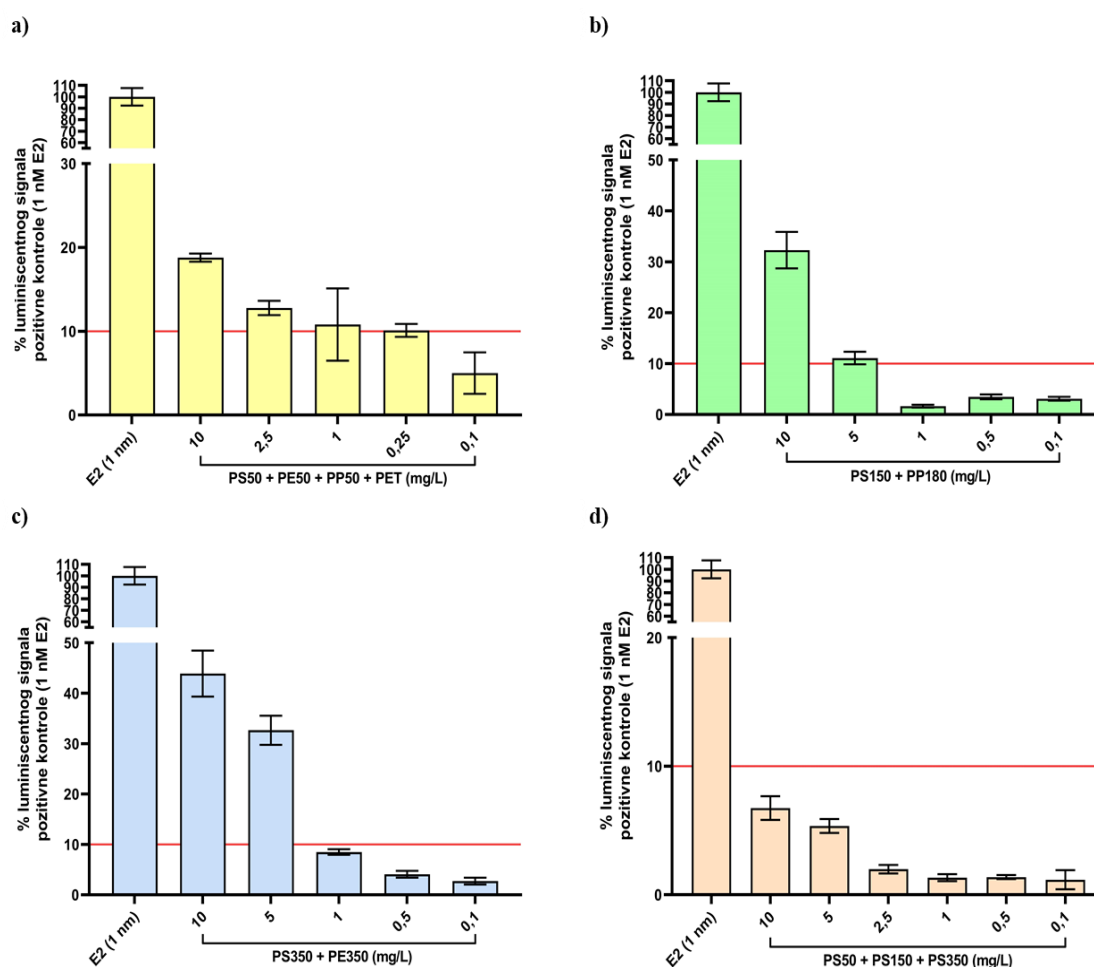
Ispitivanje agonističkog učinka PNP na ER provedeno je prema smjernici OECD-a br. 455. Kriterij prema kojem se razlučuju agonisti ER je ostvarivanje barem 10% odgovora pozitivne kontrole, E2. Iz slike 17. vidljivo je da takav kriterij zadovoljavaju samo PPNP promjera 180 nm i PENP promjera 350 nm. PENP većeg promjera ostvaruju više od 40% odgovora E2 u najvećoj koncentraciji i oko 30% u koncentraciji od 5 mg/L. Suprotno, PPNP promjera 180 nm ostvaruju oko 15% odgovora E2 u najvećoj koncentraciji dok sve niže koncentracije ne prelaze granicu od 10%.



Slika 17. Aktivacija ER nakon tretmana stanica s: a) PSNP 50, 150 i 350 nm, b) PENP 50 i 350 nm, c) PPNP 50 i 350 nm i d) PET. Crvena linija predstavlja granicu od 10% odgovora pozitivne kontrole koja je potrebna za ostvarivanje agonističkog učinka. Rezultati su prikazani kao postotak luminiscentnog signala pozitivne kontrole, 1 nM E2, a dobiveni su iz tripplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

Dobiveni rezultati za PSNP u skladu su s istraživanjem koje je ispitalo njihov učinak na aktivaciju ER pomoću VM7 stanične linije.¹⁷⁹ Pokazano je kako PSNP i PSMP u veličinama od 50 i 200 nm te 1 i 10 μ M nisu agonisti ER, odnosno ne postižu 10% ili više odgovora E2.

Aktivacija ER uslijed tretmana stanica s različitim smjesama PNP prikazana je na slici 18. Vidljivo je kako najveća koncentracija svih smjesa osim PSMIX prelazi zadanu granicu od 10%. Ta je činjenica vrlo zanimljiva u slučaju smjese MIX50, s obzirom na to da ni jedna od njezinih komponenti samostalno nije postigla odgovor veći ili jednak 10%.



Slika 18. Aktivacija ER nakon tretmana stanica s: a) smjesom PSNP promjera 50 nm, PENP 50 nm, PPNP 50 nm i PET, b) smjesom PSNP promjera 150 nm i PPNP promjera 180 nm, c) smjesom PSNP promjera 350 nm i PENP promjera 350 nm i d) smjesom PSNP promjera 50, 150 i 350 nm. Crvena linija predstavlja granicu od 10% odgovora pozitivne kontrole koja je potrebna za ostvarivanje agonističkog učinka.

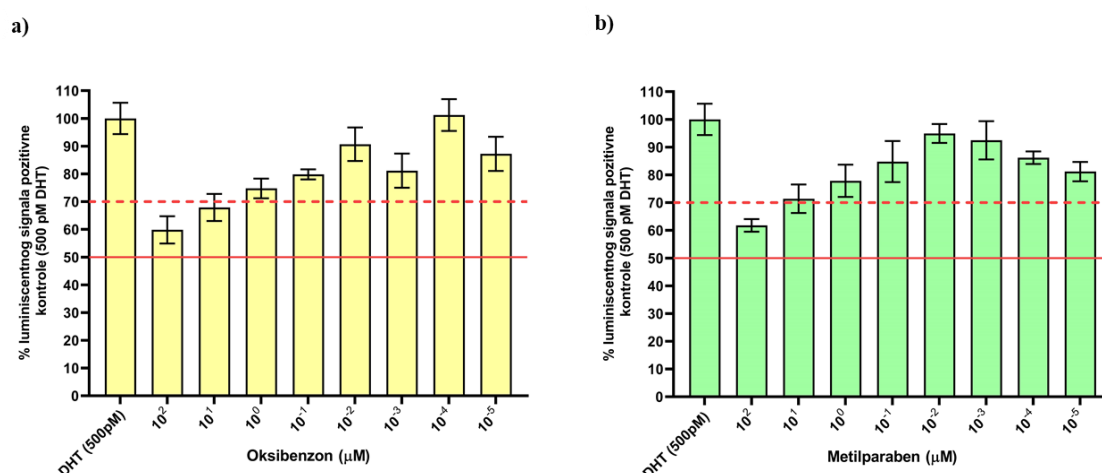
4.4. Utjecaj PNP na endokrino-disruptivni profil oksibenzona i metilparabena

Prije određivanja utjecaja PNP na endokrino-disruptivni profil oksibenzona i metilparabena određen je njihov samostalni učinak na AR i ER. Raspon koncentracija (10^2 - 10^{-5} μ M) u kojemu je određivan samostalni učinak tih spojeva odabran je prema literaturi.^{147,166}

4.4.1. Androgeni receptori

Inhibicija AR nakon tretmana s testnim spojevima prikazana je na slici 19. Dobiveni rezultati pokazuju da najveća testirana koncentracija inhibira odgovor DHT-a za otprilike 40%. Takvi rezultati u skladu su s prethodnim istraživanjima koja su ispitivala anti-androgeni učinak različitih parabena u rasponu koncentracija 10^{-4} - 10 μ M.¹⁶⁶ Postotak kojim metilparaben inhibira odgovor DHT-a na 2933Y stanicama također je oko 40%. Antagonizam oksibenzona prema AR ispitan je na MDA-kb2 stanicama u rasponu 10^{-2} - 10^2 μ M a IC_{50} vrijednost odnosno koncentracija koja inhibira odgovor DHT-a za 50% (engl. *half maximal inhibitory concentration*, IC_{50}) bila je 28.5 μ M.¹⁴⁷ Iz dobivenih rezultata (slika 16.) i pomoću predložaka priloženih uz odgovarajuću smjernicu OECD-a izračunate su IC_{30} vrijednosti odnosno koncentracije koje inhibiraju odgovor DHT-a za 30% i one iznose 5,01 μ M za oksibenzon i 13,80 μ M za metilparaben. U nedavnoj studiji antagonistički učinak oksibenzona potvrđen je i *in vivo* studijom na štakorima provođenjem Hershberger testa.¹⁸³

Smjese pojedinih PNP i oksibenzona i metilparabena dodavane su u jažice na način da je svaka komponenta dodana zasebno u 10x većoj koncentraciji kako bi se dobila željena konačna koncentracija. Za određivanje antagonista primijenjeni su isti kriteriji kao i u slučaju pojedinačnih komponenti, odnosno smjesa pojedinih PNP s oksibenzonom i metilparabenom trebala je inhibirati odgovor DHT-a za barem 30% da bi se njezino djelovanje smatralo antagonističkim.

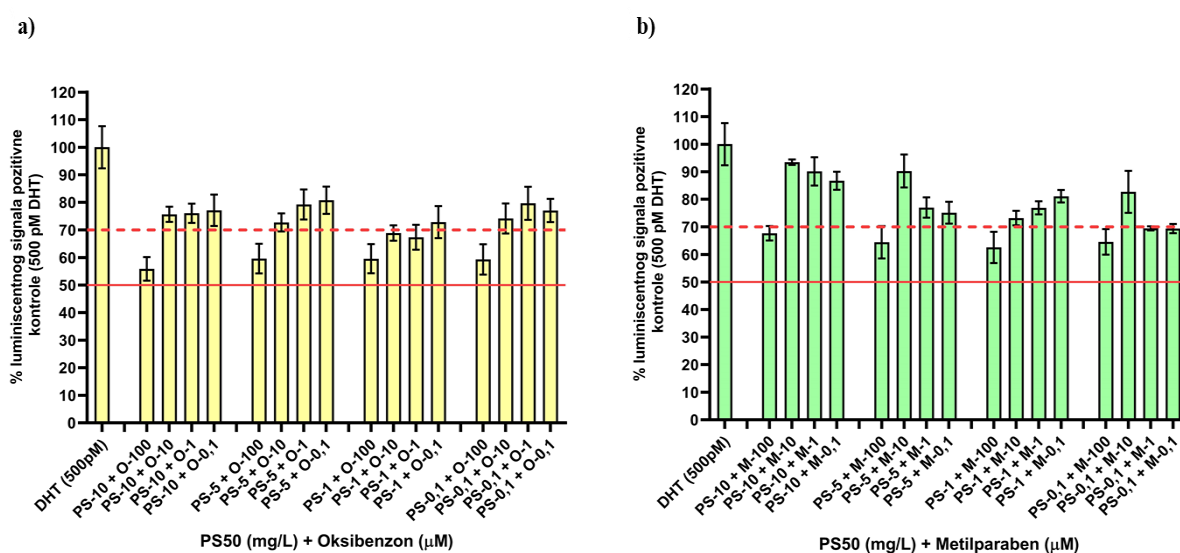


Slika 19. Inhibicija AR nakon tretmana stanica s: a) oksibenzonom i b) metilparabenom. Isprekidana crvena linija označava 30% inhibicije a puna crvena linija 50% inhibicije androgenih receptora. Rezultati su prikazani kao postotak luminescentnog signala pozitivne kontrole, 500 pM DHT, a dobiveni su iz tripplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

Tablice 4-19 u poglavlju Dodatak prikazuju izračunate koeficijente adicije za sve smjese PNP s oksibenzonom i metilparabenom ispitane na AR-EcoScreen GR KO M1 staničnoj liniji. Postotci inhibicije AR uslijed tretmana stanica sa smjesom PSNP 50 nm i oksibenzona prikazani su na slici 20. a). Vidljivo je kako najveća koncentracija oksibenzona inhibira odgovor DHT-a više od 30%, neovisno o koncentraciji PSNP 50 nm. Također, može se uočiti kako od smjesa oksibenzona s koncentracijom PSNP 50 nm od 10 mg/L, samo ona s najvišom koncentracijom oksibenzona smanjuje postotak inhibicije u dovoljnoj mjeri. Iako je 10 μM koncentracija oksibenzona samostalno inhibirala odgovor za više od 30%, u kombinaciji s 10, 5 i 0,1 mg/L PSNP 50 nm taj je postotak bio manji i ne zadovoljava kriterije. Kod smjese 10 μM oksibenzona s 1 mg/L PSNP 50 nm postotak inhibicije je oko 33 %, slično kao i kombinaciji 1 μM oksibenzona s istom koncentracijom PSNP 50 nm. Uz najveću koncentraciju oksibenzona sa svakom koncentracijom PSNP 50 nm, to su jedine smjese koje inhibiraju odgovor DHT-a dovoljno.

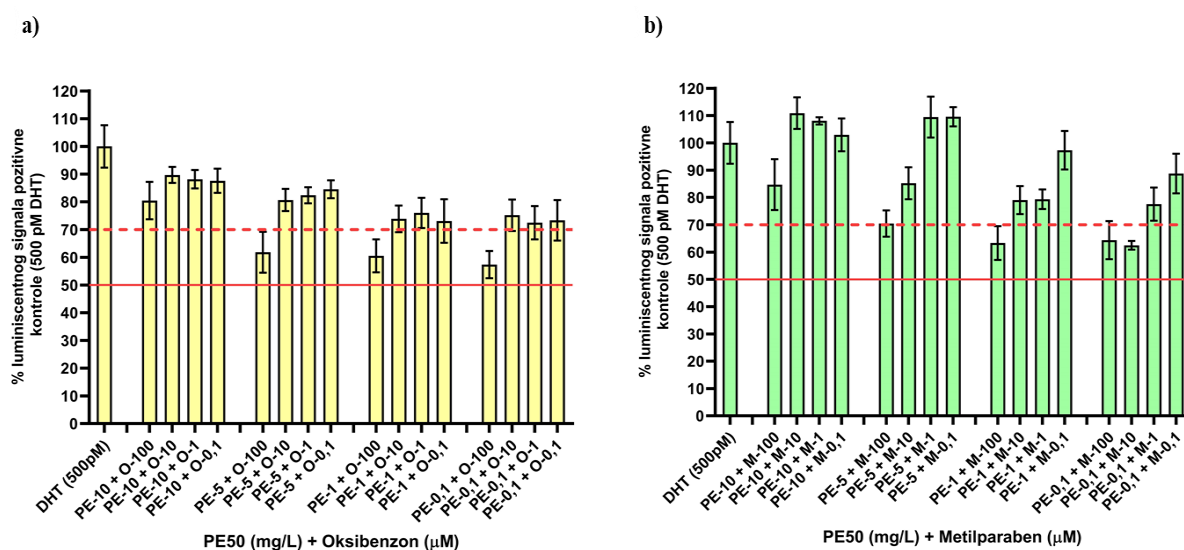
Rezultati dobiveni nakon tretmana sa smjesama metilparabena i PSNP 50 nm prikazani su na slici 20. b). Kao i u prethodnom slučaju, najveća koncentracija metilparabena u kombinaciji sa svim koncentracijama PSNP 50 nm inhibira odgovor DHT-a za više od 30%. Uz to, jedine dvije kombinacije koje su pokazale antagonističko djelovanje s inhibicijom oko 30% su smjese s najmanjom koncentracijom PSNP 50 nm i dvjema najmanjima koncentracijama metilparabena.

S obzirom na činjenicu da endokrini disruptori često ne slijede klasičnu koncentracija-odgovor dinamiku, ovakav rezultat ne iznenađuje.¹⁰⁴ Također, zanimljivo je da je 10 μM koncentracija metilparabena u samostalnom tretmanu bila vrlo blizu postotku inhibicije potrebnom da ispuni uvjete, a u smjesama s PSNP 50 nm ti postotci su puno manji.



Slika 20. Inhibicija AR nakon tretmana stanica s: a) oksibenzonom i PSNP 50 nm i b) metilparabenom i PSNP 50 nm. Isprekidana crvena linija označava 30% inhibicije a puna crvena linija 50% inhibicije androgenih receptora. Rezultati su prikazani kao postotak luminescentnog signala pozitivne kontrole, 500 pM DHT, a dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

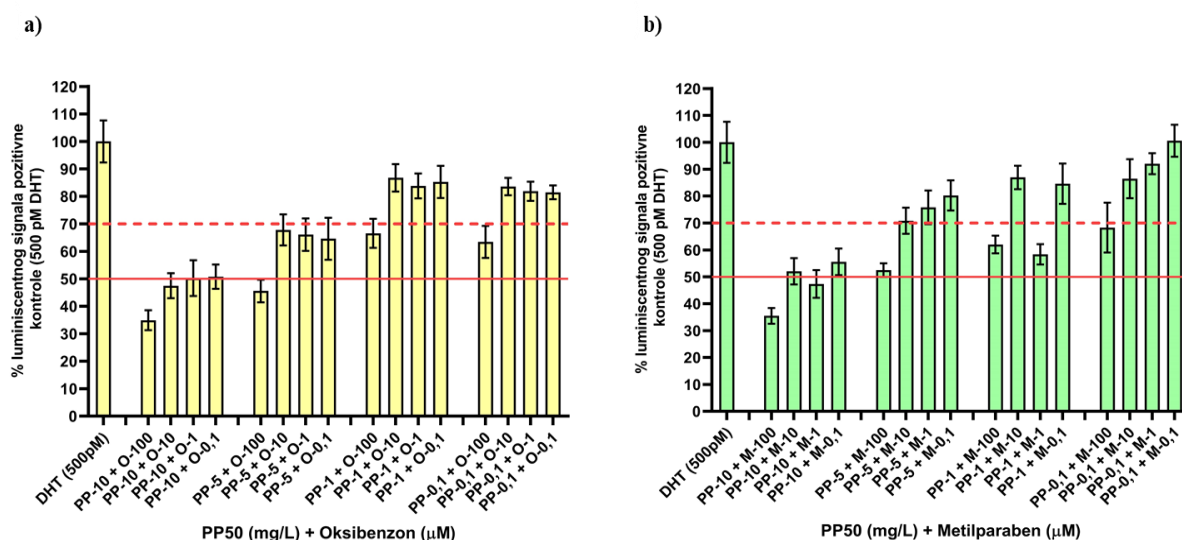
Slika 21. prikazuje rezultate nakon tretmana stanica sa smjesama PENP 50 nm s oksibenzonom (a) i metilparabenom (b). Najveća koncentracija PENP 50 nm ne inhibira AR više od 30% ni u jednoj od kombinacija s 4 različite koncentracije oksibenzona. Smjese koje imaju postotak inhibicije 30% ili više su one koje sadrže 100 μM oksibenzona i 5, 1 ili 0,1 mg/L PENP 50 nm. Vrlo slični rezultati dobiveni su i nakon tretmana sa smjesom PENP50 i metilparabena. Smjesa koju čine najveće koncentracije obje komponente ne ispunjava kriterije, dok sve niže koncentracije PENP 50 nm s najvećom koncentracijom metilparabena ostvaruju postotak inhibicije od barem 30%. Uz njih, 10 μM metilparaben u smjesi s 0,1 mg/L nanočestica zadovoljava kriterije za antagonističko djelovanje.



Slika 21. Inhibicija AR nakon tretmana stanica s: a) oksibenzonom i PENP 50 nm i b) metilparabenom i PENP 50 nm. Isprekidana crvena linija označava 30% inhibicije a puna crvena linija 50% inhibicije androgenih receptora. Rezultati su prikazani kao postotak luminiscentnog signala pozitivne kontrole, 500 pM DHT, a dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

Inhibicija AR uslijed tretmana stanica sa smjesom PPNP 50 nm i oksibenzona u različitim koncentracijama prikazana je na slici 22. a). Dobiveni rezultati jasno prikazuju kako najveća koncentracija PPNP ima jako antagonističko djelovanje na AR neovisno o koncentraciji oksibenzona. U slučaju najvećih koncentracija obje komponente postotak inhibicije DHT-a veći je od 60%, dok je kod manjih koncentracija oksibenzona taj postotak oko 50%. Smjese koje su sadržavale 5 mg/L PPNP također su ostvarile antagonističko djelovanje bez obzira na koncentraciju oksibenzona, a učinak je najizraženiji pri najvišoj koncentraciji. Dvije niže koncentracije PPNP inhibiraju DHT preko 30% samo u kombinaciji s najvišom koncentracijom oksibenzona. Usporedbom rezultata djelovanja samostalnih komponenti u istim koncentracijama dolazi se do zaključka kako se njihov učinak u smjesi pojačava jer su PPNP 50 nm u koncentraciji 10 mg/L i 100 μ M oksibenzon samostalno ostvarili postotak inhibicije manji od 50%. Također, antagonistički učinak ostvaren je i u smjesama s nižim koncentracijama oksibenzona a prilikom samostalnog ispitivanja jedino je koncentracija od 10 μ M inhibirala nešto više od 30%.

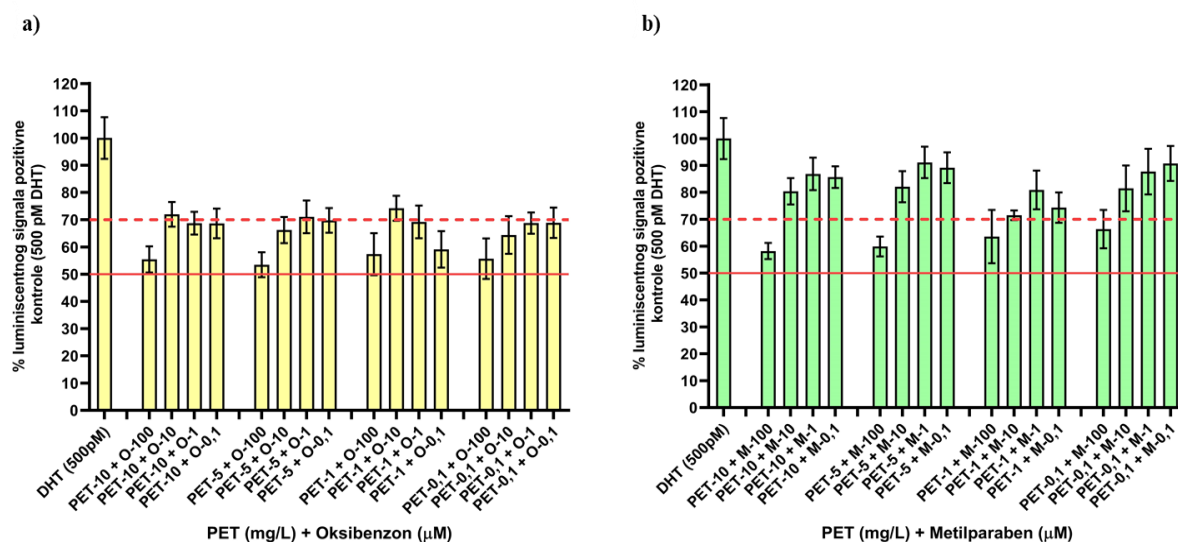
Rezultati su slični u slučaju smjesa PPNP 50 nm i metilparabena (slika 22. b)). Svaka od kombinacija u kojoj je najviša koncentracija oksibenzona ostvarila je antagonističko djelovanje a najviša koncentracija PPNP u svim kombinacijama neovisno o njegovoj koncentraciji. Koncentracija od 5 mg/L PPNP ostvaruje antagonistički učinak dodatno i u kombinaciji s 10 μ M oksibenzonom, a koncentracija od 1 mg/L u kombinaciji s 1 μ M. U ovom slučaju zajednički antagonistički učinak također je pojačan u usporedbi s učinkom samostalnih komponenti u slučaju najveće koncentracije PPNP.



Slika 22. Inhibicija AR nakon tretmana stanica s: a) oksibenzonom i PPNP 50 nm i b) metilparabenom i PPNP 50 nm. Isprekidana crvena linija označava 30% inhibicije a puna crvena linija 50% inhibicije androgenih receptora. Rezultati su prikazani kao postotak luminescentnog signala pozitivne kontrole, 500 pM DHT, a dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

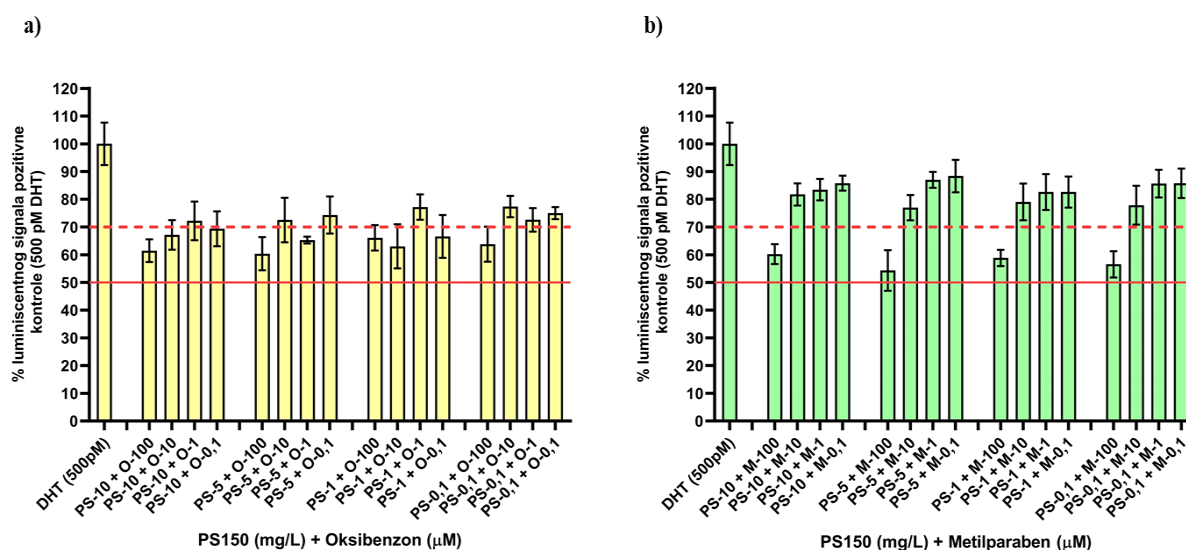
Rezultati dobiveni uslijed tretmana stanica sa smjesama PET i oksibenzona i metilparabena prikazani su na slici 23. Kao što je to bio slučaj i s PSNP, PENP i PPNP, i ovdje najveća koncentracija PNP u kombinaciji s najvećom koncentracijom oksibenzona ili metilparabena najizraženije inhibira odgovor DHT-a. Razlika je zasigurno najuočljivija kod tretmana stanica s manjim koncentracijama PNP i spojeva, odnosno u slučaju PET nanočestica i pri manjim koncentracijama dolazi do inhibicije DHT-a u dovoljnom postotku za proglašavanje antagonističkog učinka. Jedine kombinacije koje imaju postotak inhibicije manji od 30% su 10 i 1 mg/L PET s 10 μ M oksibenzonom te 5 mg/L PET s 1 μ M oksibenzonom. Ali i u njihovom

slučaju postotak inhibicije je vrlo blizu potrebnog. Kod smjesa PET nanočestica s metilparabenom situacija je drugačija. Najveća koncentracija metilparabena inhibira odgovor preko 30% u kombinaciji sa svakom koncentracijom PPNP. Ostale kombinacije inhibiraju odgovor DHT-a manje od 30%, odnosno ne pokazuju antagonistički učinak.



Slika 23. Inhibicija AR nakon tretmana stanica s: a) oksibenzonom i PET i b) metilparabenom i PET. Isprekidana crvena linija označava 30% inhibicije a puna crvena linija 50% inhibicije androgenih receptora. Rezultati su prikazani kao postotak luminiscentnog signala pozitivne kontrole, 500 pM DHT, a dobiveni su iz tripplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

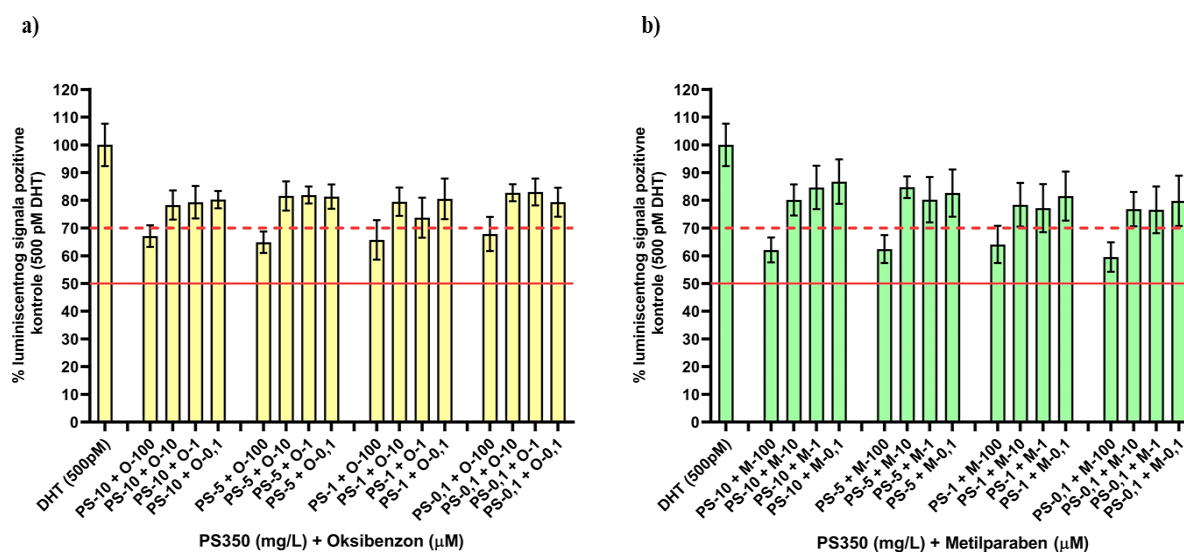
Inhibicija odgovora DHT-a nakon tretmana sa smjesama PSNP promjera 150 nm i oksibenzona prikazana je na slici 24. a). Kao što je i očekivano pri najvećoj koncentraciji oksibenzona postiže se i najveći postotak inhibicije odgovora DHT-a. Zanimljivo je kako su i niže koncentracije oksibenzona, odnosno sve osim 1 μ M u kombinaciji s 10 mg/L PSNP pokazale antagonističko djelovanje na AR. U smjesama PSNP 5 mg/L, uz onu s najvećom koncentracijom, antagonistički učinak pokazuje i smjesa s 1 μ M oksibenzonom, a ostale dvije smjese vrlo su blizu potrebnog postotka inhibicije. Kod koncentracije PSNP od 1 mg/L sve su smjese osim one s 1 μ M oksibenzonom ostvarile antagonističko djelovanje. U slučaju najniže koncentracije PSNP samo smjesa s najvećom koncentracijom oksibenzona inhibira odgovor DHT-a više od 30%. Smjese s metilparabenom (slika 24. b)) ostvaruju antagonističko djelovanje samo u slučaju njegove najveće koncentracije sa svim koncentracijama PSNP.



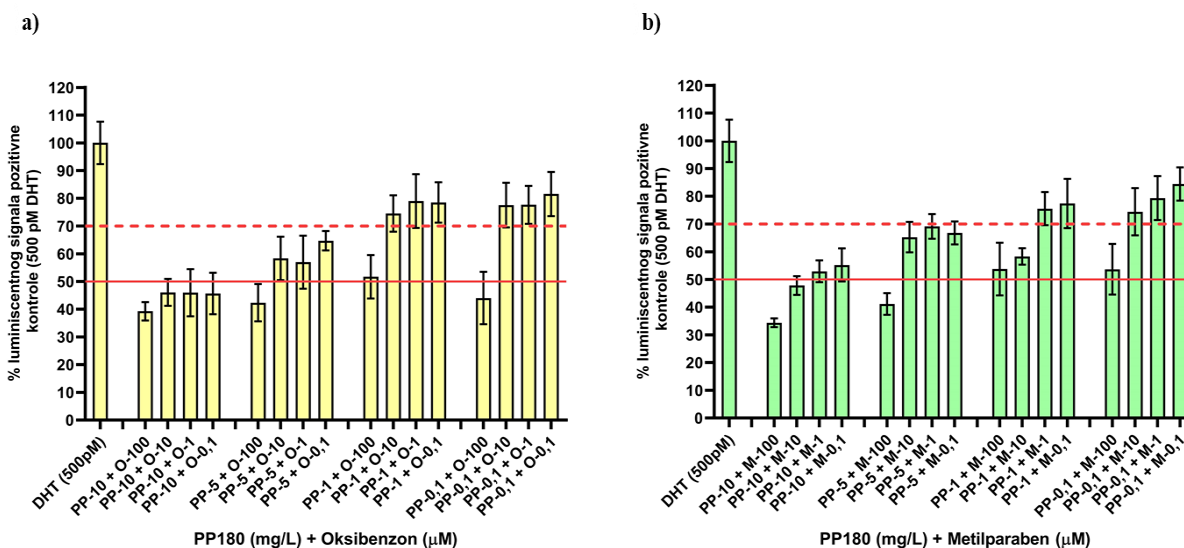
Slika 24. Inhibicija AR nakon tretmana stanica s: a) oksibenzonom i PSNP 150 nm i b) metilparabenom i PSNP 150 nm. Isprekidana crvena linija označava 30% inhibicije a puna crvena linija 50% inhibicije androgenih receptora. Rezultati su prikazani kao postotak luminiscentnog signala pozitivne kontrole, 500 pM DHT, a dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

Tretman stanica sa smjesama PSNP promjera 350 i oksibenzona ili metilparabena rezultirao je inhibicijom AR prikazanom na slici 25. Rezultati su vrlo slični u slučaju obje testne kemikalije. Očito je kako dolazi do antagonističkog učinka samo u smjesama koje sadrže najveću koncentraciju oksibenzona i metilparabena sa svakom koncentracijom PSNP.

Smjese PPNP promjera 180 nm s oksibenzonom (slika 26. a)) ostvarile su jedan od najizraženijih antagonističkih učinaka odnosno najviše inhibicije odgovora DHT-a. Kod najveće koncentracije PPNP postotak inhibicije veći je od 50% sa svim koncentracijama oksibenzona. Nadalje, čak i smjese koje sadržavaju 5 mg/L PPNP ostvaruju antagonistički učinak u svakoj od kombinacija s oksibenzonom ali je taj učinak značajno manji nego u slučaju veće koncentracije PPNP. U slučaju dvije najniže koncentracije PPNP samo su smjese s najvećom koncentracijom oksibenzona ostvarile postotak inhibicije veći od 30%. Ovdje treba istaknuti kako je koncentracija od 5 mg/mL PPNP samostalno ostvarila puno manji postotak inhibicije nego u smjesama s oksibenzonom koji je samostalno ostvario potreban postotak inhibicije samo u slučaju dvije najveće koncentracije. Usporedbom tih rezultata dolazi se do zaključka kako su komponente smjese međusobno pojačale antagonistički učinak u ovom slučaju.



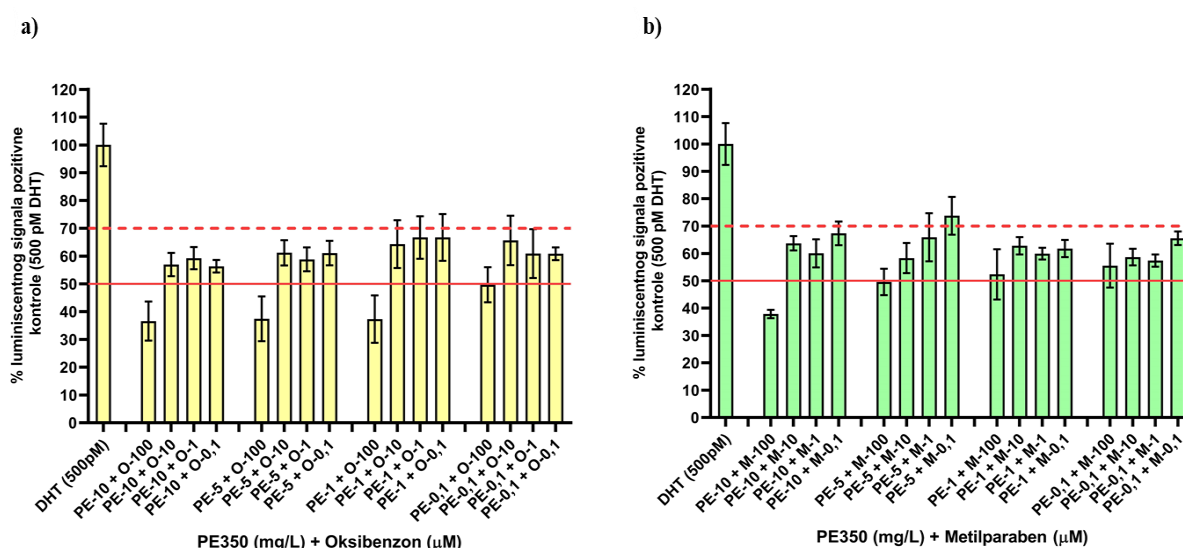
Slika 25. Inhibicija AR nakon tretmana stanica s: a) oksibenzonom i PSNP 350 nm i b) metilparabenom i PSNP 350 nm. Isprekidana crvena linija označava 30% inhibicije a puna crvena linija 50% inhibicije androgenih receptora. Rezultati su prikazani kao postotak luminescentnog signala pozitivne kontrole, 500 pM DHT, a dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.



Slika 26. Inhibicija AR nakon tretmana stanica s: a) oksibenzonom i PPNP 180 nm i b) metilparabenom i PPNP 180 nm. Isprekidana crvena linija označava 30% inhibicije a puna crvena linija 50% inhibicije androgenih receptora. Rezultati su prikazani kao postotak luminescentnog signala pozitivne kontrole, 500 pM DHT, a dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

Metilparaben u smjesama s PPNP promjera 180 nm ostvario je učinke prikazane na slici 26. b). Kao i kod oksibenzona, koncentracije PPNP od 10 mg/L i 5 mg/L u smjesama sa svim koncentracijama metilparabena imaju antagonističko djelovanje na AR. Najmanja koncentracija PPNP inhibira DHT više od 30% samo u smjesi s najvećom koncentracijom metilparabena dok koncentracija od 1 mg/L taj učinak ostvaruje s dvije veće koncentracije spoja. Usporedbom smjesa međusobno ističe se kako najjače djelovanje ostvaruje smjesa metilparabena i PPNP 10 mg/L dok su niže koncentracije i plastike i metilparabena djelovale slabije od odgovarajućih s oksibenzonom. Također, očito je pojačavanje antagonističkog učinka u odnosu na samostalne komponente.

Slika 27. prikazuje rezultate dobivene nakon tretmana stanica sa smjesama PENP promjera 350 nm i oksibenzona (a) ili metilparabena (b). Ono što se ističe u oba slučaja je kako se sve smjese (osim 5 mg/L PENP s 0,1 μ M metilparabena) ponašaju kao antagonisti AR. Ovi rezultati najbolje prikazuju kako tvari u smjesi mogu promijeniti učinak u odnosu na samostalno djelovanje. Dvije niže koncentracije PENP i dvije niže koncentracije spojeva nisu samostalno djelovale a njihove smjese inhibiraju odgovor DHT-a više od 30%.

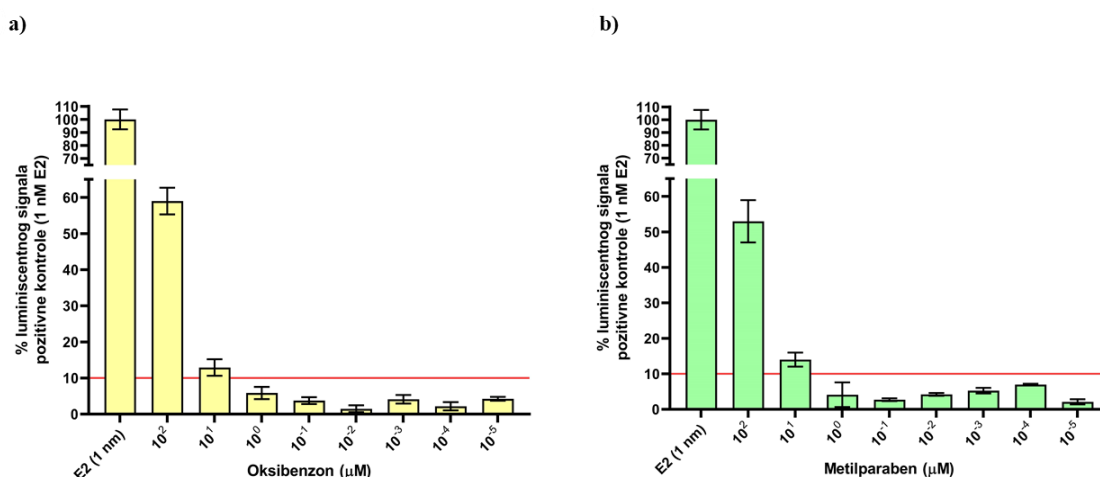


Slika 27. Inhibicija AR nakon tretmana stanica s: a) oksibenzonom i PENP 350 nm i b) metilparabenom i PENP 350 nm. Isprekidana crvena linija označava 30% inhibicije a puna crvena linija 50% inhibicije androgenih receptora. Rezultati su prikazani kao postotak luminescentnog signala pozitivne kontrole, 500 pM DHT, a dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

4.4.2. Estrogeni receptori

Kao i u slučaju AR, prije ispitivanja aktivacije ER uslijed tretmana sa smjesama različitih PNP s oksibenzonom i metilparabenom, njihov je učinak ispitan samostalno u rasponu koncentracija od 10^2 do 10^{-5} μM . Primijenjeni kriteriji odluke isti su kao i u slučaju tretmana stanica s PNP, odnosno postizanje 10% ili više odgovora E2 smatra se agonističkim djelovanjem na ER. Dobiveni rezultati (slika 28.) jasno prikazuju kako obje testne kemikalije u najvećim koncentracijama aktiviraju ER odnosno mogu se smatrati njegovim agonistima. Takvi rezultati u skladu su s onima koje su u svom radu prikazali Kunz i suradnici.¹⁸⁴ Oni su ispitivanjem agonističkih svojstava oksibenzona *in vitro* dobili slične postotke aktivacije ER u usporedbi s E2. Također, pokazali su kako *in vivo* nema nikakvog efekta. Što se tiče metilparabena, u drugim je studijama pokazao ponašanje poput estrogena u uterotropnom testu *in vivo* korištenjem štakora kao modela, ali i stimulirao proliferaciju estrogen ovisnih MCF7 stanica. Uz test transaktivacije ER koji je korišten u izradi ovog rada, ispitivanje proliferacije MCF-7 stanica poznata je metoda za identificiranje spojeva koji se ponašaju poput estrogena.¹⁸⁵ Slično ispitivanje djelovanja metilparabena na ER, proveli su Liang i suradnici koristeći transaktivacijski test i MLVN staničnu liniju.¹⁶⁴ Pokazali su da se metilparaben ponaša kao agonist ER a dodatno su to potvrdili ispitivanjem proliferacije MCF-7 stanica.

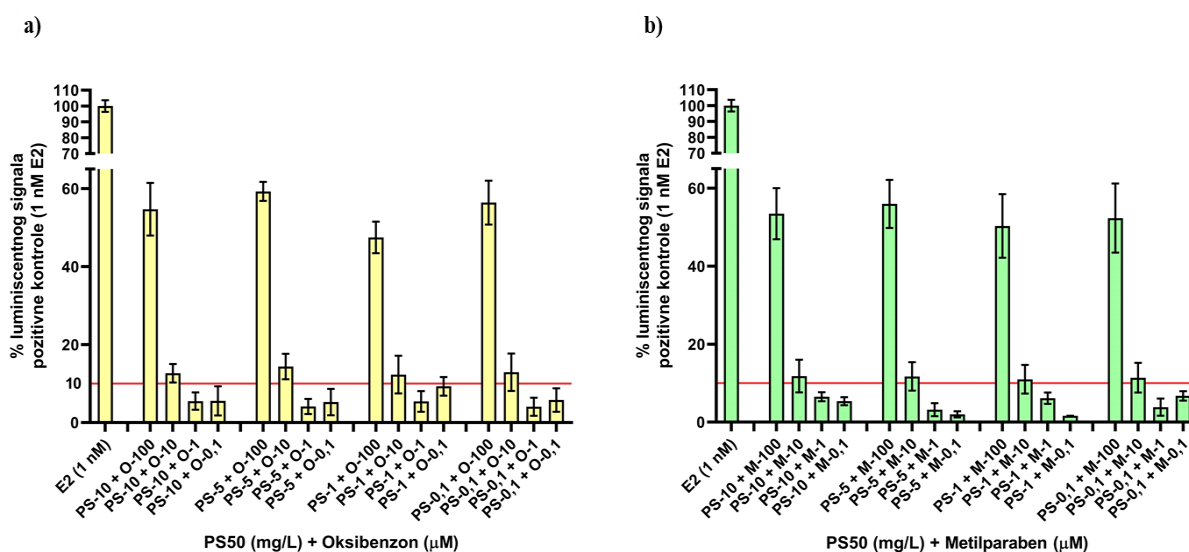
Koncentracija testne kemikalije pri kojoj je izmjerena aktivnost u agonističkom testu 10% maksimalne aktivnosti inducirane pozitivnom kontrolom (1 nM E2), odnosno PC_{10} (engl. 10% *positive control*) izračunata je za obje kemikalije. Korištenjem predložaka priloženih uz smjernicu OECD-a broj 455 dobivene su koncentracije: 3,87 μM za oksibenzon te 3,94 μM za metilparaben.¹⁰⁷ Uspoređivanjem PC_{10} vrijednosti za različite spojeve može se zaključiti o jakosti njihovog agonističkog učinka. Što je ta vrijednost za neku kemikaliju manja, znači da je manja koncentracija potrebna za postizanje agonističkog učinka. Veća PC_{10} znači da se pri većoj koncentraciji postiže taj efekt odnosno takva se kemikalija smatra slabijim agonistom. Iz izračunatih vrijednosti za metilparaben i oksibenzon ne može se jasno reći da je jedan slabiji ili jači agonist jer su koncentracije pri kojima ostvaruju 10% učinka vrlo slične. Da je jakost njihovih agonističkih učinaka vrlo slična, vidi se i iz dobivenih rezultata budući da dvije najveće koncentracije postižu slične postotke aktivacije ER u usporedbi s 1 nM E2.



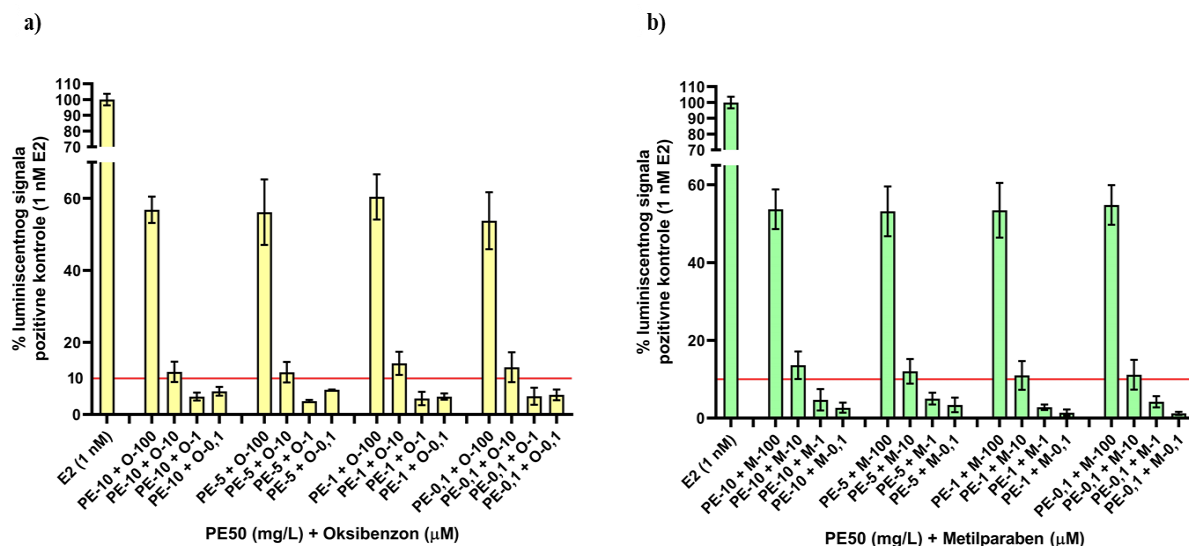
Slika 28. Aktivacija ER nakon tretmana stanica s: a) oksibenzonom i b) metilparabenom. Crvena linija predstavlja granicu od 10% odgovora pozitivne kontrole koja je potrebna za ostvarivanje agonističkog učinka. Rezultati su prikazani kao postotak luminiscentnog signala pozitivne kontrole, 1 nM E2, a dobiveni su iz tripplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

Tablice 20-35 u poglavlju Dodatak prikazuju izračunate koeficijente adicije za sve smjese PNP s oksibenzonom i metilparabenom ispitane na HeLa-9903 staničnoj liniji. Aktivacija ER postignuta tretmanom stanica sa smjesama PSNP promjera 50 nm i oksibenzona (a) ili metilparabena (b) prikazana je na slici 29. Dobiveni rezultati pokazuju kako smjese koje sadrže dvije najveće koncentracije oksibenzona i metilparabena sa svakom koncentracijom PSNP jedine ispunjavaju zadane kriterije za postizanja agonističkog učinka na ER. Usporedbom odgovora koji su pojedine komponente ostvarile zasebno, dolazi se do zaključka kako se ovaj učinak može pripisati samostalnom djelovanju oksibenzona i metilparabena. Budući da PSNP promjera 50 nm nisu djelovale agonistički ni u jednoj od testiranih koncentracija, ovakav rezultat je očekivan.

Slični rezultati (slika 30) za aktivaciju ER dobiveni su i uslijed tretmana stanica sa smjesama PENP promjera 50 nm i oksibenzona i metilparabena. Agonističko djelovanje postignuto je samo u slučaju najvećih koncentracija oksibenzona i metilparabena a koncentracija PENP u tome nije imala ulogu. Iz slike 27. b) koja prikazuje aktivaciju ER nakon tretmana s 10, 5, 1 i 0,5 mg/L PENP promjera 50 nm vidljivo je ostvareni odgovor ne postiže 10% odgovora 1 nM E2, odnosno postignuti učinak u smjesama može se pripisati samo oksibenzonu i metilparabenu koji su tu razinu aktivacije postigli i prilikom samostalnog tretmana (slika 25).



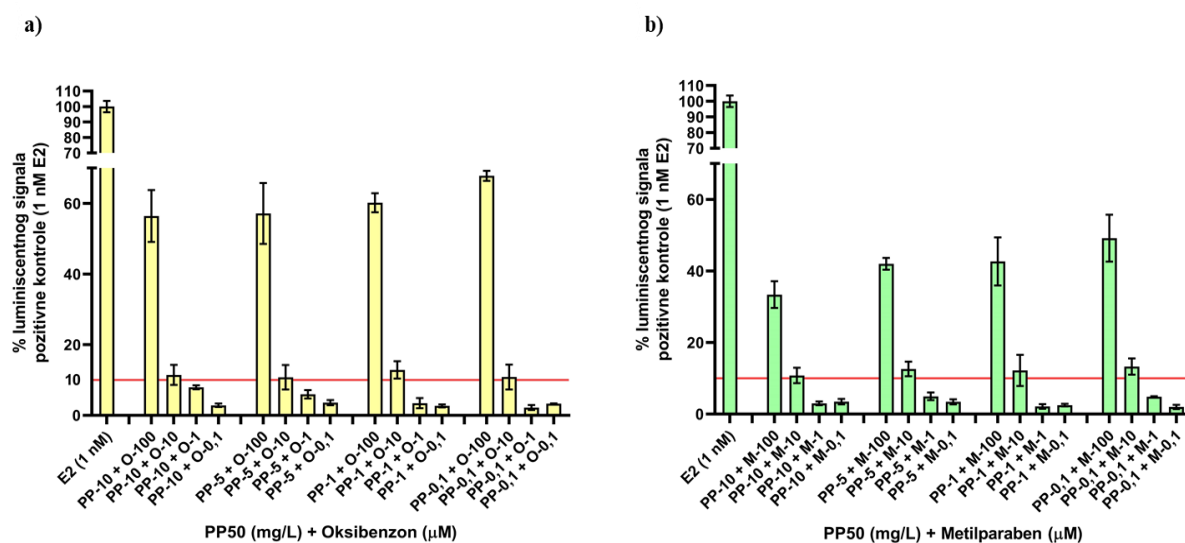
Slika 29. Aktivacija ER nakon tretmana stanica s: a) oksibenzonom i PSNP 50 nm b) metilparabenom i PSNP 50 nm. Crvena linija predstavlja granicu od 10% odgovora pozitivne kontrole koja je potrebna za ostvarivanje agonističkog učinka. Rezultati su prikazani kao postotak luminiscentnog signala pozitivne kontrole, 1 nM E2, a dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.



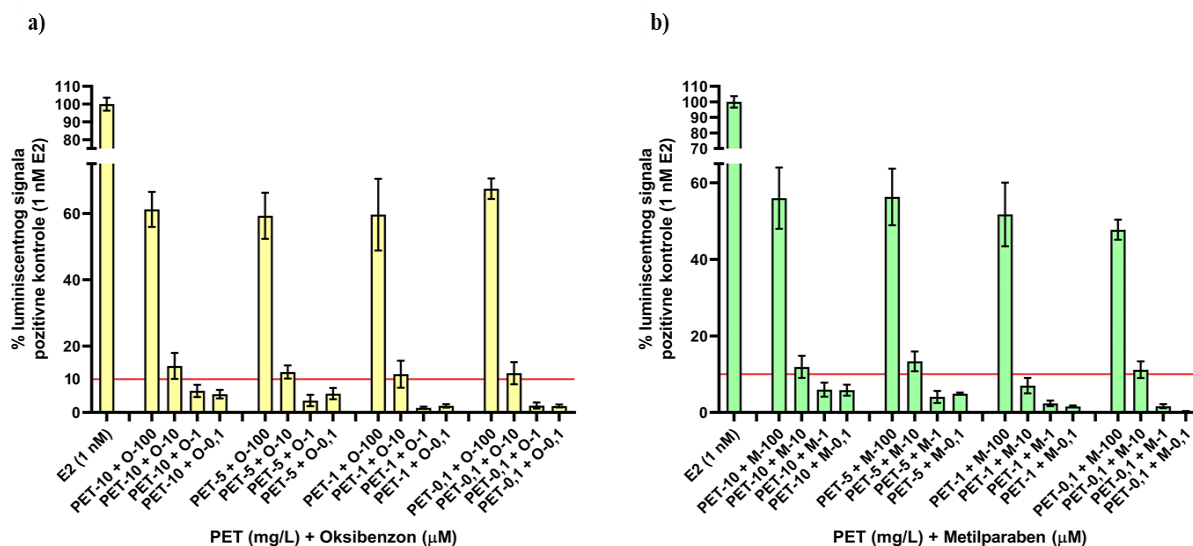
Slika 30. Aktivacija ER nakon tretmana stanica s: a) oksibenzonom i PENP 50 nm b) metilparabenom i PENP 50 nm. Crvena linija predstavlja granicu od 10% odgovora pozitivne kontrole koja je potrebna za ostvarivanje agonističkog učinka. Rezultati su prikazani kao postotak luminiscentnog signala pozitivne kontrole, 1 nM E2, a dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

Na slici 31 prikazana je aktivacija ER postignuta nakon tretmana stanica sa smjesama PPNP promjera 50 nm i oksibenzona i metilparabena. U oba se slučaja može opaziti isti efekt kao i kod PSNP i PENP promjera 50 nm a to je da dvije najveće koncentracije kemikalija u svim smjesama s plastikom imaju agonistički učinak. Ono što ovdje valja istaknuti je da je jedino povećanje odgovora u odnosu na samostalni oksibenzon postigla smjesa s najmanjom koncentracijom PPNP odnosno 0,1 mg/L. Ostale smjese ostvarile su učinak koji se može pripisati samostalnom djelovanju oksibenzona. Tretman stanica smjesama PPNP i metilparabena rezultirao je prilično drugačijom aktivacijom ER. Može se uočiti kako veći postotak aktivacije ER postižu smjese metilparabena s manjom koncentracijom PPNP, odnosno aktivacija ER raste opadanjem koncentracije PPNP. Također, svi odgovori smjesa plastike s najvećom koncentracijom metilparabena manji su nego što je ta koncentracija postigla samostalno. Posebice je to lako primijetiti u slučaju smjese s najvećom koncentracijom plastike koja ostvaruje tek oko 30% odgovora 1 nM E2. Budući da tretman stanica s 10, 5, 1 i 0,1 mg/L PPNP promjera 50 nm nije rezultirao agonizmom prema ER, za očekivati je bilo da će rezultat biti sličan samostalnom djelovanju metilparabena. Ovdje se pokazalo kako PPNP smanjuju aktivaciju ER koju postiže metilparaben.

Tretman stanica smjesama PET-a i oksibenzona ili metilparabena rezultirao je aktivacijom ER prikazanom na slici 32. Smjese PET-a s oksibenzonom koje su sadržavale dvije najveće koncentracije oksibenzona jedine su ispunile kriterije zadane u smjernici OECD-a kao što je to bio slučaj i sa prethodnim PNP. Odgovor smjesa koje su sadržavale PET u koncentracijama 10, 5 i 1 mg/L i 100 µM oksibenzon sličan je kao i odgovor te koncentracije samostalno. Pri najmanjoj koncentraciji, 0,1 mg/L dolazi do blagog povećanja postotka odgovora 1 nM E2 kao što je bilo primijećeno u istim uvjetima s PPNP promjera 50 nm. Kod metilparabena takav efekt nije opažen. Suprotno ostalim PNP, najmanja koncentracija PET-a u kombinaciji s najvećom koncentracijom metilparabena ima manji odgovor nego što je to metilparaben postigao samostalno. Takav su efekt postigle i PPNP promjera 50 nm ali je u tom slučaju on je bio mnogo značajniji pri većim koncentracijama nanočestica, dok je ovdje postignut samo pri najmanjoj (0, 1 mg/L).

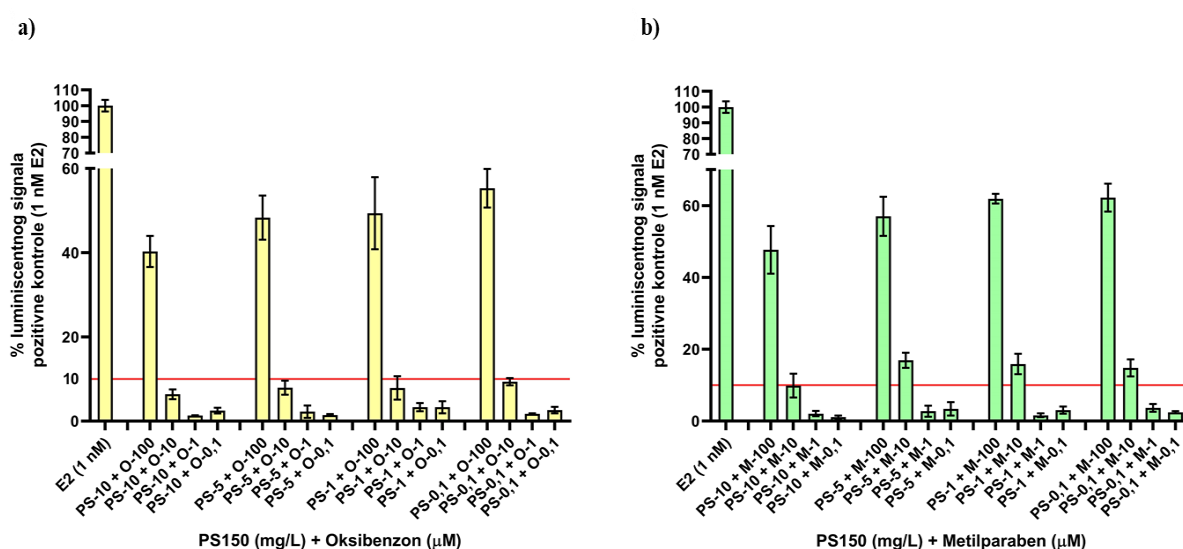


Slika 31. Aktivacija ER nakon tretmana stanica s: a) oksibenzonom i PPNP 50 nm b) metilparabenom i PPNP 50 nm. Crvena linija predstavlja granicu od 10% odgovora pozitivne kontrole koja je potrebna za ostvarivanje agonističkog učinka. Rezultati su prikazani kao postotak luminiscentnog signala pozitivne kontrole, 1 nM E2, a dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.



Slika 32. Aktivacija ER nakon tretmana stanica s: a) oksibenzonom i PET b) metilparabenom i PET. Crvena linija predstavlja granicu od 10% odgovora pozitivne kontrole koja je potrebna za ostvarivanje agonističkog učinka. Rezultati su prikazani kao postotak luminiscentnog signala pozitivne kontrole, 1 nM E2, a dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

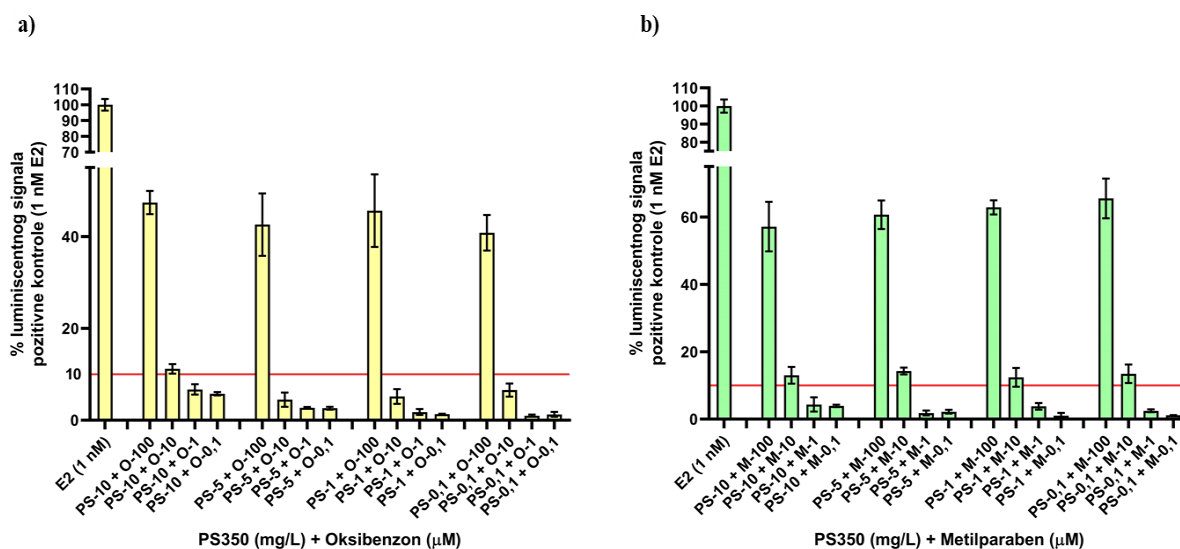
PSNP promjera 150 nm u smjesama s oksibenzonom i metilparabenom postigle su aktivaciju ER prikazanu na slici 33. Za razliku od prethodnih, ove PNP ostvaruju agonističko djelovanje samo u kombinacijama s najvećom koncentracijom oksibenzona. Isto tako, može se uočiti da 10, 5 i 1 mg/L PSNP smanjuju odgovor oksibenzona u odnosu na samostalno a najizraženije najveća koncentracija (10 mg/L). U slučaju smjesa s metilparabenom, 10 μ M koncentracija ima agonistički učinak u kombinaciji s 5, 1 i 0,1 mg/L dok najveća koncentracija PSNP smanjuje njegovu aktivaciju u odnosu na onu koju samostalno postiže. Isti je učinak smanjenja aktivacije uočen i s najvećom koncentracijom metilparabena.



Slika 33. Aktivacija ER nakon tretmana stanica s: a) oksibenzonom i PSNP 150 nm b) metilparabenom i PSNP 150 nm. Crvena linija predstavlja granicu od 10% odgovora pozitivne kontrole koja je potrebna za ostvarivanje agonističkog učinka. Rezultati su prikazani kao postotak luminescentnog signala pozitivne kontrole, 1 nM E2, a dobiveni su iz tripplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

Oksibenzon je u smjesama s PSNP promjera 350 nm ostvario agonizam prema ER u svakoj smjesi koja je sadržavala njegovu najveću koncentraciju (slika 34 a)). Dodatno, agonistički učinak ostvarila je i smjesa koja je sadržavala 10 mg/L PSNP promjera 350 nm i 10 μ M oksibenzon. Isto kao i u slučaju PSNP promjera 150 nm primijećeno je smanjenje odgovora u odnosu na sam oksibenzon ali je izraženije pri manjoj koncentraciji PNP nego pri 10 mg/L, dok je kod PSNP promjera 150 nm obrnuto ovisilo o koncentraciji PNP. Smjese metilparabena i PSNP promjera 350 nm djeluju kao agonisti ER u svim kombinacijama s 100 i 10 μ M

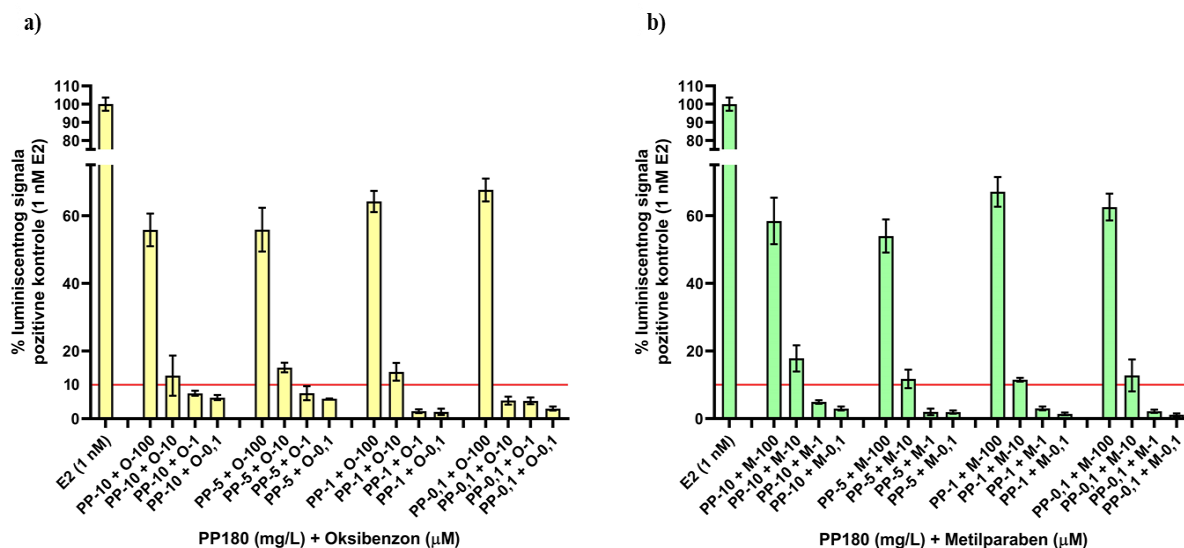
metilparabenom (slika 34. b)). Ono što se još može primijetiti je da nema smanjenja aktivacije u odnosu na samostalno djelovanje kao u slučaju PSNP promjera 150 nm. Naprotiv, smjesa koja sadrži 0,1 mg/L PSNP i 100 μ M metilparaben postiže jaču aktivaciju od samostalnog metilparabena.



Slika 34. Aktivacija ER nakon tretmana stanica s: a) oksibenzonom i PSNP 350 nm b) metilparabenom i PSNP 350 nm. Crvena linija predstavlja granicu od 10% odgovora pozitivne kontrole koja je potrebna za ostvarivanje agonističkog učinka. Rezultati su prikazani kao postotak luminiscentnog signala pozitivne kontrole, 1 nM E2, a dobiveni su iz tripplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

Aktivacija ER koju su postigle smjese PPNP promjera 180 nm i oksibenzona ili metilparabena prikazana je na slici 35. Ponovno se primjećuje da najveća koncentracija oksibenzona ostvaruje agonistički učinak, kao i sve smjese s 10 μ M koncentracijom osim u slučaju 0, 1 mg/L PPNP. Ono što je vrlo zanimljivo primijetiti je u kombinaciji te najniže koncentracije PPNP i 100 μ M oksibenzona dolazi do najjače aktivacije. Vidljivo je kako prilikom tretmana sa smjesama koje sadrže 1 i 0,1 mg/L PPNP dolazi do blagog povećanja aktivacije ER u odnosu na samostalno djelovanje oksibenzona. Također, valja naglasiti kako te koncentracije PPNP nisu ostvarile agonističko djelovanje kada su stanice tretirane samo njima. Suprotno tome, najveća koncentracija PPNP promjera 180 nm samostalno je djelovala agonistički i očekivalo bi se da će se taj učinak pojačati dodatkom oksibenzona u smjesu ali ostvareni učinak odgovara onome koji oksibenzon postiže samostalno. Ponašanje metilparabena u smjesama s PPNP promjera

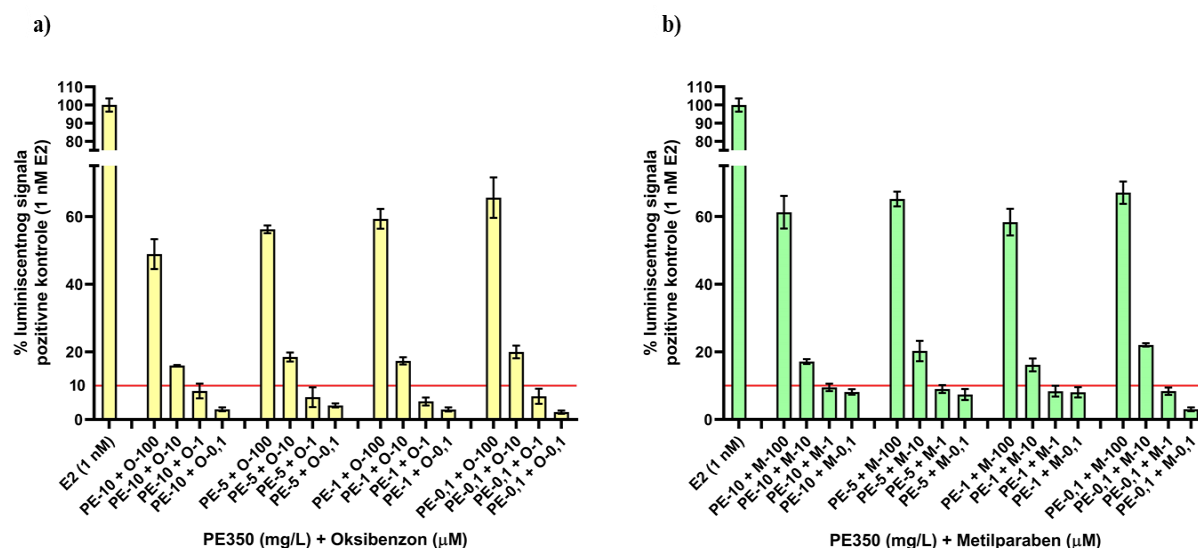
180 nm bilo je slično (slika 35. b)). Naime, ponovno dvije najveće koncentracije (100 i 10 μ M) ostvaruju agonističko djelovanje, neovisno o koncentraciji PPNP. Također, koncentracije PPNP od 1 mg/L i 0,1 mg/L pojačavaju učinak metilparabena u odnosu na njegov samostalni dok one same nisu aktivirale ER.



Slika 35. Aktivacija ER nakon tretmana stanica s: a) oksibenzonom i PPNP 180 nm b) metilparabenom i PPNP 180 nm. Crvena linija predstavlja granicu od 10% odgovora pozitivne kontrole koja je potrebna za ostvarivanje agonističkog učinka. Rezultati su prikazani kao postotak luminescentnog signala pozitivne kontrole, 1 nM E2, a dobiveni su iz tripplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

Rezultati dobiveni nakon tretmana stanica sa smjesama PENP promjera 350 nm i oksibenzona ili metilparabena prikazani su na slici 36. Agonističko djelovanje postignuto je prilikom tretmana sa smjesama koje su sadržavale dvije najveće koncentracije testnih kemikalija i sve od testiranih koncentracija PENP. Učinak smjese koja je sadržavala 10 mg/L PENP i 100 μ M oksibenzona manji je od učinka koji je oksibenzon ostvario samostalno. Takav postotak aktivacije ER odgovara onom koji je postigla koncentracija od 10 mg/L PENP samostalno. Suprotno tome, smjesa koja je sadržavala najmanju koncentraciju PENP i najveću oksibenzona ostvaruje veći učinak od obje komponente samostalno, odnosno učinak se pojačava u smjesi. Koncentracije PENP od 5 i 1 mg/L postižu isti odgovor u smjesi s oksibenzonom kao i on samostalno u najvećoj koncentraciji. Što se tiče 10 μ M koncentracije oksibenzona, njezin je odgovor blago povećan u kombinaciji s PENP u odnosu na samostalno djelovanje a učinak je izraženiji pri manjim koncentracijama nanočestica. Djelovanje smjesa PENP s metilparabenom

je drugačije. Sličnost je da dvije najveće koncentracije metilparabena ostvaruju agonistički učinak u kombinaciji sa svakom koncentracijom PENP. Razlika je očita u smjesi s najvećim koncentracijama obje komponente koja postiže odgovor sličan metilparabenu samostalno. Povećanje odgovora u odnosu na samostalni metilparaben može se uočiti kod koncentracija 5 i 0,1 mg/L PENP dok 10 i 1 mg/L postižu slične odgovore. Također, kao i u slučaju smjesa PENP i oksibenzona, 10 μ M koncentracije metilparabena u smjesi sa svakom koncentracijom PENP postižu veći odgovor nego on samostalno. Isto tako, zanimljivo je primijetiti da je koncentracija od 5 mg/L PENP samostalno ostvarila odgovor veći nego u smjesama s oksibenzonom i metilparabenom. Postignuta aktivacija ER uslijed tretmana s tim smjesama bolje odgovara onoj koju testne kemikalije ostvaruju samostalno u istim koncentracijama.



Slika 36. Aktivacija ER nakon tretmana stanica s: a) oksibenzonom i PENP 350 nm b) metilparabenom i PENP 350 nm. Crvena linija predstavlja granicu od 10% odgovora pozitivne kontrole koja je potrebna za ostvarivanje agonističkog učinka. Rezultati su prikazani kao postotak luminiscentnog signala pozitivne kontrole, 1 nM E2, a dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

4.5. Utjecaj PNP na proces steroidogeneze

4.5.1. Ekspresija gena uključenih u proces steroidogeneze

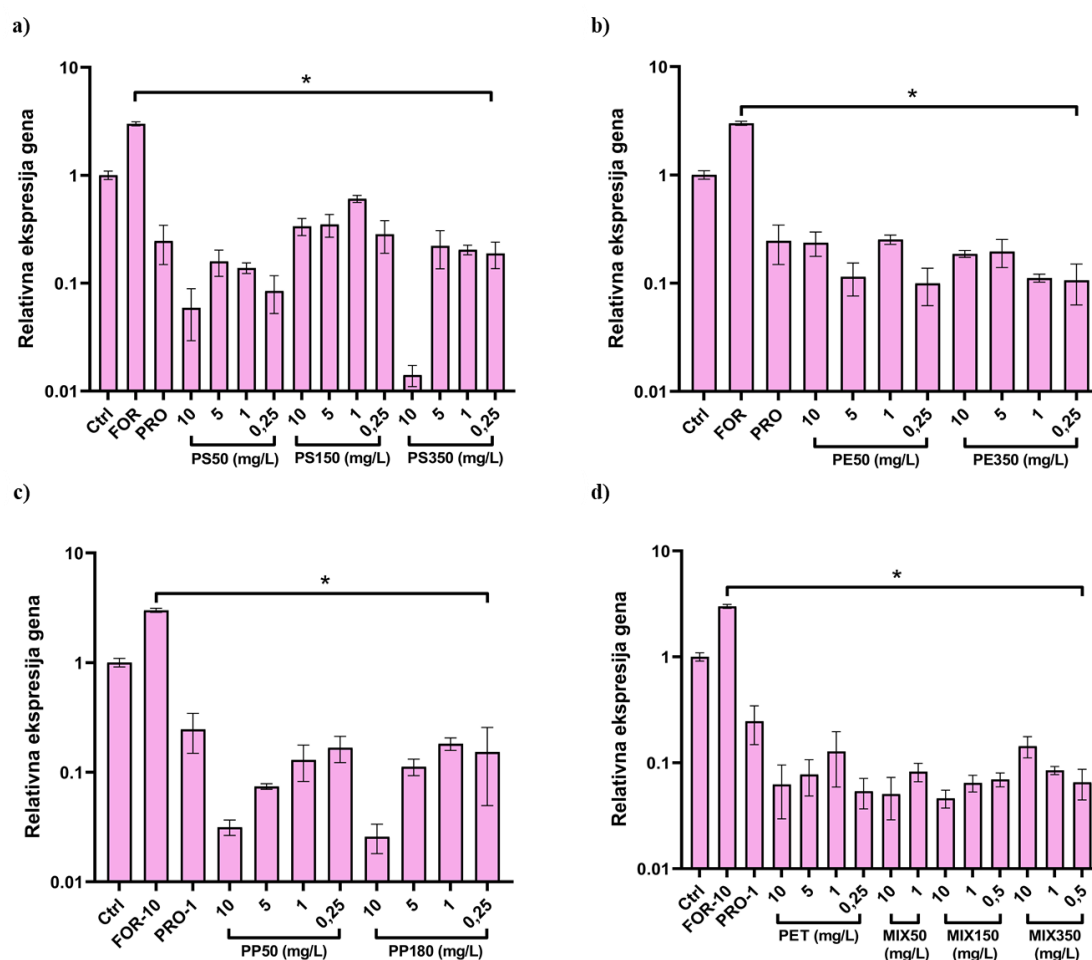
Promjene u ekspresiji gena uključenih u proces steroidogeneze određene su metodom kvantitativnog PCR-a. Rezultati su analizirani metodom koju su predložili Livak i suradnici¹⁷³ a interpretiraju se na način da se za sve uzorke i kontrolu izračuna $2^{-\Delta\Delta C_q}$ vrijednost. Ta vrijednost za netretirane stanice iznosi 1 a utjecaj tretmana tumači se tako da ukoliko je ta vrijednost veća od jedan onda je ekspresija pojačana a ukoliko je manja od 1 onda pojedini tretman smanjuje ekspresiju određenog gena. Kao pozitivna kontrola odnosno kemikalija koja povećava ekspresiju korišten je forskolin, dok je za kontrolu smanjenja ekspresije korišten prokloraz.

Na slici 37. prikazane su promjene u ekspresiji gena *CYP19* za enzim koji prevodi testosteron u E2. Iz dobivenih rezultata može se uočiti kako sve PNP, neovisno o tipu polimera i njihovoj veličini, kao i smjese PNP, značajno smanjuju ekspresiju gena *CYP19*. Takvo smanjenje ekspresije moglo bi imati utjecaj na koncentraciju testosterona u smislu njezinog povećanja.

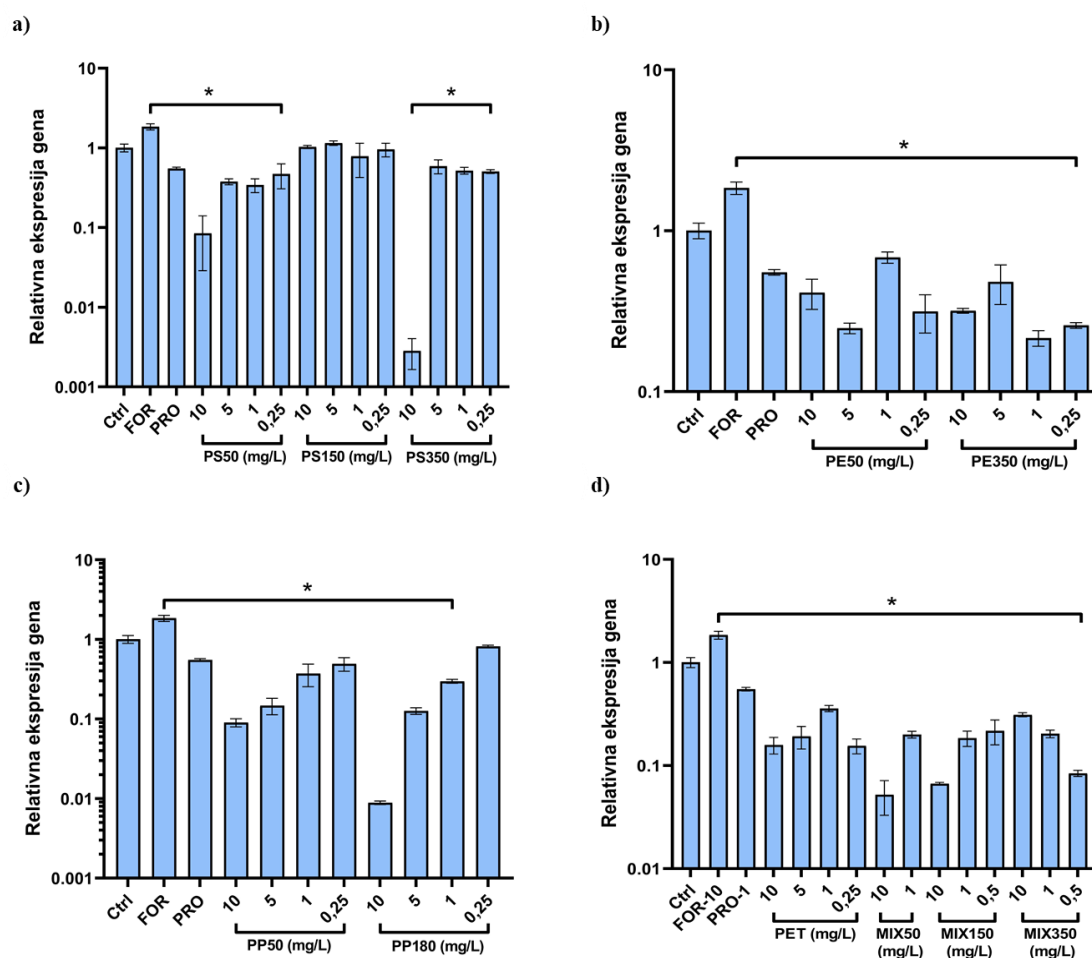
Promjene u ekspresiji gena *CYP17* prikazane su na slici 38. Enzim *CYP17* katalizira sintezu hormona DHEA, 17-OHP i androstendiona. Dobiveni rezultati pokazuju kako sve PNP i njihove smjese osim PSNP promjera 150 nm u svim koncentracijama te PPNP promjera 180 nm u najmanjoj koncentraciji, značajno smanjuju ekspresiju gena *CYP17*. Iz tih rezultata ne može se sa sigurnošću reći kako će utjecati na koncentraciju steroidnih hormona budući da taj enzim katalizira sintezu nekoliko hormona.

Slika 39. prikazuje promjene u ekspresiji gena *CYP11* za enzim koji prevodi kolesterol u pregnenolon. Vidljivo je kako sve koncentracije PNP i njihovih smjesa, osim 1 mg/L PENP promjera 50 nm, smanjuju ekspresiju tog gena u odnosu na kontrolu. Budući da koncentracije kolesterola i pregnenolona nisu mjerene, ne može se reći kakav je učinak to ostvarilo na njih.

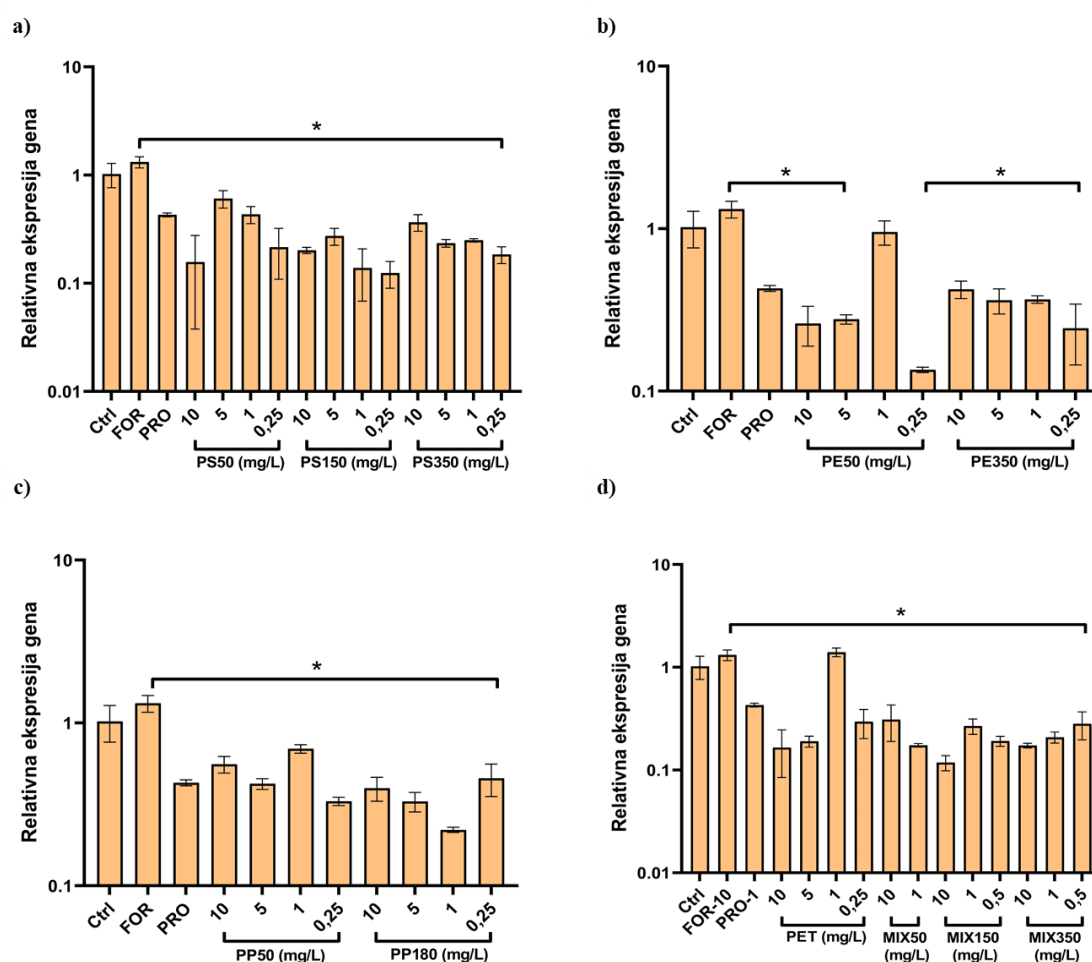
Promjene u ekspresiji gena *3β-HSD* uslijed tretmana NCI-H295R stanica prikazane su na slici 40. Kao i *CYP17*, i ovaj enzim katalizira više reakcija odnosno nastajanje progesterona iz pregnenolona, 17-OHP iz 17-hidroksipregnenolona te androstendiona iz DHEA. PNP i njihove smjese statistički su značajno smanjile ekspresiju ovog gena.



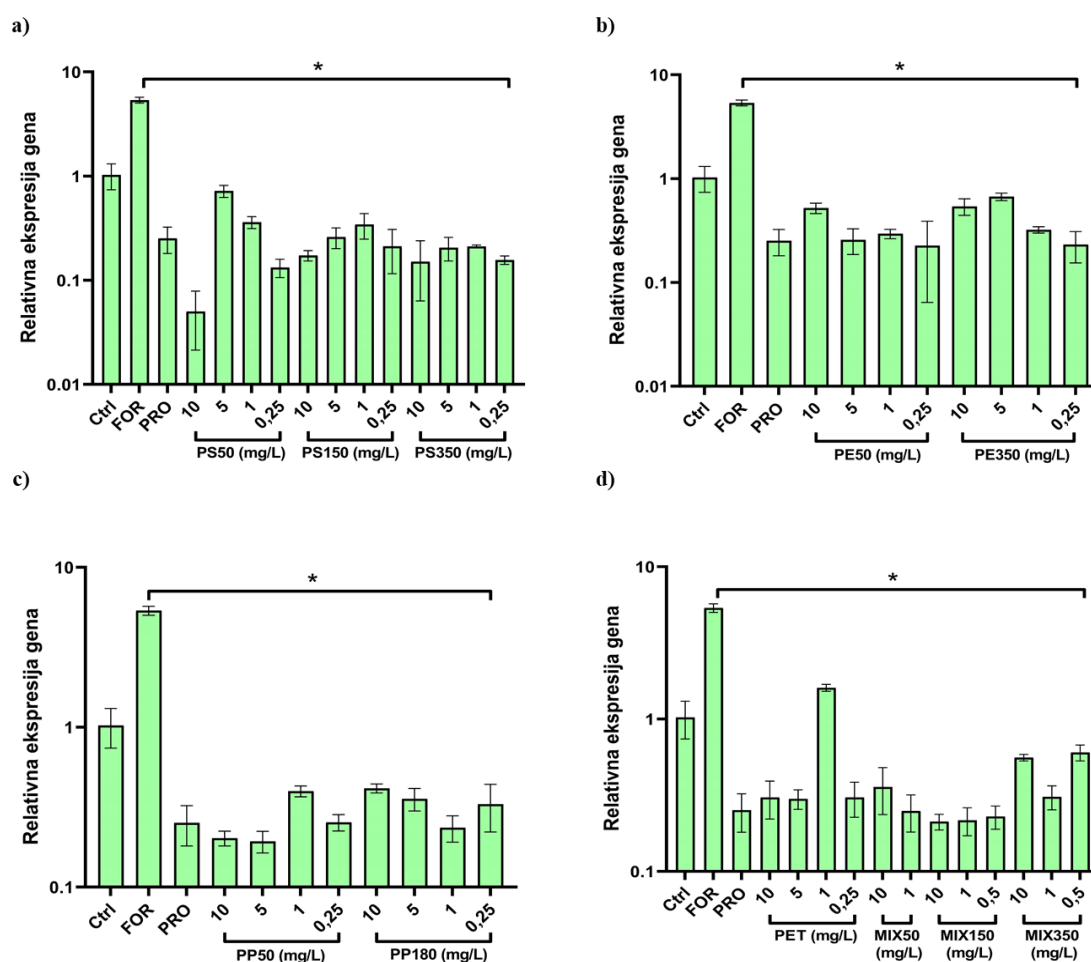
Slika 37. Promjene u ekspresiji gena *CYP19* uslijed tretmana NCI-H295R stanica s: a) PSNP promjera 50, 150 i 350 nm, b) PENP promjera 50 i 350 nm, c) PPNP promjera 50 i 180 nm i d) PET i smjesama MIX50, MIX 150 i MIX350. Promjene su izračunate metodom $2^{-\Delta\Delta C_q}$, a dobivene su iz tripplikata dvaju ponovljenih eksperimenata. Statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane stanice) označene su zvjezdicom (*).



Slika 38. Promjene u ekspresiji gena *CYP17* uslijed tretmana NCI-H295R stanica s: a) PSNP promjera 50, 150 i 350 nm, b) PENP promjera 50 i 350 nm, c) PPNP promjera 50 i 180 nm i d) PET i smjesama MIX50, MIX 150 i MIX350. Promjene su izračunate metodom $2^{-\Delta\Delta Cq}$, a dobivene su iz tripplikata dvaju ponovljenih eksperimenata. Statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane stanice) označene su zvjezdicom (*).



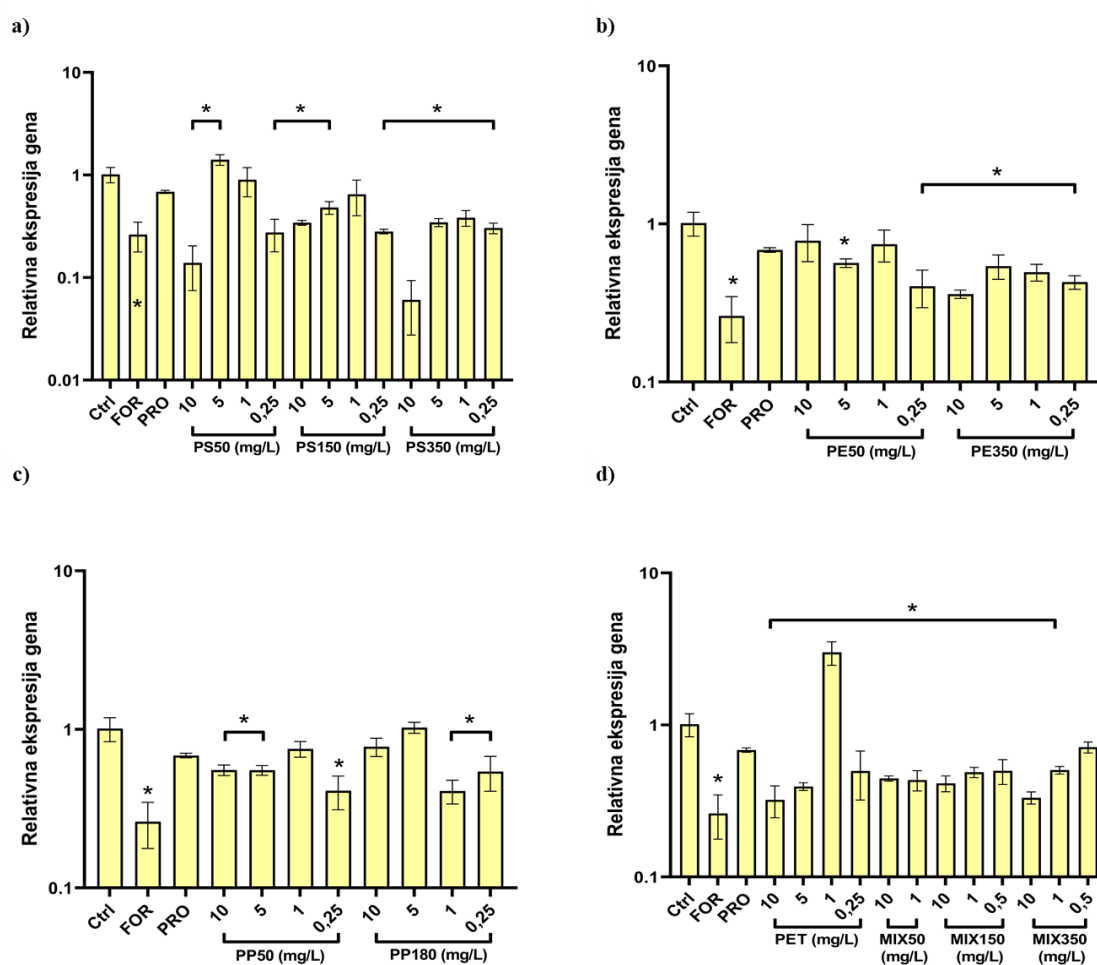
Slika 39. Promjene u ekspresiji gena *CYP11* uslijed tretmana NCI-H295R stanica s: a) PSNP promjera 50, 150 i 350 nm, b) PENP promjera 50 i 350 nm, c) PPNP promjera 50 i 180 nm i d) PET i smjesama MIX50, MIX 150 i MIX350. Promjene su izračunate metodom $2^{-\Delta\Delta Cq}$, a dobivene su iz tripplikata dvaju ponovljenih eksperimenata. Statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane stanice) označene su zvjezdicom (*).



Slika 40. Promjene u ekspresiji gena 3β -HSD uslijed tretmana NCI-H295R stanica s: a) PSNP promjera 50, 150 i 350 nm, b) PENP promjera 50 i 350 nm, c) PPNP promjera 50 i 180 nm i d) PET i smjesama MIX50, MIX 150 i MIX350. Promjene su izračunate metodom $2^{-\Delta\Delta Cq}$, a dobivene su iz tripplikata dvaju ponovljenih eksperimenata. Statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane stanice) označene su zvjezdicom (*).

17β -HSD katalizira reakciju prevođenja androstendiona u testosteron kao i estrona u estradiol. Promjene u ekspresiji gena prikazane su na slici 41. U ovom su slučaju rezultati znatno drugačiji nego kod ostalih gena. PSNP promjera 50 nm u koncentraciji 10 mg/L statistički značajno smanjuju njegovu ekspresiju, dok u koncentraciji od 5 mg/L statistički značajno ju povećavaju. Koncentracija od 1 mg/L nema utjecaja na ekspresiju, dok ju najmanja koncentracija od 0,25 mg/L statistički značajno smanjuje. U slučaju PSNP promjera 150 nm sve koncentracije osim 1 mg/L statistički značajno smanjuju ekspresiju a kod najvećih PSNP sve koncentracije. Kod PENP promjera 50 nm koncentracije od 10 i 1 mg/L nemaju statistički

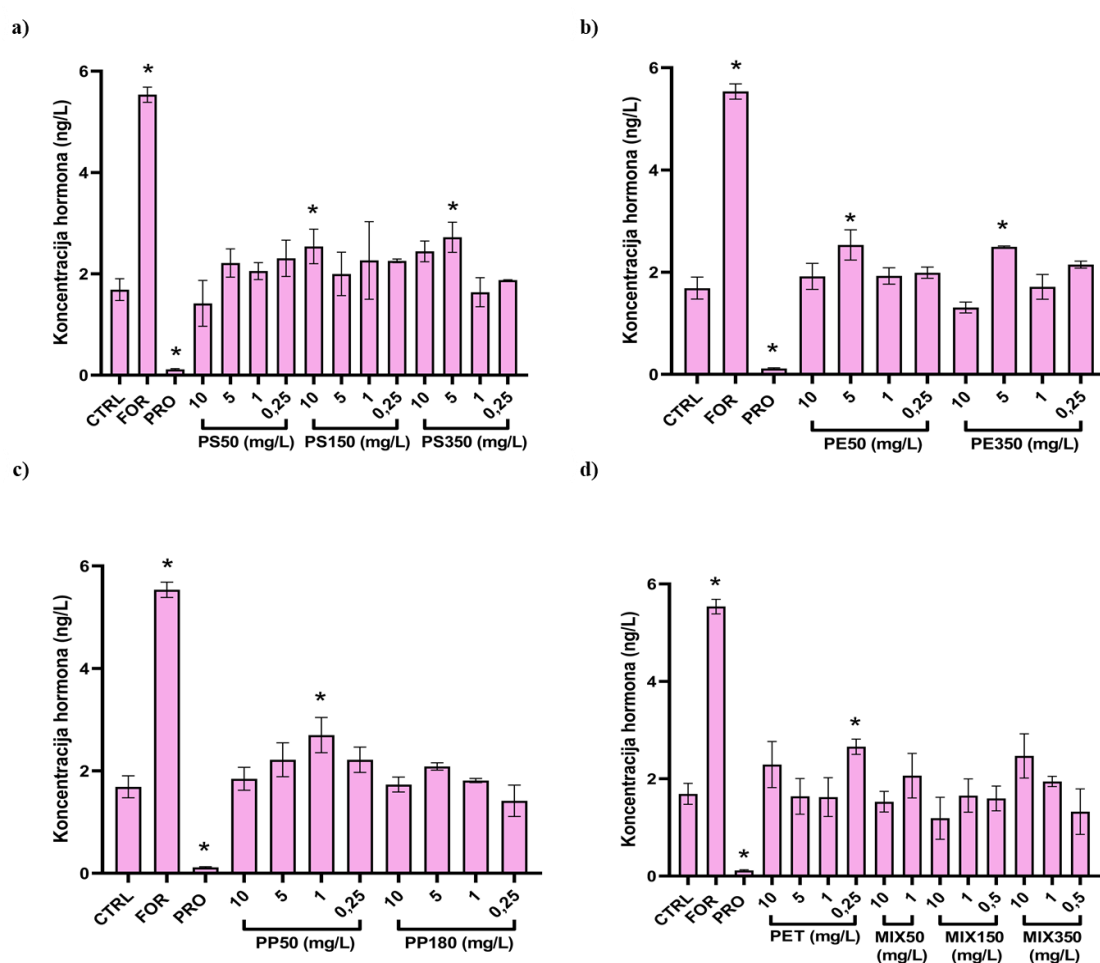
značajan utjecaj dok 5 i 0,25 mg/L statistički značajno smanjuju ekspresiju. Veće PENP u svakoj koncentraciji djeluju na način da smanjuju ekspresiju. Koncentracije od 10, 5 i 0,25 mg/L PPNP promjera 50 nm statistički značajno smanjuju ekspresiju a 1 mg/L nema utjecaj, dok veće nanočestice istog tipa polimera nemaju utjecaj u većim koncentracijama a 1 i 0,25 mg/L smanjuju ekspresiju. U slučaju PET zanimljivo je kako 1 mg/L jako povećava ekspresiju dok ostale koncentracije smanjuju. Sve koncentracije smjesa MIX50, MIX150 i MIX350 (osim 0,5 mg/L) statistički značajno smanjuju ekspresiju.



Slika 41. Promjene u ekspresiji gena *17β-HSD* uslijed tretmana NCI-H295R stanica s: a) PSNP promjera 50, 150 i 350 nm, b) PENP promjera 50 i 350 nm, c) PPNP promjera 50 i 180 nm i d) PET i smjesama MIX50, MIX 150 i MIX350. Promjene su izračunate metodom $2^{-\Delta\Delta C_q}$, a dobivene su iz tripplikata dvaju ponovljenih eksperimenata. Statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane stanice) označene su zvjezdicom (*).

4.5.2. Kvantifikacija steroidnih hormona

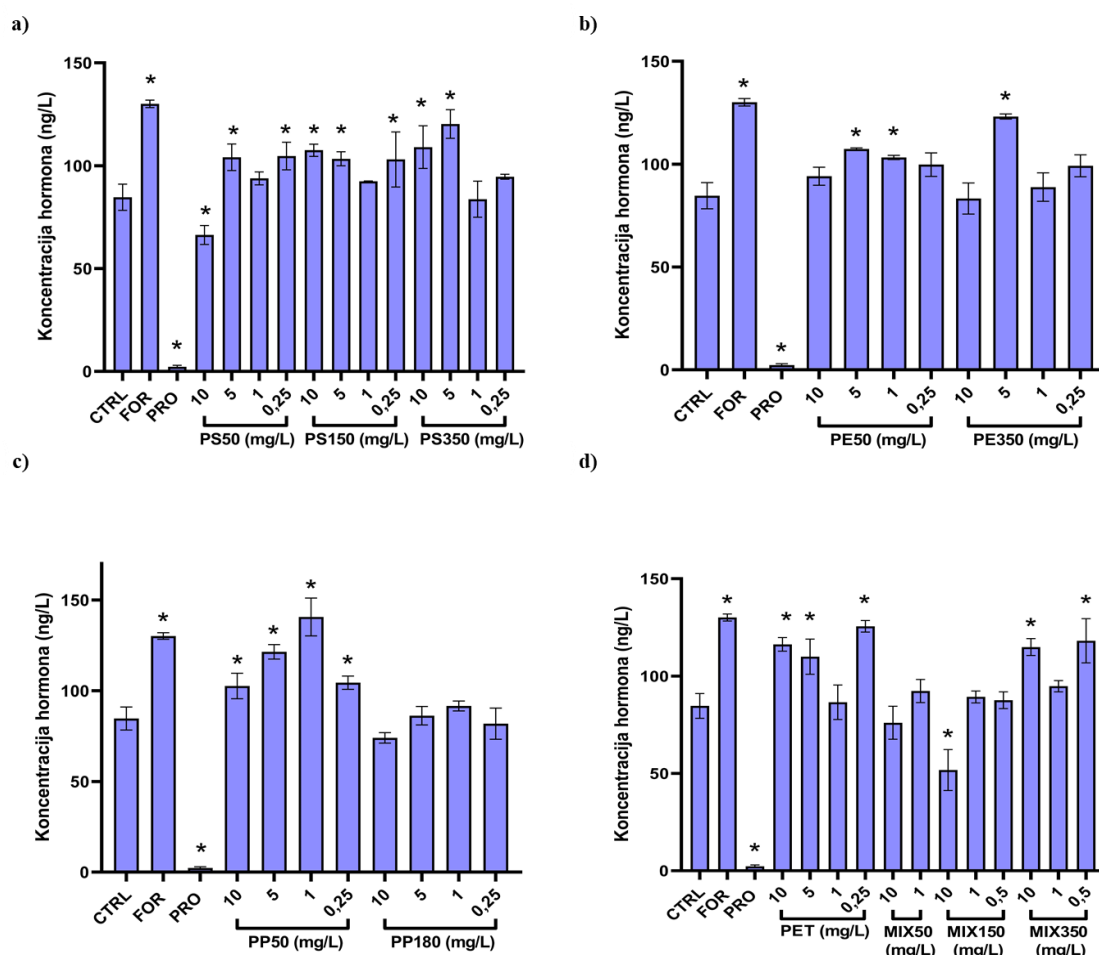
Koncentracija steroidnih hormona u supernatantu iznad stanica nakon tretmana stanica različitim PNP i njihovim smjesama određena je pomoću LC-MS/MS. Slika 42. prikazuje učinak PNP i njihovih smjesa na promjene u koncentraciji testosterona. Statistički značajne promjene uočene su uslijed tretmana s 10 mg/L PSNP promjera 150 nm i 5 mg/L PSNP promjera 350 nm. Također, koncentracija od 5 mg/L u slučaju PENP obje veličine statistički je značajno povećala koncentraciju testosterona u odnosu na netretirane stanice. U slučaju PPNP samo koncentracija od 1 mg/L manjih nanočestica statistički značajno povećala koncentraciju testosterona.



Slika 42. Koncentracije testosterona nakon tretmana NCI-H295R stanica s: a) PSNP promjera 50, 150 i 350 nm, b) PENP promjera 50 i 350 nm, c) PPNP promjera 50 i 180 nm i d) PET i smjesama MIX50, MIX150 i MIX350. Rezultati su prikazani kao koncentracija hormona (ng/L) a dobiveni su iz tripplikata dvaju ponovljenih eksperimenata. Statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane stanice) označene su zvjezdicom (*).

Zanimljivo je da samo najmanja koncentracija PET nanočestica statistički značajno povećala koncentraciju kao i činjenica da nijedna od smjesa nema značajnog učinka.

Koncentracije androstendiona nakon tretmana prikazane su na slici 43. U slučaju ovog hormona mnogo je više tretmana utjecalo na povećanje ili smanjenje koncentracije u odnosu na kontrolu.



Slika 43. Koncentracije androstendiona nakon tretmana NCI-H295R stanica s: a) PSNP promjera 50, 150 i 350 nm, b) PENP promjera 50 i 350 nm, c) PPNP promjera 50 i 180 nm i d) PET i smjesama MIX50, MIX150 i MIX350. Rezultati su prikazani kao koncentracija hormona (ng/L) a dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata. Statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane stanice) označene su zvjezdicom (*).

Koncentracije od 10 mg/L i 5 mg/L u slučaju PSNP svih veličina uzrokovale su statistički značajno povećanje androstendiona ali i najmanja koncentracija PSNP 50 i 150 nm. PENP

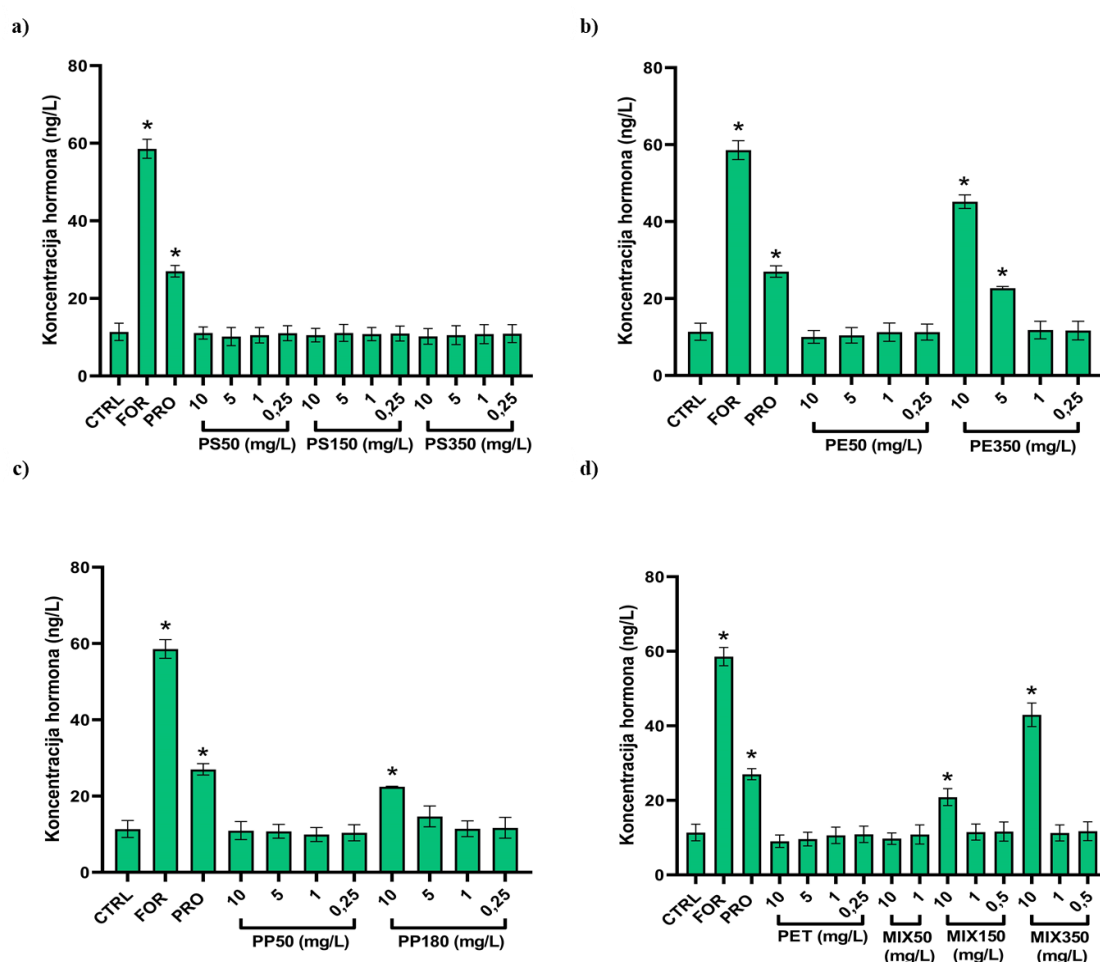
drugačije su utjecale na koncentraciju, odnosno veće su nanočestice samo u koncentraciji od 5 mg/L rezultirale povećanjem a one promjera 50 nm u koncentraciji od 5 i 1 mg/L.

Kod tretmana s PPNP zanimljivo je da su sve koncentracije promjera 50 nm statistički značajno povećale koncentraciju androstendiona dok veće nanočestice nisu imale statistički značajan utjecaj. Sve koncentracije PET osim 1 mg/L statistički su značajno povećale koncentraciju hormona dok smjesa MIX50 nije imala utjecaj. To je zanimljivo s obzirom na činjenicu da su PSNP, PPNP i PET pojedinačno u tim koncentracijama ostvarile statistički značajan učinak. U slučaju MIX150 samo je koncentracija od 10 mg/L promijenila koncentraciju i to na način da je ona manja u odnosu na netretirane stanice, dok 10 mg/mL i 0,5 mg/mL smjese MIX350 statistički značajno povećavaju koncentraciju.

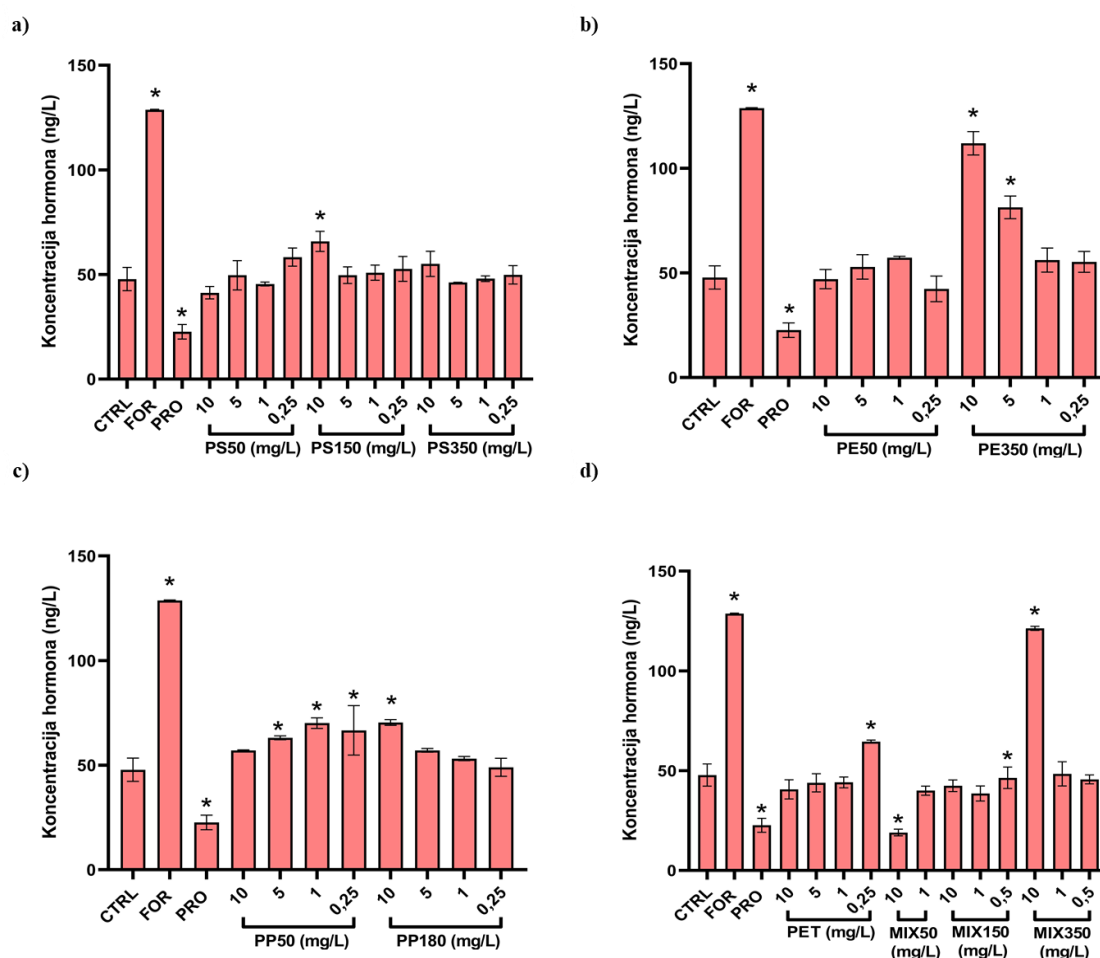
Razlike u koncentracijama progesterona između stanica tretiranih PNP i njihovim smjesama i netretiranih stanica prikazane su na slici 44. Nijedna od koncentracija PSNP svih veličina nije statistički značajno utjecala na koncentraciju progesterona, kao ni PENP promjera 50 nm. Suprotno tome, tretman s PENP promjera 350 nm u koncentracijama od 10 i 5 mg/L rezultirao je statistički značajnim porastom koncentracije ciljnog hormona u usporedbi s netretiranim stanicama. U slučaju PPNP dolazi do sličnog efekta, PPNP manjeg promjera ne rezultiraju statistički značajnim promjenama u koncentraciji, dok 10 mg/L PPNP promjera 180 nm statistički značajno povećava koncentraciju progesterona. Nadalje, nijedna koncentracija PET-a nije utjecala na koncentraciju hormona, kao ni smjesa MIX50. S obzirom da nijedna od sastavnica smjese MIX50 samostalno ne ostvaruje učinke, ovakav rezultat ne iznenađuje. Kod smjese MIX150 najveća koncentracija pokazuje statistički značajno povećanje u odnosu na kontrolu, kao i najveća koncentracija smjese MIX350.

Koncentracije 17-OHP prikazane su na slici 45. Jedinu statistički značajnu promjenu u slučaju PSNP sve tri veličine ostvarila je najveća koncentracija PSNP promjera 150 nm. U slučaju PENP kod manjeg promjera nema statistički značajne promjene dok u slučaju veličine od 350 nm koncentracije od 10 i 5 mg/L uzrokuju statistički značajno povećanje koncentracije ciljnog hormona u odnosu na netretirane stanice. Tretman PPNP promjera 50 nm rezultirao je povećanjem 17-OH-progesterona u slučaju svih koncentracija osim najveće odnosno 10 mg/L. Kod nanočestica većeg promjera, situacija je obrnuta, samo je ta koncentracija ostvarila djelovanje u smislu povećanja. Tretman najmanjom koncentracijom PET-a jedini je doveo do statistički značajnog povećanja koncentracije. Smjesa MIX50 u koncentraciji 10 mg/L jedina je ostvarila statistički značajno smanjenje koncentracije u odnosu na kontrolu. S obzirom da

komponente te smjese u istim koncentracijama samostalno nisu ostvarile nikakav značajni učinak, u ovom slučaju možemo zaključiti da se učinak pojačava u smjesi. Smjesa MIX150 također je pokazala zanimljive rezultate. Naime, njene komponente samostalno ostvarile su statistički značajno povećanje koncentracije dok u zajedničkom učinku nema statistički značajne razlike u odnosu na netretirane stanice, odnosno učinak u smjesi se poništava. Isto tako, zanimljivo je da je najmanja koncentracija te smjese djelovala povećanjem koncentracije. U slučaju smjese MIX350 najveća koncentracija statistički značajno povećava koncentraciju ciljnog hormona, isto kao i komponente te smjese zasebnim djelovanjem.



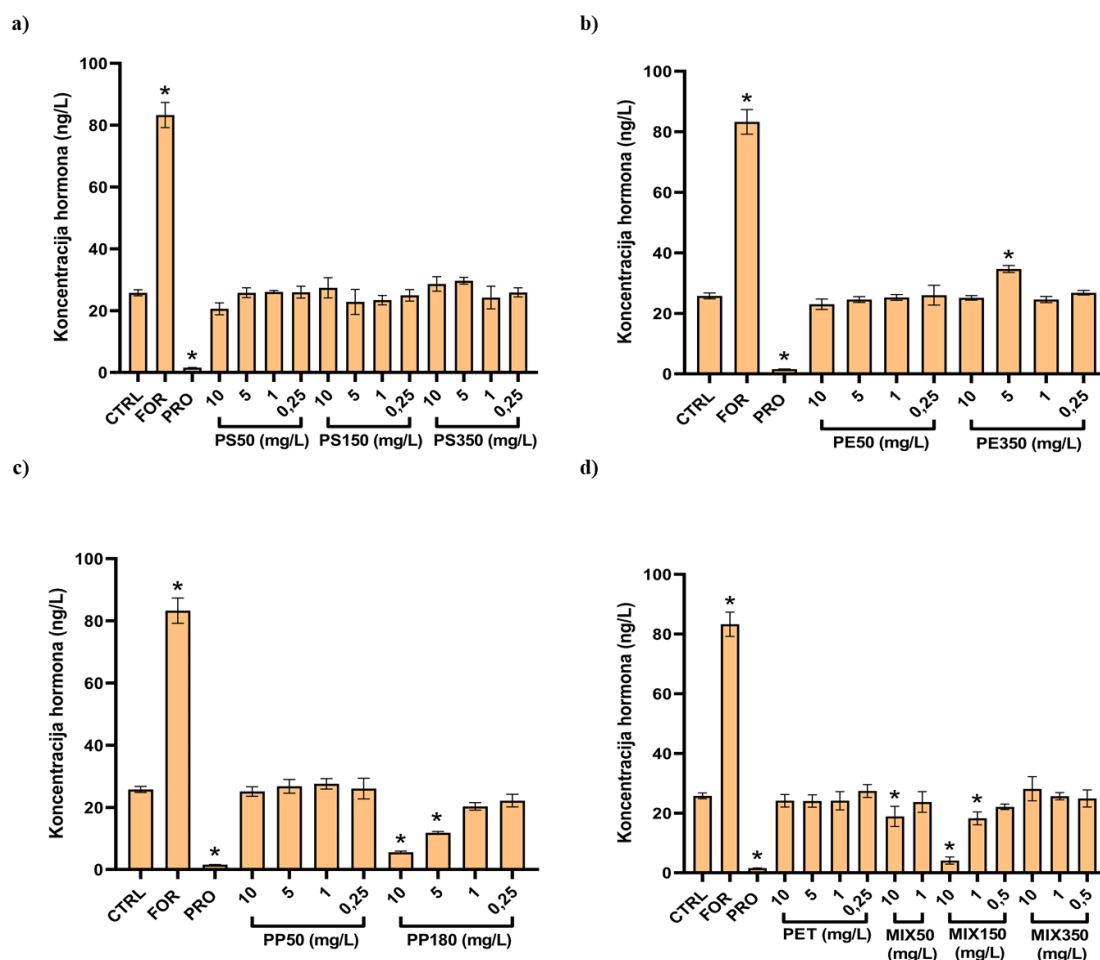
Slika 44. Koncentracije progesterona nakon tretmana NCI-H295R stanica s: a) PSNP promjera 50, 150 i 350 nm, b) PENP promjera 50 i 350 nm, c) PPNP promjera 50 i 180 nm i d) PET i smjesama MIX50, MIX150 i MIX350. Rezultati su prikazani kao koncentracija hormona (ng/L) a dobiveni su iz tripplikata dvaju ponovljenih eksperimenata. Statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane stanice) označene su zvjezdicom (*).



Slika 45. Koncentracije 17-OHP nakon tretmana NCI-H295R stanica s: a) PSNP promjera 50, 150 i 350 nm, b) PENP promjera 50 i 350 nm, c) PPNP promjera 50 i 180 nm i d) PET i smjesama MIX50, MIX150 i MIX350. Rezultati su prikazani kao koncentracija hormona (ng/L) a dobiveni su iz tripplikata dvaju ponovljenih eksperimenata. Statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane stanice) označene su zvjezdicom (*).

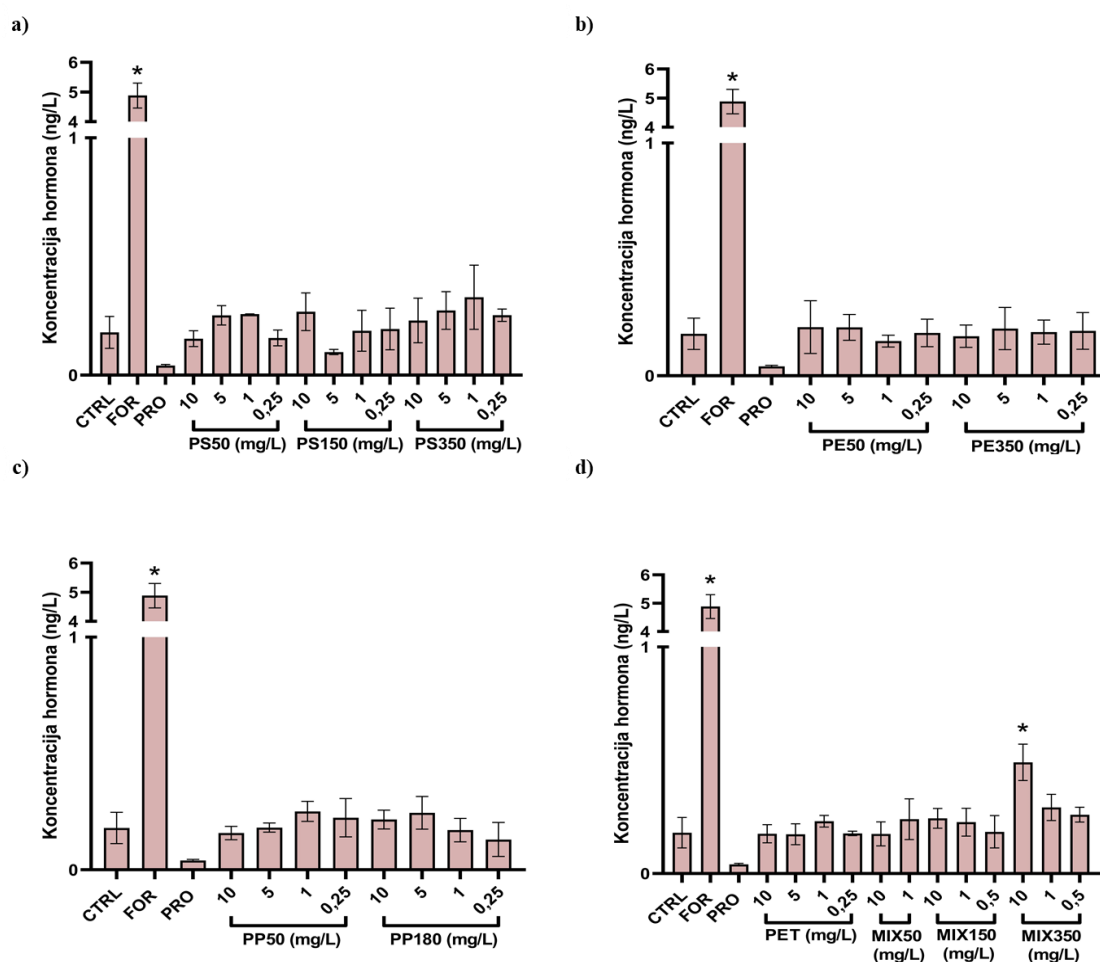
Tretman NCI-H295R stanica s PNP i njihovim smjesama utjecao je na koncentraciju DHEA na način prikazan na slici 46. Nijedan tretman PSNP, neovisno o veličini i koncentraciji, nije rezultirao statistički značajnom promjenom ciljnog hormona. Kod PENP, jedini statistički značajan porast koncentracije dogodio se u slučaju tretmana s 5 mg/L PENP promjera 350 nm. Dvije najveće koncentracije PPNP promjera 180 nm rezultirale su smanjenjem koncentracije DHEA u odnosu na kontrolu, dok manje PPNP nisu pokazale statistički značajan učinak. Nijedna koncentracija PET-a nije pokazala djelovanje, a 10 mg/L smjese MIX50 smanjilo je koncentraciju ovog hormona. Koncentracije od 10 i 5 mg/L smjese MIX150 također su imale

učinak smanjenja koncentracije. Takav rezultat ne iznenađuje jer je učinak PPNP 180 nm u istim koncentracijama samostalno ostvario takav učinak. Kod smjese MIX350 nema statistički značajnog efekta iako je PENP 350 nm samostalno u koncentraciji od 5 mg/L statistički značajno povećao koncentraciju DHEA.



Slika 46. Koncentracije DHEA nakon tretmana NCI-H295R stanica s: a) PSNP promjera 50, 150 i 350 nm, b) PENP promjera 50 i 350 nm, c) PPNP promjera 50 i 180 nm i d) PET i smjesama MIX50, MIX150 i MIX350. Rezultati su prikazani kao koncentracija hormona (ng/L) a dobiveni su iz tripplikata dvaju ponovljenih eksperimenata. Statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane stanice) označene su zvjezdicom (*).

Koncentracije estradiola nakon tretmana prikazane su na slici 47. Jedina statistički značajna promjena primijećena je u slučaju najveće koncentracije smjese MIX350. Samostalno djelovanje komponenti te smjese nije rezultiralo statistički značajnom promjenom stoga može se reći da se učinak pojačao u smjesi.



Slika 47. Koncentracije estradiola nakon tretmana NCI-H295R stanica s: a) PSNP promjera 50, 150 i 350 nm, b) PENP promjera 50 i 350 nm, c) PPNP promjera 50 i 180 nm i d) PET i smjesama MIX50, MIX150 i MIX350. Rezultati su prikazani kao koncentracija hormona (ng/L) a dobiveni su iz tripplikata dvaju ponovljenih eksperimenata. Statistički značajne razlike u odnosu na negativnu kontrolu (netretirane stanice) označene su zvjezdicom (*).

§ 5. ZAKLJUČAK

Provedena fizikalno-kemijska karakterizacija pokazala je kako su sve korištene nanočestice plastike osim nanočestica polietilena promjera 50 nm i nanočestica polipropilena promjera 50 nm sferičnog oblika. Hidrodinamički promjer nanočestica određen u vodi u dobrom je slaganju s veličinama navedenim u njihovim certifikatima analize. Zeta potencijal nanočestica plastike određen u ultračistoj vodi upućuje na njihovu koloidnu stabilnost.

Odabrane koncentracije nanočestica plastike (10, 5, 1 i 0,1 mg/L) nisu citotoksične za stanične linije AR-EcoScreen GR KO M1, HeLa-9903 i NCI-H295R. Kombinacijom tih nanočestica u različitim koncentracijama dobivene su smjese za koje se testom preživljenja stanica nakon tretmana također pokazalo da su sigurne za korištenje u staničnim eksperimentima.

U ovom doktorskom radu korištene su 3 smjernice koje Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj predlaže za određivanje endokrino-disruptivnog potencijala kemikalija i 3 stanične linije kao modelni sustavi. Korištenjem tih smjernica ispitan je učinak 8 različitih nanočestica plastike i njihovih smjesa na androgeni i estrogenski receptor te proces steroidogeneze. Za određivanje učinka nanočestica plastike na androgeni receptor praćen je postotak inhibicije odgovora dihidrotestosterona te je pokazano da se nanočestice polipropilena u obje veličine, kao i nanočestice polietilena promjera 350 nm ponašaju kao antagonisti androgenog receptora. Također, nanočestice polietilena promjera 350 nm i polipropilena promjera 180 nm jedine pokazuju agonistički učinak prema estrogenom receptoru samostalno. Smjesa koju su sačinjavale nanočestice polistirena (50 nm), polietilena (50 nm), polipropilena (50 nm) i polietilentereftalata pokazala je antagonističko djelovanje na androgeni receptor i agonističko prema estrogenom receptoru. Isti učinak ostvarile su smjesa polistirena (150 nm) i polipropilena (180nm) te smjesa polistirena (350 nm) i polietilena (350 nm). Smjesa nanočestica polistirena različitih veličina (50, 150 i 350 nm) nije pokazala nijedno od tih djelovanja. Jedini učinak koji su samostalno ostvarile nanočestice promjera 50 nm bio je u slučaju nanočestica polipropilena koje su pokazale antagonističko djelovanje prema androgenom receptoru. Budući da jedino nanočestice polipropilena u obje veličine pokazuju djelovanje prema receptorima može se zaključiti da je u ovom istraživanju učinak polipropilena kao vrste polimera bio najizraženiji. Što se tiče veličine, budući da se nijedna veličina

nanočestica polistirena u samostalnom djelovanju nije ponašala kao antagonist androgenog ili agonist estrogenog receptora, može se zaključiti kako vrsta polimera ima značajniju ulogu u ostvarivanju interakcija s receptorima.

Oksibenzon i metilparaben samostalno su djelovali kao agonisti estrogenog i antagonisti androgenog receptora a njihov se učinak pojačao sudjelovanjem u smjesama s onim nanočesticama plastike koje su imale isto djelovanje. Testirane nanočestice plastike i njihove smjese djelovale su na ekspresiju enzima na način da su statistički značajno smanjivale ekspresiju ciljnih gena dok su samo pojedine imale statistički značajan utjecaj na koncentracije steroidnih hormona.

Dobiveni rezultati potvrđuju zadanu hipotezu da učinci nanočestica plastike na androgeni i estrogeni receptor ovise o vrsti i veličini nanočestica, kao i da njihova prisutnost u smjesama može utjecati na endokrino-disruptivni profil oksibenzona i metilparabena. Ovi rezultati doprinose razumijevanju učinaka nanočestica plastike na reproduktivno zdravlje.

§ 6. POPIS OZNAKA, KRATICA I SIMBOLA

17-OHP – 17-hidroksiprogesteron

ADI – prihvatljivi dnevni unos (od engl. *acceptable daily intake*)

ANOVA – analiza varijance (od engl. *analysis of variance*)

AR – androgeni receptor

ATCC – Američka banka stanica (od engl. *American Type Culture Collection*)

BAM – Savezni zavod za istraživanje i ispitivanje materijala (od njem. *Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung*)

BP-3 – benzofenon-3

cDNA – komplementarna DNA (od engl. *complementary DNA*)

CS-FBS – fetalni goveđi serum pročišćen aktivnim ugljenom (od engl. *charcoal-stripped fetal bovine serum*)

DHEA - dehidroepiandrosteron

DHT – dihidrotestosteron

DLS – dinamičko raspršenje svjetlosti (od engl. *dynamic light scattering*)

DMSO – dimetilsulfoksid

DNA – deoksiribonukleinska kiselina (od engl. *deoxyribonucleic acid*)

E2 - 17 β -estradiol

ECHA – Europska agencija za kemikalije

EDC – endokrino disruptivne kemikalije (od engl. *endocrine disrupting chemicals*)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

ELS – elektroforetsko raspršenje svjetlosti (od engl. *electrophoretic light scattering*)

ER – estrogini receptor

ERE – element odgovora na estrogen (od engl. *estrogen responsive element*)

EU – Europska Unija

FBS – Fetalni goveđi serum (od engl. *fetal bovine serum*)

FDA – Food and Drug Administration

IC50 – koncentracija lijeka koja ubija 50 % stanica

JCRB – Japanska banka stanica (od engl. *Japanese Collection of Research Bioresources*)

JRC – Zajednički istraživački centar (od engl. *Joint Research Centre*)

LC/MS-MS – vezani sustav tekućinska kromatografija – tandemna spektrometrija masa (od engl. *liquid chromatography tandem - mass spectrometry*)

mRNA – glasnička RNA (od engl. *messenger RNA*)

MTS - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij

OECD – Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj

PBS – puferirana fiziološka otopina (od engl. *phosphate buffered saline*)

PDI – indeks polidisperznosti (od engl. *polydispersity index*)

PE – polietilen

PENP – nanočestice polietilena

PET – polietilen tereftalat

PMP – mikročestice plastike (od engl. *plastic microparticles*)

PMS – fenazin metosulfat

PNP – nanočestice plastike (od engl. *plastic nanoparticles*)

PP – polipropilen

PPNP – nanočestice polipropilena

PR – progesteronski receptor

PS – polistiren

PSNP – nanočestice polistirena

PVC – poli(vinil-klorid)

REACH – Registracija, evaluacija, autorizacija i ograničavanje kemikalija

RNA – ribonukleinska kiselina (od engl. *ribonucleic acid*)

RT-qPCR – kvantitativna lančana reakcija polimeraze u stvarnom vremenu (od engl. *real-time quantitative polymerase chain reaction*)

SAD – Sjedinjene Američke Države

SCCS – Znanstveni odbor Europske Unije za sigurnost potrošača

SEM – skenirajuća elektronska mikroskopija

TR – tiroidni receptor

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. Maria Tsakona, Elaine Baker, Ieva Rucevska, Thomas Maes, Lars Rosendahl Appelquist, Miles Macmillan-Lawler, Peter Harris, et al., *Marine Litter and Plastic Waste Vital Graphics*, 2021, pp. 1–77.
2. L. Peng, D. Fu, H. Qi, C.Q. Lan, H. Yu, and C. Ge, *Sci. Total Environ.* **698** (2020) 134254.
3. A.W. Verla, C.E. Enyoh, E.N. Verla, and K.O. Nwornorh, *SN Appl. Sci.* **1** (2019).
4. E. Panel, and F. Chain, *EFSA J.* **14** (2016).
5. J. Gigault, A. ter Halle, M. Baudrimont, P.Y. Pascal, F. Gauffre, T.L. Phi, H. El Hadri, B. Grassl, and S. Reynaud, *Environ. Pollut.* **235** (2018) 1030–1034.
6. J.P.G.L. Frias, and R. Nash, *Mar. Pollut. Bull.* **138** (2019) 145–147.
7. Z. Chen, X. Shi, J. Zhang, L. Wu, W. Wei, and B.J. Ni, *Water Res. X* **19** (2023) 100169.
8. S. Reynaud, A. Aynard, B. Grassl, and J. Gigault, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **57** (2022) 1–32.
9. K. Kik, B. Bukowska, and P. Sicińska, *Environ. Pollut.* **262** (2020).
10. C. Guerranti, T. Martellini, G. Perra, C. Scopetani, and A. Cincinelli, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **68** (2019) 75–79.
11. B. Worm, H.K. Lotze, I. Jubinville, C. Wilcox, and J. Jambeck, *Annu. Rev. Environ. Resour.* **42** (2017) 1–26.
12. P. Europe, *Plast. - Facts 2021* (2021) 34.
13. E.A. Coleman, *Plastics Additives*, Elsevier Inc., 2017, pp. 489–500.
14. D. Magri, P. Sánchez-Moreno, G. Caputo, F. Gatto, M. Veronesi, G. Bardi, T. Catelani, D. Guarnieri, A. Athanassiou, P.P. Pompa, and D. Fragouli, *ACS Nano* **12** (2018) 7690–7700.
15. P. Merdy, F. Delpy, A. Bonneau, S. Villain, L. Iordachescu, J. Vollertsen, and Y. Lucas, *Heliyon* **9** (2023) e18387.
16. V.A. Wirnkor, E.C. Ebere, and V.E. Ngozi, *Anal. Methods Environ. Chem. J.* **2** (2019) 13–30.
17. T.D. Nielsen, J. Hasselbalch, K. Holmberg, and J. Strippel, *Wiley Interdiscip. Rev. Energy Environ.* **9** (2020).
18. D.M. Mitrano, P. Wick, and B. Nowack, *Nat. Nanotechnol.* **16** (2021) 491–500.
19. European Commission, *A European Strategy for Plastics in a Circular Economy*, 2018.
20. European Commission, *COM(2021) 400 Final* (2021) 22.
21. European Parliament, *Direktiva EU 2019/904 Europskog parlamenta i Vijeća EU*, 2019.
22. T. Atugoda, M. Vithanage, H. Wijesekara, N. Bolan, A.K. Sarmah, M.S. Bank, S. You, and Y.S. Ok, *Environ. Int.* **149** (2021) 106367.

23. K. Zhang, A.H. Hamidian, A. Tubić, Y. Zhang, J.K.H. Fang, C. Wu, and P.K.S. Lam, *Environ. Pollut.* **274** (2021).
24. K. Chengappa S, A. Rao, A. K S, P.S. Jodalli, and R. Shenoy Kudpi, *F1000Research* **12** (2023) 1–14.
25. G. Saha, and N. Chandrasekaran, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **99** (2023) 104112.
26. L. Bradney, H. Wijesekara, K.N. Palansooriya, N. Obadamudalige, N.S. Bolan, Y.S. Ok, J. Rinklebe, K.H. Kim, and M.B. Kirkham, *Environ. Int.* **131** (2019) 104937.
27. A. Cincinelli, T. Martellini, C. Guerranti, C. Scopetani, D. Chelazzi, and T. Giarrizzo, *TrAC - Trends Anal. Chem.* **110** (2019) 321–326.
28. R. Geyer, J.R. Jambeck, and K.L. Law, *Sci. Adv.* **3** (2017) 25–29.
29. G.S. Zhang, and Y.F. Liu, *Sci. Total Environ.* **642** (2018) 12–20.
30. M.O. Rodrigues, N. Abrantes, F.J.M. Gonçalves, H. Nogueira, J.C. Marques, and A.M.M. Gonçalves, *Sci. Total Environ.* **633** (2018) 1549–1559.
31. C. Munari, V. Infantini, M. Scoponi, E. Rastelli, C. Corinaldesi, and M. Mistri, *Mar. Pollut. Bull.* **122** (2017) 161–165.
32. I. Peeken, S. Primpke, B. Beyer, J. Gütermann, C. Katlein, T. Krumpfen, M. Bergmann, L. Hehemann, and G. Gerdt, *Nat. Commun.* **9** (2018).
33. X. Xiong, K. Zhang, X. Chen, H. Shi, Z. Luo, and C. Wu, *Environ. Pollut.* **235** (2018) 899–906.
34. L. Ding, S. Zhang, X. Wang, X. Yang, C. Zhang, Y. Qi, and X. Guo, *Sci. Total Environ.* **720** (2020) 137525.
35. P. van den Berg, E. Huerta-Lwanga, F. Corradini, and V. Geissen, *Environ. Pollut.* **261** (2020) 114198.
36. Z. Pan, H. Guo, H. Chen, S. Wang, X. Sun, Q. Zou, Y. Zhang, H. Lin, S. Cai, and J. Huang, *Sci. Total Environ.* **650** (2019) 1913–1922.
37. M. Capriotti, P. Cocci, L. Bracchetti, E. Cottone, R. Scandiffio, G. Caprioli, G. Sagratini, G. Mosconi, P. Bovolin, and F.A. Palermo, *Chemosphere* **263** (2021).
38. P. Schwabl, S. Koppel, P. Königshofer, T. Bucsics, M. Trauner, T. Reiberger, and B. Liebmann, *Ann. Intern. Med.* **171** (2019) 453–457.
39. D. Barceló, Y. Picó, and A.H. Alfarhan, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **101** (2023).
40. C. Li, R. Busquets, and L.C. Campos, *Sci. Total Environ.* **707** (2020) 135578.
41. I.A. Ricardo, E.A. Alberto, A.H. Silva Júnior, D.L.P. Macuvelo, N. Padoin, C. Soares, H. Gracher Riella, M.C.V.M. Starling, and A.G. Trovó, *Chem. Eng. J.* **424** (2021).
42. F. Wang, M. Zhang, W. Sha, Y. Wang, H. Hao, Y. Dou, and Y. Li, *Molecules* **25** (2020).
43. X. Fan, R. Gan, J. Liu, Y. Xie, D. Xu, Y. Xiang, J. Su, Z. Teng, and J. Hou, *Sci. Total Environ.*

- 771 (2021) 145451.
44. A. Wagstaff, and B. Petrie, *Environ. Chem. Lett.* **20** (2022) 975–982.
45. A. Elizalde-Velázquez, S. Subbiah, T.A. Anderson, M.J. Green, X. Zhao, and J.E. Cañas-Carrell, *Sci. Total Environ.* **715** (2020) 136974.
46. Y. liang Liao, and J. yan Yang, *Sci. Total Environ.* **703** (2020) 134805.
47. Y. Cao, M. Zhao, X. Ma, Y. Song, S. Zuo, H. Li, and W. Deng, *Sci. Total Environ.* **788** (2021) 147620.
48. P.S. Tourinho, V. Kočí, S. Loureiro, and C.A.M. van Gestel, *Environ. Pollut.* **252** (2019) 1246–1256.
49. L. Fu, J. Li, G. Wang, Y. Luan, and W. Dai, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **217** (2021) 112207.
50. T. Wang, L. Wang, Q. Chen, N. Kalogerakis, R. Ji, and Y. Ma, *Sci. Total Environ.* **748** (2020) 142427.
51. M. Pivokonsky, L. Cermakova, K. Novotna, P. Peer, T. Cajthaml, and V. Janda, *Sci. Total Environ.* **643** (2018) 1644–1651.
52. N. Qian, X. Gao, X. Lang, H. Deng, T.M. Bratu, Q. Chen, P. Stapleton, B. Yan, and W. Min, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **121** (2024).
53. A. Altunışık, *J. Environ. Manage.* **336** (2023).
54. M.F. Diaz-Basantes, J.A. Conesa, and A. Fullana, *Sustain.* **12** (2020).
55. S. Fraissinet, G.E. De Benedetto, C. Malitesta, R. Holzinger, and D. Materić, *Commun. Earth Environ.* **5** (2024) 1–8.
56. L. Alberghini, A. Truant, S. Santonicola, G. Colavita, and V. Giaccone, *Int. J. Environ. Res. Public Health* **20** (2023).
57. E.D. Tsochatzis, H. Gika, G. Theodoridis, N. Maragou, N. Thomaidis, and M. Corredig, *Heliyon* **10** (2024) e32261.
58. European Commission, *Nanoplastics: state of knowledge and environmental and human health impacts*, 2023, pp.
59. H.A. Leslie, M.J.M. van Velzen, S.H. Brandsma, A.D. Vethaak, J.J. Garcia-Vallejo, and M.H. Lamoree, *Environ. Int.* **163** (2022) 107199.
60. A.J. Nihart, M.A. Garcia, E. El Hayek, R. Liu, M. Olewine, J.D. Kingston, E.F. Castillo, et al., *Nat. Med.* (2025).
61. L.C. Jenner, J.M. Rotchell, R.T. Bennett, M. Cowen, V. Tentzeris, and L.R. Sadofsky, *Sci. Total Environ.* **831** (2022) 154907.
62. Q. Zhao, L. Zhu, J. Weng, Z. Jin, Y. Cao, H. Jiang, and Z. Zhang, *Sci. Total Environ.* **877** (2023) 162713.
63. Y.S. Ibrahim, S. Tuan Anuar, A.A. Azmi, W.M.A. Wan Mohd Khalik, S. Lehata, S.R.

- Hamzah, D. Ismail, Z.F. Ma, A. Dzulkarnaen, Z. Zakaria, N. Mustaffa, S.E. Tuan Sharif, and Y.Y. Lee, *JGH Open* **5** (2021) 116–121.
64. S. Abbasi, and A. Turner, *J. Hazard. Mater.* **403** (2021) 123799.
65. A. Ragusa, A. Svelato, C. Santacroce, P. Catalano, V. Notarstefano, O. Carnevali, F. Papa, M.C.A. Rongioletti, F. Baiocco, S. Draghi, E. D'Amore, D. Rinaldo, M. Matta, and E. Giorgini, *Environ. Int.* **146** (2021) 106274.
66. L. Zhu, J. Zhu, R. Zuo, Q. Xu, Y. Qian, and L. AN, *Sci. Total Environ.* **856** (2023) 159060.
67. A. Ragusa, V. Notarstefano, A. Svelato, A. Belloni, G. Gioacchini, C. Blondeel, E. Zucchelli, C. De Luca, S. D'avino, A. Gulotta, O. Carnevali, and E. Giorgini, *Polymers (Basel)*. **14** (2022) 1–14.
68. J.C. Prata, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **53** (2023) 1489–1511.
69. J.M. Rotchell, C. Austin, E. Chapman, C.A. Atherall, C.R. Liddle, T.S. Dunstan, B. Blackburn, A. Mead, K. Filart, E. Beeby, K. Cunningham, J. Allen, H. Draper, and B. ann Guinn, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **274** (2024) 116208.
70. N. Zhang, Y. Bin Li, H.R. He, J.F. Zhang, and G.S. Ma, *Sci. Total Environ.* **767** (2021) 144345.
71. V. Stock, L. Böhmert, G. Coban, G. Tyra, M.L. Vollbrecht, L. Voss, M.B. Paul, A. Braeuning, and H. Sieg, *Toxicol. Vit.* **80** (2022).
72. V.K. Sharma, X. Ma, E. Lichtfouse, and D. Robert, *Environ. Chem. Lett.* **21** (2023) 1933–1936.
73. C. Loos, T. Syrovets, A. Musyanovych, V. Mailänder, K. Landfester, G. Ulrich Nienhaus, and T. Simmet, *Beilstein J. Nanotechnol.* **5** (2014) 2403–2412.
74. C. Larue, G. Sarret, H. Castillo-Michel, and A.E. Pradas del Real, *Small* **17** (2021) 1–28.
75. B. Bakan, N. Kalčec, S. Liu, K. Ilić, Y. Qi, I. Capjak, L. Božičević, N. Peranić, and I.V. Vrček, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **75** (2024) 1–14.
76. Q. Wang, Y. Wu, W. Zhang, T. Shen, H. Li, J. Wu, L. Zhang, L. Qin, R. Chen, W. Gu, Q. Sun, C. Liu, and R. Li, *Chemosphere* **308** (2022) 136591.
77. W. Kwon, D. Kim, H.Y. Kim, S.W. Jeong, S.G. Lee, H.C. Kim, Y.J. Lee, M.K. Kwon, J.S. Hwang, J.E. Han, J.K. Park, S.J. Lee, and S.K. Choi, *Sci. Total Environ.* **807** (2022) 150817.
78. B. Hou, F. Wang, T. Liu, and Z. Wang, *J. Hazard. Mater.* **405** (2021) 124028.
79. X. Xie, T. Deng, J. Duan, J. Xie, J. Yuan, and M. Chen, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **190** (2020) 110133.
80. Y. Zhang, X. Wang, Y. Zhao, J. Zhao, T. Yu, Y. Yao, R. Zhao, R. Yu, J. Liu, and J. Su, *Environ. Pollut.* **327** (2023) 121482.
81. H. Wu, T. Xu, T. Chen, J. Liu, and S. Xu, *Sci. Total Environ.* **838** (2022) 155825.

82. D. Yang, J. Zhu, X. Zhou, D. Pan, S. Nan, R. Yin, Q. Lei, N. Ma, H. Zhu, J. Chen, L. Han, M. Ding, and Y. Ding, *Environ. Int.* **166** (2022) 107362.
83. T. Huang, W. Zhang, T. Lin, S. Liu, Z. Sun, F. Liu, Y. Yuan, X. Xiang, H. Kuang, B. Yang, and D. Zhang, *Food Chem. Toxicol.* **160** (2022) 112803.
84. A.C. Gore, M.A. La Merrill, H. Patisaul, and R.M. Sargis, *Endocrine Disrupting Chemicals: Threats to Human Health.*, 2024, pp. 112.
85. S. Macedo, E. Teixeira, T.B. Gaspar, P. Boaventura, M.A. Soares, L. Miranda-Alves, and P. Soares, *Environ. Res.* **218** (2023) 114869.
86. Y. Combarous, *Comptes Rendus - Biol.* **340** (2017) 406–409.
87. C. Ahn, and E.B. Jeung, *Int. J. Mol. Sci.* **24** (2023) 1–18.
88. A.Z. Rutkowska, and E. Diamanti-Kandarakis, *Fertil. Steril.* **106** (2016) 948–958.
89. P.M. Lind, and L. Lind, *Diabetologia* **61** (2018) 1495–1502.
90. D. Rachoń, *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **16** (2015) 359–364.
91. P.D. Darbre, *Curr. Opin. Endocr. Metab. Res.* **7** (2019) 26–33.
92. M. Veurink, M. Koster, and L.T.W. De Jong-Van Den Berg, *Pharm. World Sci.* **27** (2005) 139–143.
93. P. Zamora-León, *Int. J. Environ. Res. Public Health* **18** (2021).
94. J.O. Tijani, O.O. Fatoba, O.O. Babajide, and L.F. Petrik, *Environ. Chem. Lett.* **14** (2016) 27–49.
95. E.R. Kabir, M.S. Rahman, and I. Rahman, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **40** (2015) 241–258.
96. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A52019IP0441> (accessed.
97. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1553617067256&uri=CELEX:52018DC0734> (accessed.
98. European Commission, *Off. J. Eur. Union* (2006) 396–849.
99. M. V. Maffini, and L.N. Vandenberg, *Front. Toxicol.* **4** (2022) 1–8.
100. M. Hecker, and H. Hollert, *Environ. Sci. Eur.* **23** (2011) 1–14.
101. OECD, *OECD Series on Testing and Assessment*, 2018, pp.
102. OECD TG 441, *OECD Guidel. Test. Chem. Sect. 4* (2009) 1–20.
103. OECD, (2007) 440.
104. E.N. Hilz, and A.C. Gore, *Policy Insights from Behav. Brain Sci.* **10** (2023) 142–150.
105. E. Diamanti-Kandarakis, J.P. Bourguignon, L.C. Giudice, R. Hauser, G.S. Prins, A.M. Soto, R.T. Zoeller, and A.C. Gore, *Endocr. Rev.* **30** (2009) 293–342.
106. N. Zwart, D. Andringa, W.J. de Leeuw, H. Kojima, M. Iida, C.J. Houtman, J. de Boer, J. Kool, M.H. Lamoree, and T. Hamers, *Toxicol. Vitro.* **45** (2017) 1–9.
107. OECD, *Test No. 455 Performance-Based Test Guidel. Stably Transfected Trans. Vitro. Assays to*

- Detect Estrogen Recept. Agon. Antagon.* (2015).
108. OECD, *Test Guideline No. 458 Stably Transfected Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist and Antagonist Activity of Chemicals*, 2023, pp. 1–84.
109. D. Guideline, P. Of, T.H.E. Test, and I. Considerations, **2006** (2006) 1–11.
110. S.J. More, A. Hardy, V. Bampidis, D. Benford, S. Hougaard Bennekou, C. Bragard, J. Boesten, et al., *EFSA J.* **17** (2019).
111. OECD, *Ser. Test. Assess. No. 296* (2018) 119.
112. C. Ritz, J.C. Streibig, and A. Kniss, *Pest Manag. Sci.* **77** (2021) 3890–3899.
113. S.E. Mancebo, J.Y. Hu, and S.Q. Wang, *Dermatol. Clin.* **32** (2014) 427–438.
114. ECHA, <https://echa.europa.eu/de/substance-information/-/substanceinfo/100.001.897> (accessed).
115. M.M.P. Tsui, H.W. Leung, T.C. Wai, N. Yamashita, S. Taniyasu, W. Liu, P.K.S. Lam, and M.B. Murphy, *Water Res.* **67** (2014) 55–65.
116. M.E. Balmer, H.R. Buser, M.D. Müller, and T. Poiger, *Environ. Sci. Technol.* **39** (2005) 953–962.
117. H. Gonzalez, A. Farbro, O. Larkö, and A.M. Wennberg, *Br. J. Dermatol.* **154** (2006) 337–340.
118. J.C. DiNardo, and C.A. Downs, *J. Cosmet. Dermatol.* **17** (2018) 15–19.
119. S. Kim, and K. Choi, *Environ. Int.* **70** (2014) 143–157.
120. R. Danovaro, L. Bongiorno, C. Corinaldesi, D. Giovannelli, E. Damiani, P. Astolfi, L. Greci, and A. Pusceddu, *Environ. Health Perspect.* **116** (2008) 441–447.
121. C.A. Downs, E. Kramarsky-Winter, R. Segal, J. Fauth, S. Knutson, O. Bronstein, F.R. Ciner, R. Jeger, Y. Lichtenfeld, C.M. Woodley, P. Pennington, K. Cadenas, A. Kushmaro, and Y. Loya, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **70** (2016) 265–288.
122. S.L. Schneider, and H.W. Lim, *J. Am. Acad. Dermatol.* **80** (2019) 266–271.
123. U.S. Food and Drug Administration, *Over-the-Counter Monograph M020: Sunscreen Drug Products for Over-the-Counter Human Use*, 2021.
124. SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), *Opinion on Benzophenone-3 (CAS No 131-57-7, EC No 205-031-5), preliminary version of 15 December 2020, final version of 30-31 March 2021, SCCS/1625/20*, 2021, pp.
125. European Commission, **1176** (2022) L 183/51-L 183/53.
126. ECHA, <https://echa.europa.eu/hr/substance-information/-/substanceinfo/100.004.575> (accessed).
127. D. Gomez Cortes, L., Porcel Rodriguez, E., Marinov, and T. Sanseverino, I., Lettieri, *Selection of substances for the 5th Watch List under the Water Framework Directive*, 2025.

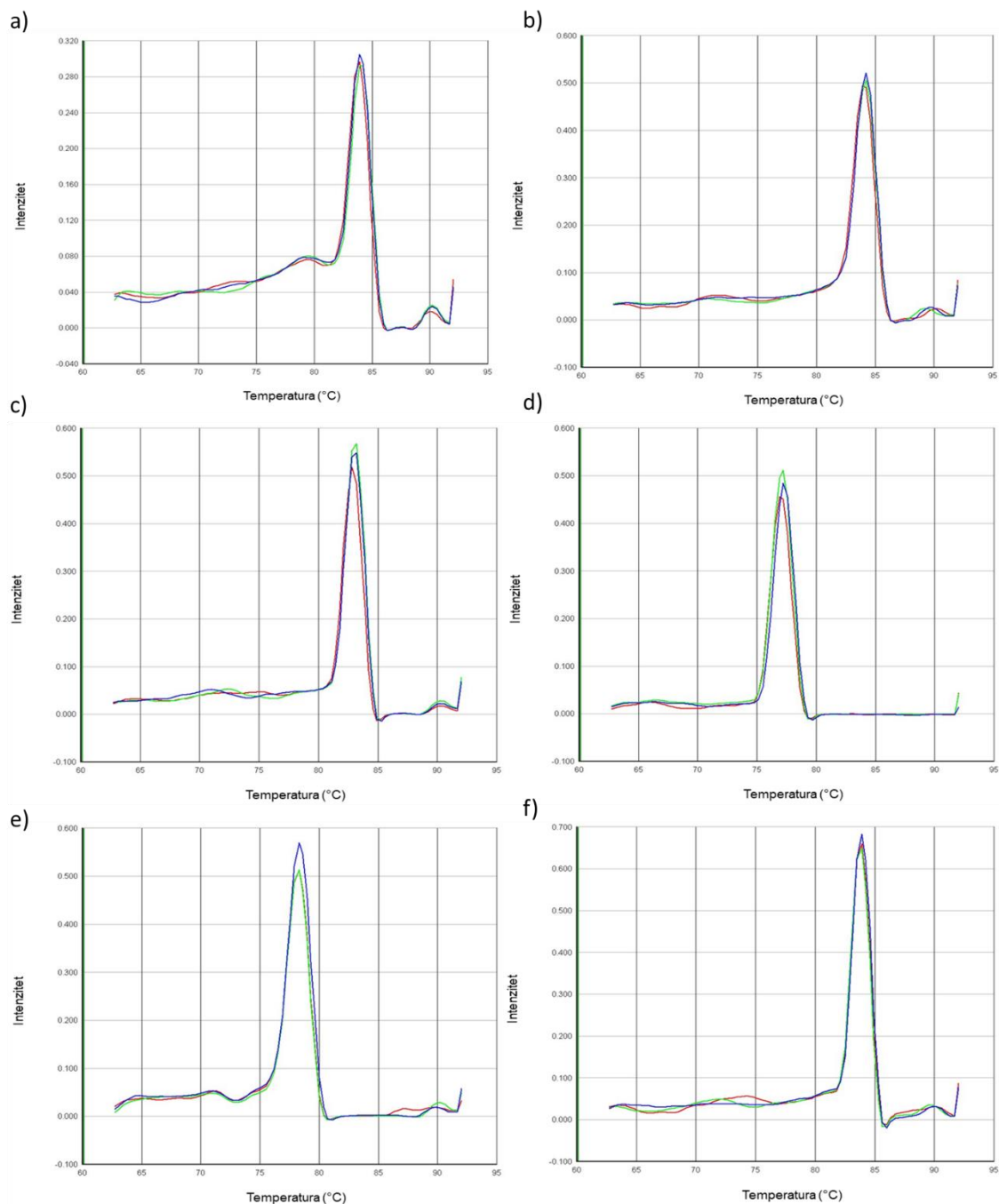
128. C.P. da Silva, E.S. Emídio, and M.R.R. de Marchi, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22** (2015) 19706–19715.
129. H. Wu, L.H. Wu, F. Wang, C.J. Gao, D. Chen, and Y. Guo, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **26** (2019) 5873–5884.
130. S.C. Cunha, L. Trabalón, S. Jacobs, M. Castro, M. Fernandez-Tejedor, K. Granby, W. Verbeke, C. Kwadijk, F. Ferrari, J. Robbens, I. Sioen, E. Pocurull, A. Marques, J.O. Fernandes, and J.L. Domingo, *Environ. Res.* **161** (2018) 399–408.
131. K.H. Langford, M.J. Reid, E. Fjeld, S. Øxnevad, and K. V. Thomas, *Environ. Int.* **80** (2015) 1–7.
132. A.M. Calafat, L.Y. Wong, X. Ye, J.A. Reidy, and L.L. Needham, *Environ. Health Perspect.* **116** (2008) 893–897.
133. M.K. Matta, R. Zusterzeel, N.R. Pilli, V. Patel, D.A. Volpe, J. Florian, L. Oh, et al., *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **321** (2019) 2082–2091.
134. L.M. Iribarne-Durán, L. Serrano, F.M.P. A, M.P.-C. B, J.A.H. B, F.V.-S. A, M.F.F. D, C.F. C, F.A.-C. D, and N. Olea, *Sci. Total Environ.* **830** (2022) 154737.
135. M. Krause, H. Frederiksen, K. Sundberg, F.S. Jørgensen, L.N. Jensen, P. Nørgaard, C. Jørgensen, P. Ertberg, A. Juul, K.T. Drzewiecki, N.E. Skakkebaek, and A.M. Andersson, *Environ. Int.* **110** (2018) 51–60.
136. L. Barr, M. Alamer, and P.D. Darbre, *J. Appl. Toxicol.* **38** (2018) 1112–1120.
137. N.R. Janjua, Æ.B. Mogensen, Æ.A. Andersson, H. Petersen, Æ.N.E. Skakkebaek, and H.C.W. Æ, *Europe* (2004) 57–61.
138. N.R. Janjua, B. Kongshoj, J.H. Petersen, and H.C. Wulf, *Br. J. Dermatol.* **156** (2007) 1080–1082.
139. M. Ghazipura, R. McGowan, A. Arslan, and T. Hossain, *Reprod. Toxicol.* **73** (2017) 175–183.
140. M. Schlumpf, B. Cotton, M. Conscience, V. Haller, B. Steinmann, and W. Lichtensteiger, *Environ. Health Perspect.* **109** (2001) 239–244.
141. J.E. French, *NTP Technical Report*, 1992.
142. M. Coronado, H. De Haro, X. Deng, M.A. Rempel, R. Lavado, and D. Schlenk, *Aquat. Toxicol.* **90** (2008) 182–187.
143. K. Kim, Sujin; Jung, Dawoon; Kho, Younglim; Choi, *Aquat. Toxicol.* **155** (2014) 244–252.
144. M. Alamer, and P.D. Darbre, *J. Appl. Toxicol.* **38** (2018) 148–159.
145. Y. Nakagawa, and T. Suzuki, *Chem. Biol. Interact.* **139** (2002) 115–128.
146. R.H.M.M. Schreurs, E. Sonneveld, J.H.J. Jansen, W. Seinen, and B. van der Burg, *Toxicol. Sci.* **83** (2005) 264–272.
147. R. Ma, B. Cotton, W. Lichtensteiger, and M. Schlumpf, *Toxicol. Sci.* **74** (2003) 43–50.

148. P.Y. Kunz, and K. Fent, *Aquat. Toxicol.* **79** (2006) 305–324.
149. J.M. Molina-Molina, A. Escande, A. Pillon, E. Gomez, F. Pakdel, V. Cavaillès, N. Olea, S. Aït-Aïssa, and P. Balaguer, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **232** (2008) 384–395.
150. M.G. Soni, S.L. Taylor, N.A. Greenberg, and G.A. Burdock, *Food Chem. Toxicol.* **40** (2002) 1335–1373.
151. F.A. Andersen, *Int. J. Toxicol.* **27** (2008) 1–82.
152. SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety), *Opinion on methylparaben (CAS No.99-76-3, EC No. 202-785-7)*, 2024, pp.
153. ECHA, <https://echa.europa.eu/hr/substance-information/-/substanceinfo/100.002.532> (accessed).
154. P. Canosa, D. Pérez-Palacios, A. Garrido-López, M.T. Tena, I. Rodríguez, E. Rubí, and R. Cela, *J. Chromatogr. A* **1161** (2007) 105–112.
155. L. Núñez, J.L. Tadeo, A.I. García-Valcárcel, and E. Turiel, *J. Chromatogr. A* **1214** (2008) 178–182.
156. B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, and A.J. Guwy, *Water Res.* **42** (2008) 3498–3518.
157. J.M. Braun, A.C. Just, P.L. Williams, K.W. Smith, A.M. Calafat, and R. Hauser, *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **24** (2014) 459–466.
158. L. Barr, G. Metaxas, C.A.J. Harbach, L.A. Savoy, and P.D. Darbre, *J. Appl. Toxicol.* **32** (2012) 219–232.
159. T.M. Sandanger, S. Huber, M.K. Moe, T. Braathen, H. Leknes, and E. Lund, *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **21** (2011) 595–600.
160. A. Parla, E. Zormpa, N. Paloumpis, A. Kabir, K.G. Furton, Ž. Roje, V. Samanidou, I.V. Vrček, and I. Panderi, *Molecules* **26** (2021).
161. F. Vela-Soria, I. Rodríguez, O. Ballesteros, A. Zafra-Gómez, L. Ballesteros, R. Cela, and A. Navalón, *J. Chromatogr. A* **1371** (2014) 39–47.
162. L. Sun, T. Yu, J. Guo, Z. Zhang, Y. Hu, X. Xiao, Y. Sun, H. Xiao, J. Li, D. Zhu, L. Sai, and J. Li, *Sci. Rep.* **6** (2016) 1–9.
163. C. Lemini, R. Jaimez, M.E. Ávila, Y. Franco, F. Larrea, and A.E. Lemus, *Toxicol. Ind. Health* **19** (2003) 69–79.
164. J. Liang, Q.S. Liu, Z. Ren, K. Min, X. Yang, F. Hao, Q. Zhang, Q. Liu, Q. Zhou, and G. Jiang, *Sci. Total Environ.* **869** (2023) 161793.
165. T. Okubo, Y. Yokoyama, K. Kano, and I. Kano, *Food Chem. Toxicol.* **39** (2001) 1225–1232.
166. J. Chen, K.C. Ahn, N.A. Gee, S.J. Gee, B.D. Hammock, and B.L. Lasley, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **221** (2007) 278–284.
167. A. Robles-Martín, R. Amigot-Sánchez, L. Fernandez-Lopez, J.L. Gonzalez-Alfonso, S. Roda,

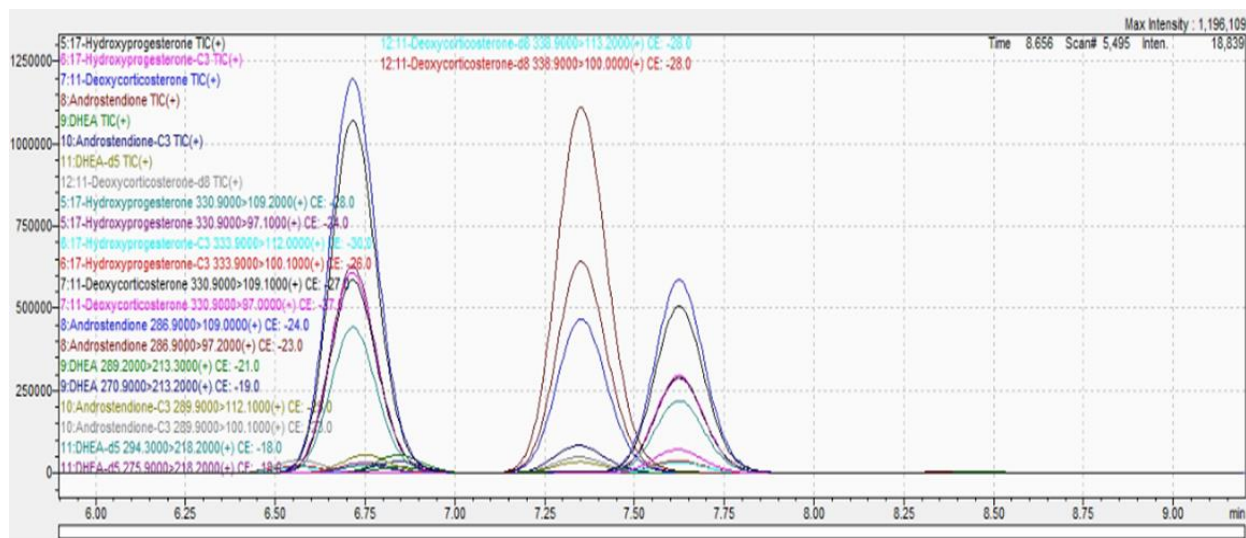
- V. Alcolea-Rodriguez, D. Heras-Márquez, et al., *Nat. Catal.* **6** (2023) 1174–1185.
168. J. Hildebrandt, and A.F. Thünemann, *Macromol. Rapid Commun.* **44** (2023) 1–15.
169. Ž. Roje, K. Ilić, E. Galić, I. Pavičić, P. Turčić, Z. Stanec, and I.V. Vrček, *Arh. Hig. Rada Toksikol.* **70** (2019) 310–314.
170. L. Božičević, K. Altmann, J. Hildebrandt, X. Knigge, V. Vrček, N. Peranić, N. Kalčec, and I. Vinković Vrček, *Environ. Sci. Nano* **11** (2024) 2112–2126.
171. G. Malich, B. Markovic, and C. Winder, *Toxicology* **124** (1997) 179–192.
172. S.Y. Skolness, E.J. Durhan, N. Garcia-Reyero, K.M. Jensen, M.D. Kahl, E.A. Makynen, D. Martinovic-Weigelt, E. Perkins, D.L. Villeneuve, and G.T. Ankley, *Aquat. Toxicol.* **103** (2011) 170–178.
173. L. Hedin, and S. Rosberg, *Mol. Cell. Endocrinol.* **33** (1983) 69–80.
174. K. Hilscherova, P.D. Jones, T. Gracia, J.L. Newsted, X. Zhang, J.T. Sanderson, R.M.K. Yu, R.S.S. Wu, and J.P. Giesy, *Toxicol. Sci.* **81** (2004) 78–89.
175. K.J. Livak, and T.D. Schmittgen, *Methods* **25** (2001) 402–408.
176. D.J. Pochapski, C. Carvalho Dos Santos, G.W. Leite, S.H. Pulcinelli, and C.V. Santilli, *Langmuir* **37** (2021) 13379–13389.
177. D.D. Jurašin, M. Ćurlin, I. Capjak, T. Crnković, M. Lovrić, M. Babič, D. Horák, I.V. Vrček, and S. Gajović, *Beilstein J. Nanotechnol.* **7** (2016) 246–262.
178. Z. Jabor, and S.C. Sutton, *Toxics* **11** (2023).
179. R. Barbir, B. Pem, N. Kalcec, S. Kastner, K. Podlesnaia, A. Csaki, W. Fritzsche, and I. Vinkovic Vrcek, *Langmuir* **37** (2021) 1991–2000.
180. R. Guadagnini, B. Halamoda Kenzaoui, L. Walker, G. Pojana, Z. Magdolenova, D. Bilanicova, M. Saunders, L. Juillerat-Jeanneret, A. Marcomini, A. Huk, M. Dusinska, L.M. Fjellsbo, F. Marano, and S. Boland, *Nanotoxicology* **9** (2015) 13–24.
181. N. El Yamani, E. Rundén-Pran, J. Varet, M. Beus, M. Dusinska, V. Fessard, E. Moschini, T. Serchi, M.R. Cimpan, I. Lynch, and I. Vinković Vrček, *Nano Today* **55** (2024).
182. R.D. Michelle Hesler, Leonie Aengenheister, Bernhard Ellinger, H. von B. Susanne Straskraba, Carsten Jost, Sylvia Wagner, Florian Meier, and Y.K. Claudia Büchel, Peter Wick, Tina Buerki-Thurnherr, *Toxicol. Vitro.* **61** (2019).
183. J. van Boxel, R.R.J. Khargi, S.M. Nijmeijer, M.T. Heinzelmann, D.D.C. Pereira, M.H. Lamoree, and M.B.M. van Duursen, *Toxicol. Vitro.* **101** (2024) 105938.
184. Y.Y. Lu, H. Li, H. Ren, X. Zhang, F. Huang, D. Zhang, Q. Huang, and X. Zhang, *J. Hazard. Mater.* **421** (2022) 126770.
185. S. Hwangbo, I.Y. Kim, K. Ko, K. Park, J. Hong, G. Kang, J.S. Wi, J. Kim, and T.G. Lee, *Environ. Pollut.* **362** (2024) 125009.

186. Y. Ruan, Z. Zhong, X. Liu, Z. Li, J. Li, L. Sun, and H. Sen, *PLoS One* **18** (2023) 1–17.
187. S.J.K. Chi Rim Sung, Byeong Jun Kim, Chan Ju Park, In Ah Oh, Yu Jin Lee, Yeo Rim Park, *J. Toxicol. Enviromental Heal. Part A* **87** (2024).
188. P.Y. Kunz, H.F. Galicia, and K. Fent, *Toxicol. Sci.* **90** (2006) 349–361.
189. J. Payne, C. Jones, S. Lakhani, and A. Kortenkamp, *Sci. Total Environ.* **248** (2000) 51–62.

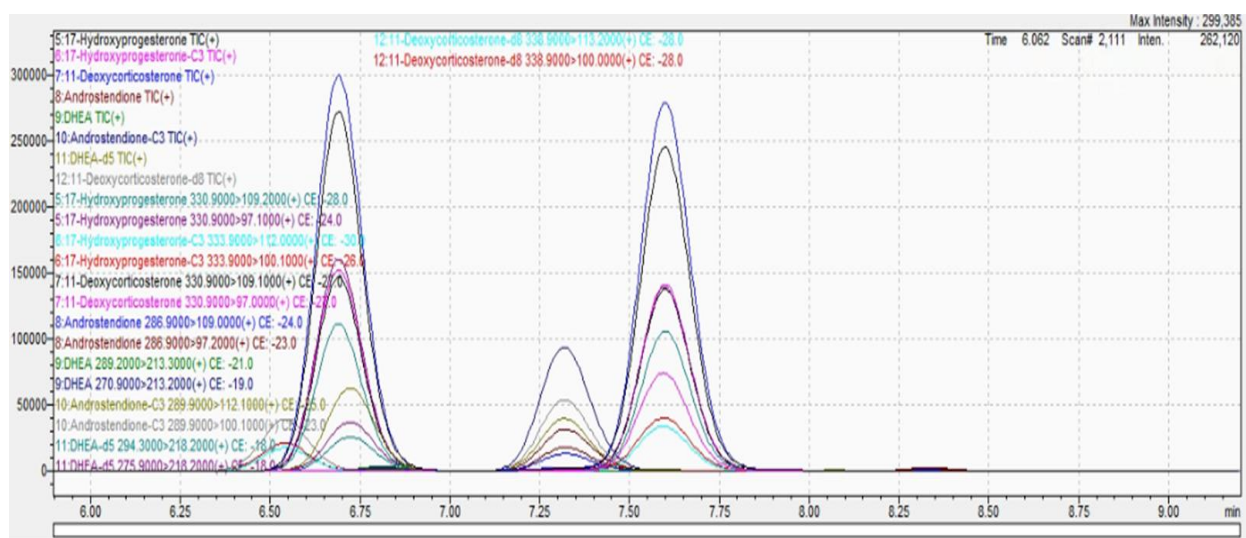
§ 8. DODATAK



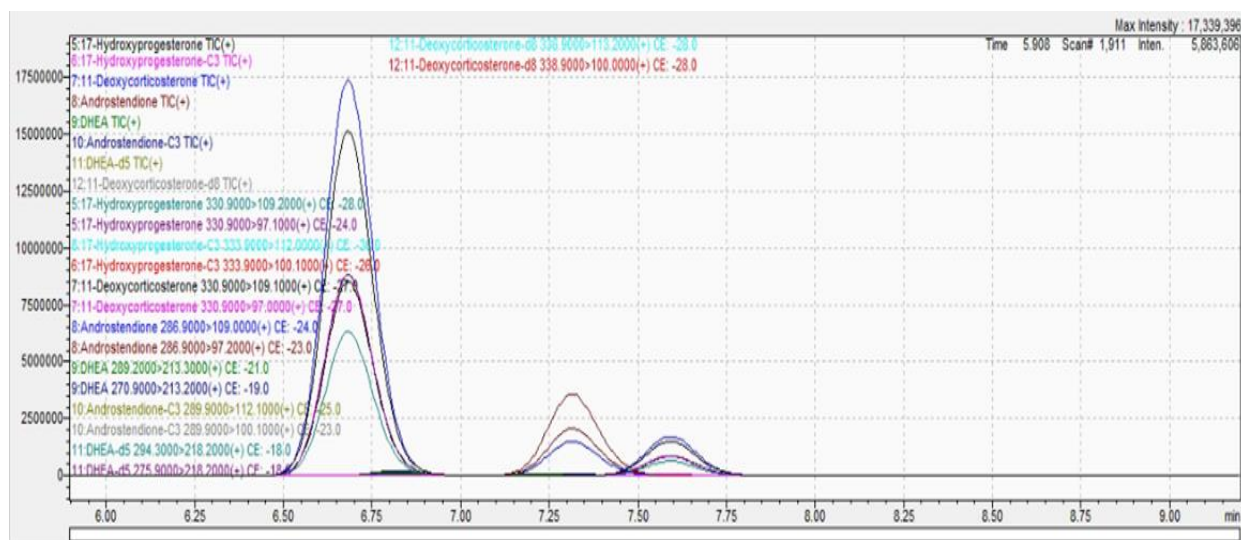
Slika 48. Disocijacijske krivulje početnica: a) β -aktin, b) CYP11, c) CYP17, d) CYP19, e) 3β -HSD, f) 17β -HSD.



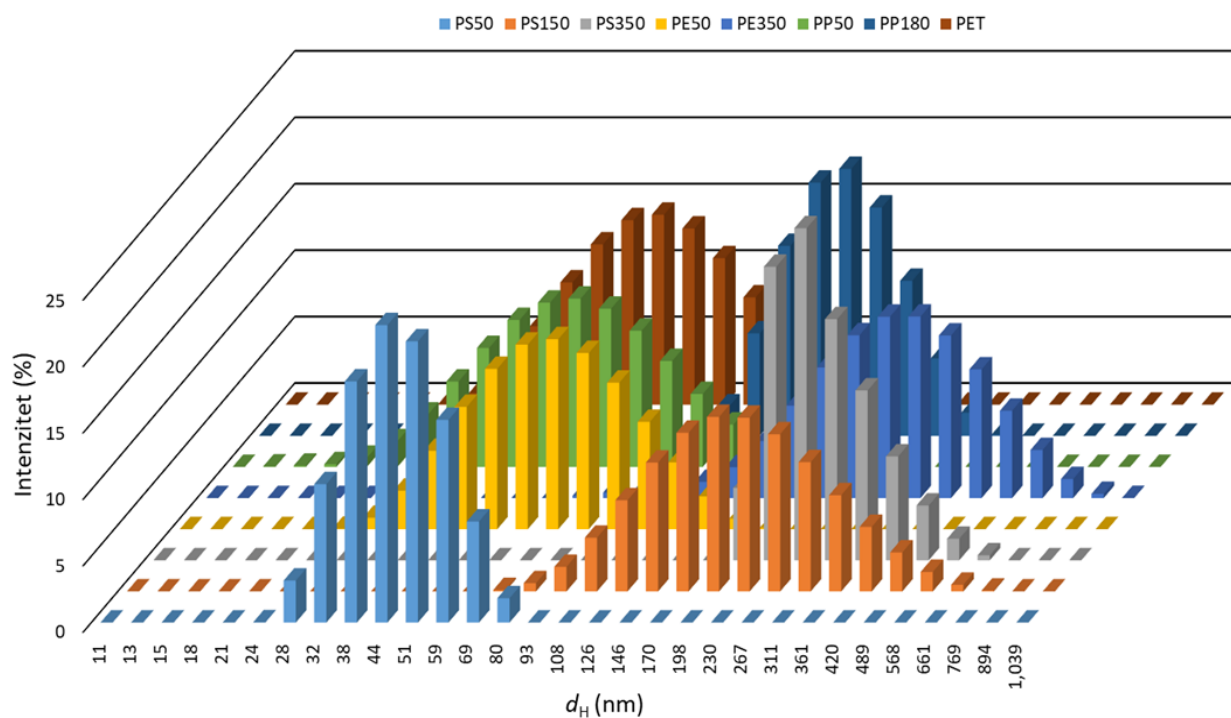
Slika 49. Kromatogrami steroidnih hormona netretiranih stanica određeni LC-MS/MS metodom.



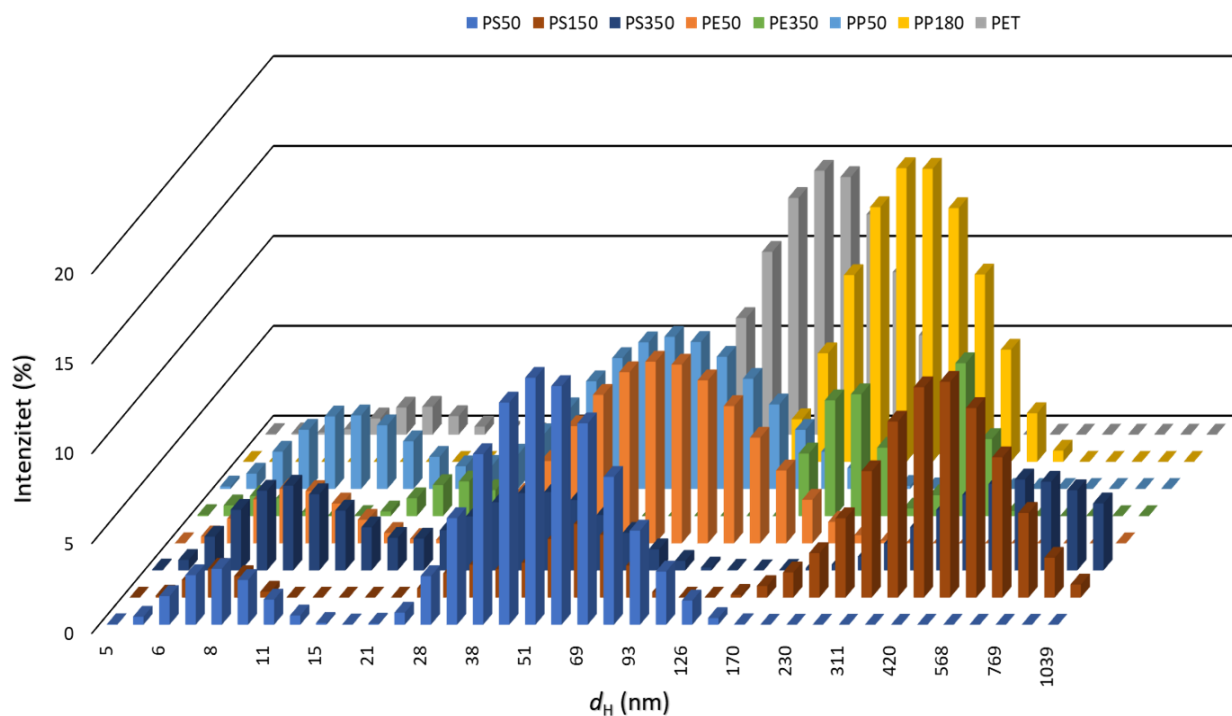
Slika 50. Kromatogrami steroidnih hormona nakon tretmana stanica negativnom kontrolom (prokloraz) određeni LC-MS/MS metodom.



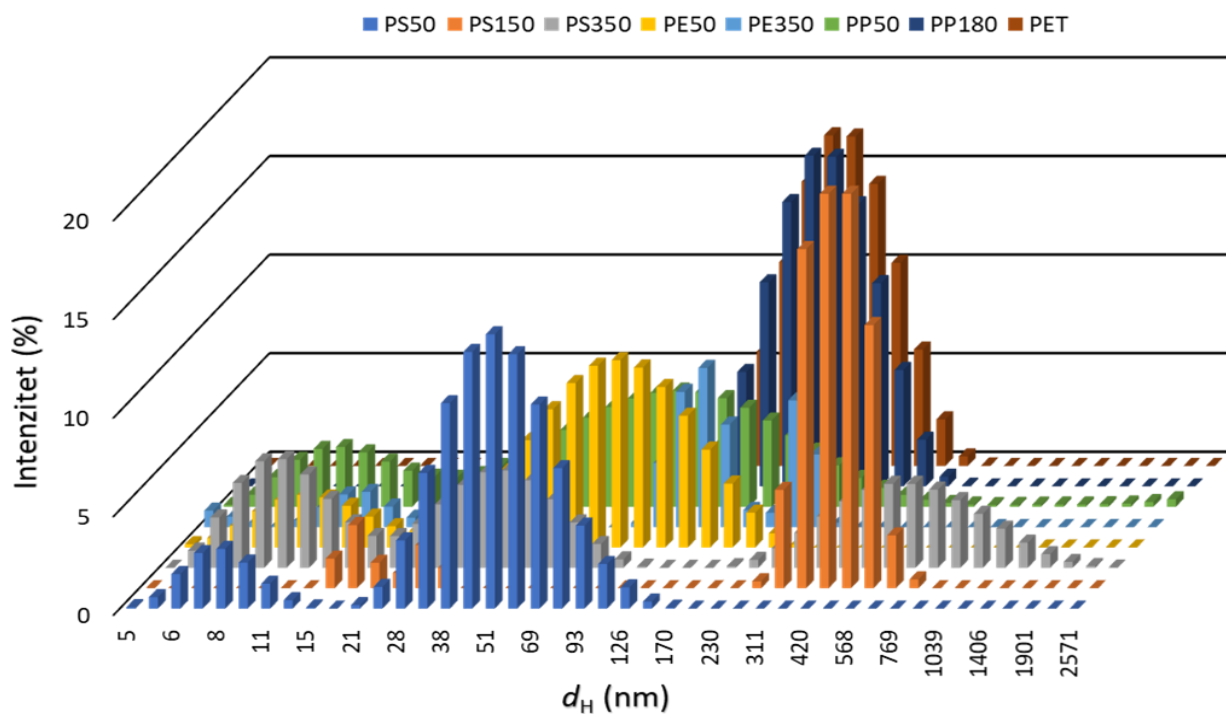
Slika 51. Kromatogrami steroidnih hormona nakon tretmana stanica pozitivnom kontrolom (forskolin) određeni LC-MS/MS metodom.



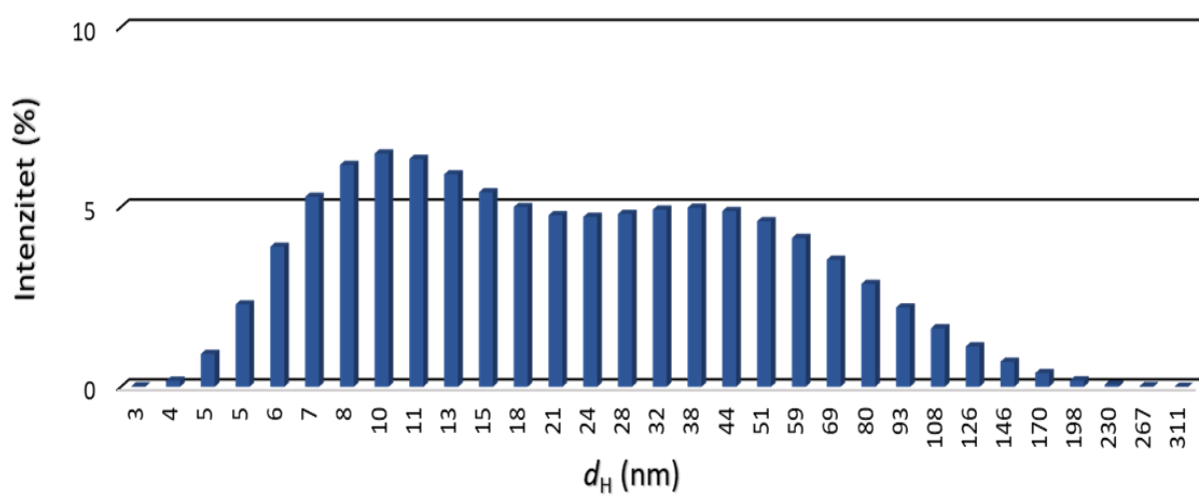
Slika 52. Raspodjela hidrodinamičkog promjera prema intenzitetu za sve PNP određena u ultračistoj vodi.



Slika 53. Raspodjela hidrodinamičkog promjera prema intenzitetu za sve PNP određena u staničnom mediju odmah nakon razrijeđivanja odgovarajućih suspenzija.



Slika 54. Raspodjela hidrodinamičkog promjera prema intenzitetu za sve PNP određena u staničnom mediju nakon 24 sata od razrijeđivanja odgovarajućih suspenzija.



Slika 55. Raspodjela hidrodinamičkog promjera prema intenzitetu za stanični medij.

Tablica 4. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PSNP 50 nm i oksibenzona na AR-EcoScreen GR KO M1 stanicama.

PS50	Oksibenzon	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0	-	-
10	0	7,36	-	-
5	0	1,14	-	-
1	0	-3,35	-	-
0,1	0	-2,45	-	-
0	100	40,16	-	-
0	10	32,07	-	-
0	1	25,23	-	-
0	0,1	20,17	-	-
10	100	44,13	-3,38	Antagonizam
10	10	24,35	-15,08	Antagonizam
10	1	23,95	-8,63	Antagonizam
10	0,1	22,89	-4,64	Antagonizam
5	100	40,38	-0,91	Antagonizam
5	10	27,27	-5,93	Antagonizam
5	1	20,78	-5,58	Antagonizam
5	0,1	19,22	-2,09	Antagonizam
1	100	40,45	3,65	Sinergizam
1	10	31,11	2,39	Sinergizam
1	1	32,67	10,79	Sinergizam
1	0,1	27,16	10,34	Sinergizam
0,1	100	40,72	3,02	Sinergizam
0,1	10	25,85	-3,77	Antagonizam
0,1	1	20,35	-2,43	Antagonizam
0,1	0,1	22,94	5,22	Sinergizam

Tablica 5. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PSNP 50 nm i metilparabena na AR-EcoScreen GR KO M1 stanicama.

PS50	Metilparaben	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0	-	-
10	0	7,36	-	-
5	0	1,14	-	-
1	0	-3,35	-	-
0,1	0	-2,45	-	-
0	100	38,23	-	-
0	10	28,61	-	-
0	1	22,13	-	-
0	0,1	15,21	-	-
10	100	32,34	-13,25	Antagonizam
10	10	6,54	-29,42	Antagonizam
10	1	9,88	-19,60	Antagonizam
10	0,1	13,29	-9,28	Antagonizam
5	100	35,60	-3,76	Antagonizam
5	10	9,74	-20,00	Antagonizam
5	1	22,99	-0,28	Antagonizam
5	0,1	24,85	8,49	Sinergizam
1	100	37,46	2,58	Sinergizam
1	10	26,82	1,57	Sinergizam
1	1	23,11	4,34	Sinergizam
1	0,1	18,90	7,04	Sinergizam
0,1	100	35,45	-0,33	Antagonizam
0,1	10	17,31	-8,85	Antagonizam
0,1	1	30,56	10,89	Sinergizam
0,1	0,1	30,61	17,85	Sinergizam

Tablica 6. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PENP 50 nm i oksibenzona na AR-EcoScreen GR KO M1 stanicama.

PE50	Oksibenzon	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0	-	-
10	0	19,04	-	-
5	0	-2,37	-	-
1	0	8,21	-	-
0,1	0	-1,03	-	-
0	100	40,16	-	-
0	10	32,07	-	-
0	1	25,23	-	-
0	0,1	20,17	-	-
10	100	19,54	-39,65	Antagonizam
10	10	10,28	-40,82	Antagonizam
10	1	11,83	-32,43	Antagonizam
10	0,1	12,39	-26,82	Antagonizam
5	100	38,17	0,38	Sinergizam
5	10	19,33	-10,37	Antagonizam
5	1	17,62	-5,24	Antagonizam
5	0,1	15,44	-2,36	Antagonizam
1	100	39,47	-8,90	Antagonizam
1	10	26,13	-14,15	Antagonizam
1	1	24,02	-9,42	Antagonizam
1	0,1	26,88	-1,50	Antagonizam
0,1	100	42,61	3,49	Sinergizam
0,1	10	24,82	-6,21	Antagonizam
0,1	1	27,52	3,33	Sinergizam
0,1	0,1	26,63	7,49	Sinergizam

Tablica 7. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PENP 50 nm i metilparabena na AR-EcoScreen GR KO M1 stanicama.

PE50	Metilparaben	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0	-	-
10	0	19,04	-	-
5	0	-2,37	-	-
1	0	8,21	-	-
0,1	0	-1,03	-	-
0	100	38,23	-	-
0	10	28,61	-	-
0	1	22,13	-	-
0	0,1	15,21	-	-
10	100	15,31	-41,96	Antagonizam
10	10	-10,89	-58,54	Antagonizam
10	1	-8,05	-49,22	Antagonizam
10	0,1	-2,94	-37,20	Antagonizam
5	100	29,56	-6,30	Antagonizam
5	10	14,79	-11,45	Antagonizam
5	1	-9,43	-29,19	Antagonizam
5	0,1	-9,57	-22,41	Antagonizam
1	100	36,70	-9,74	Antagonizam
1	10	20,97	-15,85	Antagonizam
1	1	20,66	-9,68	Antagonizam
1	0,1	2,68	-20,74	Antagonizam
0,1	100	35,64	-1,56	Antagonizam
0,1	10	37,53	9,95	Sinergizam
0,1	1	22,43	1,34	Sinergizam
0,1	0,1	11,23	-2,95	Antagonizam

Tablica 8. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PPNP 50 nm i oksibenzona na AR-EcoScreen GR KO M1 stanicama.

PP50	Oksibenzon	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0	-	-
10	0	43,49	-	-
5	0	22,15	-	-
1	0	3,74	-	-
0,1	0	-3,04	-	-
0	100	40,16	-	-
0	10	32,07	-	-
0	1	25,23	-	-
0	0,1	20,17	-	-
10	100	65,08	-18,56	Antagonizam
10	10	52,52	-23,03	Antagonizam
10	1	49,75	-18,96	Antagonizam
10	0,1	49,23	-14,43	Antagonizam
5	100	54,42	-7,88	Antagonizam
5	10	32,20	-22,02	Antagonizam
5	1	33,91	-13,46	Antagonizam
5	0,1	35,39	-6,93	Antagonizam
1	100	33,44	-10,46	Antagonizam
1	10	13,25	-22,55	Antagonizam
1	1	16,21	-12,76	Antagonizam
1	0,1	14,73	-9,19	Antagonizam
0,1	100	36,58	-0,53	Antagonizam
0,1	10	16,44	-12,58	Antagonizam
0,1	1	18,14	-4,05	Antagonizam
0,1	0,1	18,52	1,39	Sinergizam

Tablica 9. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PPNP 50 nm i metilparabena na AR-EcoScreen GR KO M1 stanicama.

PP50	Metilparaben	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0	-	-
10	0	43,49	-	-
5	0	22,15	-	-
1	0	3,74	-	-
0,1	0	-3,04	-	-
0	100	38,23	-	-
0	10	28,61	-	-
0	1	22,13	-	-
0	0,1	15,21	-	-
10	100	64,52	-17,19	Antagonizam
10	10	47,94	-24,15	Antagonizam
10	1	52,65	-12,97	Antagonizam
10	0,1	44,45	-14,25	Antagonizam
5	100	47,52	-12,86	Antagonizam
5	10	29,18	-21,57	Antagonizam
5	1	24,17	-20,11	Antagonizam
5	0,1	19,76	-17,60	Antagonizam
1	100	37,98	-3,99	Antagonizam
1	10	13,05	-19,30	Antagonizam
1	1	41,62	15,75	Sinergizam
1	0,1	15,37	-3,58	Antagonizam
0,1	100	31,73	-3,46	Antagonizam
0,1	10	13,53	-12,03	Antagonizam
0,1	1	7,94	-11,14	Antagonizam
0,1	0,1	-0,59	-12,76	Antagonizam

Tablica 10. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PET i oksibenzona na AR-EcoScreen GR KO M1 stanicama.

PET	Oksibenzon	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0	-	-
10	0	6,45	-	-
5	0	10,67	-	-
1	0	3,70	-	-
0,1	0	0,09	-	-
0	100	40,16	-	-
0	10	32,07	-	-
0	1	25,23	-	-
0	0,1	20,17	-	-
10	100	44,57	-2,04	Antagonizam
10	10	28,02	-10,49	Antagonizam
10	1	31,27	-0,41	Antagonizam
10	0,1	31,39	4,77	Sinergizam
5	100	46,53	-4,29	Antagonizam
5	10	33,80	-8,93	Antagonizam
5	1	28,95	-6,95	Antagonizam
5	0,1	30,25	-0,59	Antagonizam
1	100	42,66	-1,19	Antagonizam
1	10	25,80	-9,96	Antagonizam
1	1	30,80	1,87	Sinergizam
1	0,1	40,90	17,03	Sinergizam
0,1	100	44,30	4,05	Sinergizam
0,1	10	35,63	3,47	Sinergizam
0,1	1	31,23	5,91	Sinergizam
0,1	0,1	31,11	10,85	Sinergizam

Tablica 11. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PET i metilparabena na AR-EcoScreen GR KO M1 stanicama.

PET	Metilparaben	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0	-	-
10	0	6,45	-	-
5	0	10,67	-	-
1	0	3,70	-	-
0,1	0	0,09	-	-
0	100	38,23	-	-
0	10	28,61	-	-
0	1	22,13	-	-
0	0,1	15,21	-	-
10	100	41,80	-2,88	Antagonizam
10	10	19,59	-15,47	Antagonizam
10	1	13,13	-15,45	Antagonizam
10	0,1	14,35	-7,31	Antagonizam
5	100	40,10	-8,80	Antagonizam
5	10	17,90	-21,37	Antagonizam
5	1	8,87	-23,93	Antagonizam
5	0,1	10,84	-15,04	Antagonizam
1	100	36,44	-5,49	Antagonizam
1	10	28,51	-3,79	Antagonizam
1	1	19,09	-6,74	Antagonizam
1	0,1	25,67	6,76	Sinergizam
0,1	100	33,67	-4,65	Antagonizam
0,1	10	18,51	-10,19	Antagonizam
0,1	1	12,28	-9,95	Antagonizam
0,1	0,1	9,25	-6,06	Antagonizam

Tablica 12. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PSNP 150 nm i oksibenzona na AR-EcoScreen GR KO M1 stanicama.

PS150	Oksibenzon	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0	-	-
10	0	-4,12	-	-
5	0	4,87	-	-
1	0	1,87	-	-
0,1	0	-8,38	-	-
0	100	40,16	-	-
0	10	32,07	-	-
0	1	25,23	-	-
0	0,1	20,17	-	-
10	100	38,54	2,50	Sinergizam
10	10	32,86	4,91	Sinergizam
10	1	27,80	6,69	Sinergizam
10	0,1	30,63	14,58	Sinergizam
5	100	39,65	-5,39	Antagonizam
5	10	27,47	-9,47	Antagonizam
5	1	34,70	4,60	Sinergizam
5	0,1	25,65	0,60	Sinergizam
1	100	33,89	-8,13	Antagonizam
1	10	36,99	3,06	Sinergizam
1	1	22,81	-4,28	Antagonizam
1	0,1	33,39	11,36	Sinergizam
0,1	100	36,19	4,40	Sinergizam
0,1	10	22,66	-1,03	Antagonizam
0,1	1	27,43	10,58	Sinergizam
0,1	0,1	24,99	13,19	Sinergizam

Tablica 13. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PSNP 150 nm i metilparabena na AR-EcoScreen GR KO M1 stanicama.

PS150	Metilparaben	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0	-	-
10	0	-4,12	-	-
5	0	4,87	-	-
1	0	1,87	-	-
0,1	0	-8,38	-	-
0	100	38,23	-	-
0	10	28,61	-	-
0	1	22,13	-	-
0	0,1	15,21	-	-
10	100	39,79	5,67	Sinergizam
10	10	18,26	-6,23	Antagonizam
10	1	16,55	-1,46	Antagonizam
10	0,1	14,18	3,08	Sinergizam
5	100	45,68	2,57	Sinergizam
5	10	23,01	-10,47	Antagonizam
5	1	13,00	-14,00	Antagonizam
5	0,1	11,64	-8,45	Antagonizam
1	100	41,17	1,07	Sinergizam
1	10	20,97	-9,50	Antagonizam
1	1	17,37	-6,62	Antagonizam
1	0,1	17,38	0,30	Sinergizam
0,1	100	43,46	13,61	Sinergizam
0,1	10	22,15	1,92	Sinergizam
0,1	1	14,36	0,61	Sinergizam
0,1	0,1	14,24	7,40	Sinergizam

Tablica 14. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PSNP 350 nm i oksibenzona na AR-EcoScreen GR KO M1 stanicama.

PS350	Oksibenzon	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0	-	-
10	0	-3,47	-	-
5	0	-6,09	-	-
1	0	-3,12	-	-
0,1	0	-2,68	-	-
0	100	40,16	-	-
0	10	32,07	-	-
0	1	25,23	-	-
0	0,1	20,17	-	-
10	100	32,94	-3,75	Antagonizam
10	10	21,68	-6,92	Antagonizam
10	1	20,69	-1,07	Antagonizam
10	0,1	19,75	3,05	Sinergizam
5	100	35,12	1,05	Sinergizam
5	10	18,43	-7,54	Antagonizam
5	1	18,10	-1,04	Antagonizam
5	0,1	18,67	4,58	Sinergizam
1	100	34,27	-2,77	Antagonizam
1	10	20,51	-8,43	Antagonizam
1	1	26,26	4,14	Sinergizam
1	0,1	19,46	2,41	Sinergizam
0,1	100	32,15	-5,33	Antagonizam
0,1	10	17,28	-12,10	Antagonizam
0,1	1	17,00	-5,54	Antagonizam
0,1	0,1	20,66	3,16	Sinergizam

Tablica 15. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PSNP 350 nm i metilparabena na AR-EcoScreen GR KO M1 stanicama.

PS350	Metilparaben	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0	-	-
10	0	-3,47	-	-
5	0	-6,09	-	-
1	0	-3,12	-	-
0,1	0	-2,68	-	-
0	100	38,23	-	-
0	10	28,61	-	-
0	1	22,13	-	-
0	0,1	15,21	-	-
10	100	37,91	3,14	Sinergizam
10	10	19,86	-5,28	Antagonizam
10	1	15,36	-3,30	Antagonizam
10	0,1	13,26	1,51	Sinergizam
5	100	37,59	5,45	Sinergizam
5	10	15,27	-7,25	Antagonizam
5	1	19,78	3,74	Sinergizam
5	0,1	17,39	8,26	Sinergizam
1	100	35,92	0,81	Sinergizam
1	10	21,61	-3,88	Antagonizam
1	1	22,82	3,80	Sinergizam
1	0,1	18,47	6,37	Sinergizam
0,1	100	40,47	4,92	Sinergizam
0,1	10	23,20	-2,73	Antagonizam
0,1	1	23,45	4,00	Sinergizam
0,1	0,1	20,19	7,65	Sinergizam

Tablica 16. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PPNP 180 nm i oksibenzona na AR-EcoScreen GR KO M1 stanicama.

PP180	Oksibenzon	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0	-	-
10	0	48,47	-	-
5	0	33,24	-	-
1	0	21,17	-	-
0,1	0	6,43	-	-
0	100	40,16	-	-
0	10	32,07	-	-
0	1	25,23	-	-
0	0,1	20,17	-	-
10	100	60,74	-27,89	Antagonizam
10	10	53,94	-26,59	Antagonizam
10	1	54,05	-19,64	Antagonizam
10	0,1	54,35	-14,29	Antagonizam
5	100	57,65	-15,75	Antagonizam
5	10	41,67	-23,64	Antagonizam
5	1	43,02	-15,45	Antagonizam
5	0,1	35,31	-18,11	Antagonizam
1	100	48,29	-13,03	Antagonizam
1	10	25,48	-27,76	Antagonizam
1	1	20,98	-25,41	Antagonizam
1	0,1	21,49	-19,85	Antagonizam
0,1	100	55,98	9,38	Sinergizam
0,1	10	22,43	-16,07	Antagonizam
0,1	1	22,35	-9,31	Antagonizam
0,1	0,1	18,44	-8,16	Antagonizam

Tablica 17. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PPNP 180 nm i metilparabena na AR-EcoScreen GR KO M1 stanicama.

PP180	Metilparaben	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0	-	-
10	0	48,47	-	-
5	0	33,24	-	-
1	0	21,17	-	-
0,1	0	6,43	-	-
0	100	38,23	-	-
0	10	28,61	-	-
0	1	22,13	-	-
0	0,1	15,21	-	-
10	100	65,65	-21,05	Antagonizam
10	10	52,18	-24,90	Antagonizam
10	1	47,08	-23,52	Antagonizam
10	0,1	44,78	-18,90	Antagonizam
5	100	58,86	-12,61	Antagonizam
5	10	34,74	-27,11	Antagonizam
5	1	30,86	-24,51	Antagonizam
5	0,1	33,21	-15,25	Antagonizam
1	100	46,24	-13,16	Antagonizam
1	10	41,72	-8,06	Antagonizam
1	1	24,48	-18,82	Antagonizam
1	0,1	22,60	-13,78	Antagonizam
0,1	100	46,32	1,65	Sinergizam
0,1	10	25,58	-9,46	Antagonizam
0,1	1	20,64	-7,92	Antagonizam
0,1	0,1	15,56	-6,09	Antagonizam

Tablica 18. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PENP 350 nm i oksibenzona na AR-EcoScreen GR KO M1 stanicama.

PE350	Oksibenzon	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0	-	-
10	0	42,74	-	-
5	0	29,24	-	-
1	0	16,47	-	-
0,1	0	10,42	-	-
0	100	40,16	-	-
0	10	32,07	-	-
0	1	25,23	-	-
0	0,1	20,17	-	-
10	100	63,43	-19,46	Antagonizam
10	10	43,06	-31,74	Antagonizam
10	1	40,75	-27,21	Antagonizam
10	0,1	43,66	-19,25	Antagonizam
5	100	62,56	-6,83	Antagonizam
5	10	38,82	-22,48	Antagonizam
5	1	41,18	-13,29	Antagonizam
5	0,1	38,91	-10,50	Antagonizam
1	100	62,69	6,06	Sinergizam
1	10	35,71	-12,83	Antagonizam
1	1	33,30	-8,40	Antagonizam
1	0,1	33,27	-3,38	Antagonizam
0,1	100	50,30	-0,28	Antagonizam
0,1	10	34,36	-8,13	Antagonizam
0,1	1	39,11	3,46	Sinergizam
0,1	0,1	39,15	8,55	Sinergizam

Tablica 19. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PENP 350 nm i metilparabena na AR-EcoScreen GR KO M1 stanicama.

PE350	Metilparaben	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0	-	-
10	0	42,74	-	-
5	0	29,24	-	-
1	0	16,47	-	-
0,1	0	10,42	-	-
0	100	38,23	-	-
0	10	28,61	-	-
0	1	22,13	-	-
0	0,1	15,21	-	-
10	100	62,16	-18,80	Antagonizam
10	10	36,29	-35,06	Antagonizam
10	1	39,97	-24,90	Antagonizam
10	0,1	32,66	-25,29	Antagonizam
5	100	50,44	-17,03	Antagonizam
5	10	41,72	-16,12	Antagonizam
5	1	34,10	-17,26	Antagonizam
5	0,1	26,25	-18,20	Antagonizam
1	100	47,67	-7,04	Antagonizam
1	10	37,19	-7,89	Antagonizam
1	1	40,09	1,49	Sinergizam
1	0,1	38,21	6,53	Sinergizam
0,1	100	44,47	-4,18	Antagonizam
0,1	10	41,33	2,30	Sinergizam
0,1	1	42,62	10,07	Sinergizam
0,1	0,1	34,45	8,81	Sinergizam

Tablica 20. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PSNP 50 nm i oksibenzona na HeLa-9903 stanicama.

PS50	Oksibenzon	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0,19	-	-
10	0	1,51	-	-
5	0	0,59	-	-
1	0	1,27	-	-
0,1	0	0,88	-	-
0	100	59,00	-	-
0	10	12,92	-	-
0	1	5,85	-	-
0	0,1	3,74	-	-
10	100	54,70	-5,63	Antagonizam
10	10	12,64	-1,60	Antagonizam
10	1	5,48	-1,69	Antagonizam
10	0,1	5,56	0,50	Sinergizam
5	100	59,28	-0,12	Antagonizam
5	10	14,36	1,04	Sinergizam
5	1	4,11	-2,15	Antagonizam
5	0,1	5,26	1,11	Sinergizam
1	100	47,47	-12,61	Antagonizam
1	10	12,29	-1,70	Antagonizam
1	1	5,41	-1,52	Antagonizam
1	0,1	9,28	4,46	Sinergizam
0,1	100	56,40	-3,29	Antagonizam
0,1	10	12,91	-0,70	Antagonizam
0,1	1	4,06	-2,48	Antagonizam
0,1	0,1	5,77	1,34	Sinergizam

Tablica 21. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PSNP 50 nm i metilparabena na HeLa-9903 stanicama.

PS50	Metilparaben	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0,19	-	-
10	0	1,51	-	-
5	0	0,59	-	-
1	0	1,27	-	-
0,1	0	0,88	-	-
0	100	52,99	-	-
0	10	14,00	-	-
0	1	4,11	-	-
0	0,1	2,71	-	-
10	100	53,46	-0,85	Antagonizam
10	10	11,82	-3,50	Antagonizam
10	1	6,51	1,08	Sinergizam
10	0,1	5,37	1,33	Sinergizam
5	100	55,97	2,58	Sinergizam
5	10	11,71	-2,70	Antagonizam
5	1	3,17	-1,35	Antagonizam
5	0,1	2,01	-1,11	Antagonizam
1	100	50,30	-3,77	Antagonizam
1	10	10,99	-4,08	Antagonizam
1	1	6,14	0,95	Sinergizam
1	0,1	1,64	-2,15	Antagonizam
0,1	100	52,33	-1,35	Antagonizam
0,1	10	11,39	-3,30	Antagonizam
0,1	1	3,86	-0,94	Antagonizam
0,1	0,1	6,73	3,33	Sinergizam

Tablica 22. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PENP 50 nm i oksibenzona na HeLa-9903 stanicama.

PE50	Oksibenzon	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0,19	-	-
10	0	1,09	-	-
5	0	0,53	-	-
1	0	0,06	-	-
0,1	0	1,49	-	-
0	100	59,00	-	-
0	10	12,92	-	-
0	1	5,85	-	-
0	0,1	3,74	-	-
10	100	56,81	-3,09	Antagonizam
10	10	11,84	-1,97	Antagonizam
10	1	4,97	-1,78	Antagonizam
10	0,1	6,43	1,78	Sinergizam
5	100	56,15	-3,19	Antagonizam
5	10	11,72	-1,53	Antagonizam
5	1	3,74	-2,45	Antagonizam
5	0,1	6,84	2,76	Sinergizam
1	100	60,39	1,52	Sinergizam
1	10	14,18	1,38	Sinergizam
1	1	4,44	-1,28	Antagonizam
1	0,1	4,97	1,35	Sinergizam
0,1	100	53,77	-6,54	Antagonizam
0,1	10	13,10	-1,13	Antagonizam
0,1	1	5,05	-2,10	Antagonizam
0,1	0,1	5,45	0,40	Sinergizam

Tablica 23. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PENP 50 nm i metilparabena na HeLa-9903 stanicama.

PE50	Metilparaben	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0,19	-	-
10	0	1,09	-	-
5	0	0,53	-	-
1	0	0,06	-	-
0,1	0	1,49	-	-
0	100	52,99	-	-
0	10	14,00	-	-
0	1	4,11	-	-
0	0,1	2,71	-	-
10	100	53,73	-0,16	Antagonizam
10	10	13,60	-1,30	Antagonizam
10	1	4,70	-0,32	Antagonizam
10	0,1	2,67	-0,94	Antagonizam
5	100	53,17	-0,17	Antagonizam
5	10	12,02	-2,32	Antagonizam
5	1	5,01	0,55	Sinergizam
5	0,1	3,38	0,33	Sinergizam
1	100	53,47	0,60	Sinergizam
1	10	10,98	-2,89	Antagonizam
1	1	2,81	-1,18	Antagonizam
1	0,1	1,39	-1,19	Antagonizam
0,1	100	54,80	0,51	Sinergizam
0,1	10	11,14	-4,16	Antagonizam
0,1	1	4,20	-1,22	Antagonizam
0,1	0,1	1,21	-2,80	Antagonizam

Tablica 24. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PPNP 50 nm i oksibenzona na HeLa-9903 stanicama.

PP50	Oksibenzon	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0,19	-	-
10	0	5,79	-	-
5	0	2,04	-	-
1	0	1,24	-	-
0,1	0	0,61	-	-
0	100	59,00	-	-
0	10	12,92	-	-
0	1	5,85	-	-
0	0,1	3,74	-	-
10	100	56,42	-8,19	Antagonizam
10	10	11,44	-7,08	Antagonizam
10	1	7,92	-3,53	Antagonizam
10	0,1	2,84	-6,51	Antagonizam
5	100	57,12	-3,73	Antagonizam
5	10	10,77	-3,99	Antagonizam
5	1	5,94	-1,76	Antagonizam
5	0,1	3,59	-2,00	Antagonizam
1	100	60,18	0,13	Sinergizam
1	10	12,86	-1,10	Antagonizam
1	1	3,45	-3,45	Antagonizam
1	0,1	2,67	-2,13	Antagonizam
0,1	100	67,81	8,38	Sinergizam
0,1	10	10,85	-2,49	Antagonizam
0,1	1	2,22	-4,06	Antagonizam
0,1	0,1	3,30	-0,87	Antagonizam

Tablica 25. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PPNP 50 nm i metilparabena na HeLa-9903 stanicama.

PP50	Metilparaben	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0,19	-	-
10	0	5,79	-	-
5	0	2,04	-	-
1	0	1,24	-	-
0,1	0	0,61	-	-
0	100	52,99	-	-
0	10	14,00	-	-
0	1	4,11	-	-
0	0,1	2,71	-	-
10	100	33,38	-25,22	Antagonizam
10	10	10,79	-8,82	Antagonizam
10	1	3,02	-6,70	Antagonizam
10	0,1	3,50	-4,82	Antagonizam
5	100	42,00	-12,84	Antagonizam
5	10	12,63	-3,21	Antagonizam
5	1	4,96	-1,00	Antagonizam
5	0,1	3,42	-1,14	Antagonizam
1	100	42,64	-11,40	Antagonizam
1	10	12,19	-2,86	Antagonizam
1	1	2,14	-3,02	Antagonizam
1	0,1	2,50	-1,26	Antagonizam
0,1	100	49,15	-4,27	Antagonizam
0,1	10	13,30	-1,12	Antagonizam
0,1	1	4,84	0,30	Sinergizam
0,1	0,1	1,99	-1,15	Antagonizam

Tablica 26. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PET i oksibenzona na HeLa-9903 stanicama.

PET	Oksibenzon	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0,19	-	-
10	0	1,83	-	-
5	0	1,38	-	-
1	0	0,49	-	-
0,1	0	0,61	-	-
0	100	59,00	-	-
0	10	12,92	-	-
0	1	5,85	-	-
0	0,1	3,74	-	-
10	100	61,21	0,57	Sinergizam
10	10	14,02	-0,54	Antagonizam
10	1	6,51	-0,99	Antagonizam
10	0,1	5,51	0,12	Sinergizam
5	100	59,30	-0,89	Antagonizam
5	10	12,20	-1,91	Antagonizam
5	1	3,60	-3,44	Antagonizam
5	0,1	5,67	0,74	Sinergizam
1	100	59,65	0,35	Sinergizam
1	10	11,53	-1,70	Antagonizam
1	1	1,39	-4,77	Antagonizam
1	0,1	1,98	-2,07	Antagonizam
0,1	100	67,48	8,06	Sinergizam
0,1	10	11,86	-1,47	Antagonizam
0,1	1	2,08	-4,19	Antagonizam
0,1	0,1	1,96	-2,20	Antagonizam

Tablica 27. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PET i metilparabena na HeLa-9903 stanicama.

PET	Metilparaben	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0,19	-	-
10	0	1,83	-	-
5	0	1,38	-	-
1	0	0,49	-	-
0,1	0	0,61	-	-
0	100	52,99	-	-
0	10	14,00	-	-
0	1	4,11	-	-
0	0,1	2,71	-	-
10	100	56,01	1,38	Sinergizam
10	10	11,91	-3,73	Antagonizam
10	1	5,96	0,20	Sinergizam
10	0,1	5,82	1,47	Sinergizam
5	100	56,33	2,15	Sinergizam
5	10	13,35	-1,84	Antagonizam
5	1	4,05	-1,25	Antagonizam
5	0,1	4,91	1,01	Sinergizam
1	100	51,73	-1,56	Antagonizam
1	10	7,00	-7,30	Antagonizam
1	1	2,39	-2,03	Antagonizam
1	0,1	1,56	-1,45	Antagonizam
0,1	100	47,76	-5,65	Antagonizam
0,1	10	11,16	-3,26	Antagonizam
0,1	1	1,63	-2,90	Antagonizam
0,1	0,1	0,36	-2,77	Antagonizam

Tablica 28. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PSNP 150 nm i oksibenzona na HeLa-9903 stanicama.

PS150	Oksibenzon	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0,19	-	-
10	0	1,52	-	-
5	0	2,38	-	-
1	0	2,41	-	-
0,1	0	1,23	-	-
0	100	59,00	-	-
0	10	12,92	-	-
0	1	5,85	-	-
0	0,1	3,74	-	-
10	100	40,29	-20,04	Antagonizam
10	10	6,38	-7,87	Antagonizam
10	1	1,33	-5,85	Antagonizam
10	0,1	2,49	-2,58	Antagonizam
5	100	48,33	-12,86	Antagonizam
5	10	7,94	-7,17	Antagonizam
5	1	2,24	-5,80	Antagonizam
5	0,1	1,44	-4,50	Antagonizam
1	100	49,37	-11,85	Antagonizam
1	10	7,87	-7,28	Antagonizam
1	1	3,30	-4,78	Antagonizam
1	0,1	3,30	-2,67	Antagonizam
0,1	100	55,30	-4,74	Antagonizam
0,1	10	9,36	-4,60	Antagonizam
0,1	1	1,72	-5,16	Antagonizam
0,1	0,1	2,60	-2,19	Antagonizam

Tablica 29. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PSNP 150 nm i metilparabena na HeLa-9903 stanicama.

PS150	Metilparaben	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0,19	-	-
10	0	1,52	-	-
5	0	2,38	-	-
1	0	2,41	-	-
0,1	0	1,23	-	-
0	100	52,99	-	-
0	10	14,00	-	-
0	1	4,11	-	-
0	0,1	2,71	-	-
10	100	47,67	-6,66	Antagonizam
10	10	9,87	-5,46	Antagonizam
10	1	2,07	-3,38	Antagonizam
10	0,1	1,13	-2,91	Antagonizam
5	100	56,98	1,80	Sinergizam
5	10	16,91	0,72	Sinergizam
5	1	2,75	-3,56	Antagonizam
5	0,1	3,39	-1,51	Antagonizam
1	100	61,90	6,68	Sinergizam
1	10	15,91	-0,31	Antagonizam
1	1	1,61	-4,73	Antagonizam
1	0,1	3,06	-1,88	Antagonizam
0,1	100	62,21	8,18	Sinergizam
0,1	10	14,78	-0,25	Antagonizam
0,1	1	3,66	-1,49	Antagonizam
0,1	0,1	2,46	-1,29	Antagonizam

Tablica 30. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PSNP 350 nm i oksibenzona na HeLa-9903 stanicama.

PS350	Oksibenzon	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0,19	-	-
10	0	1,31	-	-
5	0	1,14	-	-
1	0	3,68	-	-
0,1	0	1,21	-	-
0	100	59,00	-	-
0	10	12,92	-	-
0	1	5,85	-	-
0	0,1	3,74	-	-
10	100	47,40	-12,72	Antagonizam
10	10	11,18	-2,86	Antagonizam
10	1	6,69	-0,28	Antagonizam
10	0,1	5,74	0,88	Sinergizam
5	100	42,58	-17,37	Antagonizam
5	10	4,47	-9,40	Antagonizam
5	1	2,68	-4,12	Antagonizam
5	0,1	2,61	-2,09	Antagonizam
1	100	45,62	-16,88	Antagonizam
1	10	5,15	-11,26	Antagonizam
1	1	1,78	-7,56	Antagonizam
1	0,1	1,32	-5,92	Antagonizam
0,1	100	40,81	-19,21	Antagonizam
0,1	10	6,55	-7,39	Antagonizam
0,1	1	0,96	-5,91	Antagonizam
0,1	0,1	1,25	-3,52	Antagonizam

Tablica 31. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PSNP 350 nm i metilparabena na HeLa-9903 stanicama.

PS350	Metilparaben	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0,19	-	-
10	0	1,31	-	-
5	0	1,14	-	-
1	0	3,68	-	-
0,1	0	1,21	-	-
0	100	52,99	-	-
0	10	14,00	-	-
0	1	4,11	-	-
0	0,1	2,71	-	-
10	100	57,17	3,06	Sinergizam
10	10	13,02	-2,10	Antagonizam
10	1	4,35	-0,88	Antagonizam
10	0,1	3,94	0,11	Sinergizam
5	100	60,70	6,76	Sinergizam
5	10	14,29	-0,66	Antagonizam
5	1	1,82	-3,24	Antagonizam
5	0,1	2,21	-1,45	Antagonizam
1	100	62,89	6,41	Sinergizam
1	10	12,43	-5,06	Antagonizam
1	1	3,81	-3,79	Antagonizam
1	0,1	1,02	-5,19	Antagonizam
0,1	100	65,53	11,52	Sinergizam
0,1	10	13,46	-1,56	Antagonizam
0,1	1	2,48	-2,65	Antagonizam
0,1	0,1	1,15	-2,58	Antagonizam

Tablica 32. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PPNP 180 nm i oksibenzona na HeLa-9903 stanicama.

PP180	Oksibenzon	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0,19	-	-
10	0	14,41	-	-
5	0	7,47	-	-
1	0	8,87	-	-
0,1	0	1,08	-	-
0	100	59,00	-	-
0	10	12,92	-	-
0	1	5,85	-	-
0	0,1	3,74	-	-
10	100	55,80	-17,42	Antagonizam
10	10	12,70	-14,44	Antagonizam
10	1	7,51	-12,56	Antagonizam
10	0,1	6,24	-11,73	Antagonizam
5	100	55,86	-10,42	Antagonizam
5	10	15,10	-5,10	Antagonizam
5	1	7,54	-5,59	Antagonizam
5	0,1	5,91	-5,12	Antagonizam
1	100	64,21	-3,48	Antagonizam
1	10	13,84	-7,76	Antagonizam
1	1	2,20	-12,34	Antagonizam
1	0,1	2,02	-10,42	Antagonizam
0,1	100	67,61	7,72	Sinergizam
0,1	10	5,33	-8,48	Antagonizam
0,1	1	5,26	-1,48	Antagonizam
0,1	0,1	2,98	-1,65	Antagonizam

Tablica 33. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PPNP 180 nm i metilparabena na HeLa-9903 stanicama.

PP180	Metilparaben	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0,19	-	-
10	0	14,41	-	-
5	0	7,47	-	-
1	0	8,87	-	-
0,1	0	1,08	-	-
0	100	52,99	-	-
0	10	14,00	-	-
0	1	4,11	-	-
0	0,1	2,71	-	-
10	100	58,45	-8,76	Antagonizam
10	10	17,82	-10,40	Antagonizam
10	1	4,93	-13,41	Antagonizam
10	0,1	2,98	-13,95	Antagonizam
5	100	53,97	-6,31	Antagonizam
5	10	11,74	-9,55	Antagonizam
5	1	1,99	-9,41	Antagonizam
5	0,1	1,94	-8,05	Antagonizam
1	100	67,04	5,36	Sinergizam
1	10	11,50	-11,19	Antagonizam
1	1	3,03	-9,77	Antagonizam
1	0,1	1,41	-9,99	Antagonizam
0,1	100	62,55	8,66	Sinergizam
0,1	10	12,75	-2,14	Antagonizam
0,1	1	2,19	-2,81	Antagonizam
0,1	0,1	1,13	-2,47	Antagonizam

Tablica 34. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PENP 350 nm i oksibenzona na HeLa-9903 stanicama.

PE350	Oksibenzon	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0,19	-	-
10	0	42,91	-	-
5	0	29,72	-	-
1	0	7,74	-	-
0,1	0	1,37	-	-
0	100	59,00	-	-
0	10	12,92	-	-
0	1	5,85	-	-
0	0,1	3,74	-	-
10	100	48,91	-52,82	Antagonizam
10	10	15,95	-39,69	Antagonizam
10	1	8,45	-40,13	Antagonizam
10	0,1	3,04	-43,43	Antagonizam
5	100	56,22	-32,31	Antagonizam
5	10	18,49	-23,96	Antagonizam
5	1	6,60	-28,78	Antagonizam
5	0,1	4,16	-29,11	Antagonizam
1	100	59,31	-7,25	Antagonizam
1	10	17,34	-3,14	Antagonizam
1	1	5,33	-8,08	Antagonizam
1	0,1	2,98	-8,32	Antagonizam
0,1	100	65,57	5,39	Sinergizam
0,1	10	19,97	5,87	Sinergizam
0,1	1	6,88	-0,15	Antagonizam
0,1	0,1	2,19	-2,73	Antagonizam

Tablica 35. Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i učinci smjese PENP 350 nm i metilparabena na HeLa-9903 stanicama.

PE350	Metilparaben	Odgovor	D _{DA}	Učinak smjese
0	0	0,19	-	-
10	0	42,91	-	-
5	0	29,72	-	-
1	0	7,74	-	-
0,1	0	1,37	-	-
0	100	52,99	-	-
0	10	14,00	-	-
0	1	4,11	-	-
0	0,1	2,71	-	-
10	100	61,26	-34,46	Antagonizam
10	10	17,12	-39,60	Antagonizam
10	1	9,49	-37,35	Antagonizam
10	0,1	8,13	-37,30	Antagonizam
5	100	65,18	-17,34	Antagonizam
5	10	20,25	-23,28	Antagonizam
5	1	9,02	-24,62	Antagonizam
5	0,1	7,38	-24,86	Antagonizam
1	100	58,35	-2,20	Antagonizam
1	10	16,15	-5,41	Antagonizam
1	1	8,37	-3,30	Antagonizam
1	0,1	8,06	-2,21	Antagonizam
0,1	100	67,05	12,88	Sinergizam
0,1	10	22,05	6,87	Sinergizam
0,1	1	8,38	3,09	Sinergizam
0,1	0,1	3,03	-0,86	Antagonizam

§ 9. ŽIVOTOPIS

Nikolina Peranić rođena je 16. siječnja 1996. u Zadru. Klasičnu gimnaziju u Pazinu završila je 2014. i tada upisala studij Kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski studij završava 2020.godine obranom diplomskog rada izrađenog na Zavodu za fizikalnu kemiju.

Od rujna 2021. godine zaposlena je kao asistent-doktorand na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u istraživačkoj grupi Ivane Vinković Vrček na projektu „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti” (natječajni rok DOK-2021-02-4858) Hrvatske zaklade za znanost. Suradivala je na Obzor 2020 projektu „Pharmaceutical Open Innovation Test Bed for Enabling Nano-pharmaceutical Innovative Products – PHOENIX“, na hrvatsko-kineskom bilateralnom projektu „EmergeTox - Mehanizam hormonalnih učinaka tipičnih zagađivača okoliša“ te na HRZZ projektu „Siguran pristup za razvoj nano-sustava za ciljanu isporuku lijekova u mozak – SENDER“ u okviru programa „Znanstvene suradnja“. Tijekom rada na Institutu ostvarila je koautorstvo na 9 objavljenih znanstvenih radova. Dobitnica je „Short Term Scientific Mission“ stipendije COST akcije 17140 u sklopu koje je mjesec dana boravila u tvrtki Artidis AG u Baselu, Švicarska na edukaciji za mikroskop atomskih sila (AFM). Od trenutka zaposlenja do predaje disertacije sudjelovala je na više konferencija te edukacija. Članica je Europskog društva za toksikologiju *in vitro* (ESTIV) i stekla je certifikat za rad s laboratorijskim životinjama.

Popis znanstvenih publikacija:

1. **N. Peranić**, L. Božičević, I. Vinković Vrček, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **76** (2025) 63-69. *
2. L. Božičević, V. Vrček, **N. Peranić**, N. Kalčec, I. Vinković Vrček, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju* **75** (2024) 68-74.
3. L. Božičević, K. Altmann, J. Hildebrandt, X. Knigge, V. Vrček, **N. Peranić**, N. Kalčec, I. Vinković Vrček, *Environmental Science-Nano* **11** (2024) 2112-2126. *
4. B. Bakan, N. Kalčec, S. Liu, K. Ilić, Y. Qu, I. Capjak, L. Božičević, **N. Peranić**, I. Vinković Vrček, *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju*, **75** (2024) 1-14. *
5. S. Inkret, I. Erceg, M. Ćurlin, N. Kalčec, **N. Peranić**, I. Vinković Vrček, D. Domazet Jurašin, M. Dutour Sikirić, *RSC Advances* **13** (2023) 17384-17397.

-
6. N. Kalčec, **N. Peranić**, I. Mamić, M. Beus, C. R. Hall, T. A. Smith, M. A. Sani, P. Turčić, F. Separovic, I. Vinković Vrček, *ACS Applied Nanomaterials* **6** (2023) 17581-17592.
 7. S. Inkret, M. Ćurlin, K. Smokrović, N. Kalčec, **N. Peranić**, N. Maltar-Strmečki, D. Domazet Jurašin, M. Dutour Sikirić, *Materials* **16** (2023) 1764.
 8. T. Klačić, **N. Peranić**, B. Radatović, D. Kovačević, *Colloids and surfaces. A, Physicochemical and engineering aspects*, **648** (2022) 129385.
 9. N. Kalčec, **N. Peranić**, R. Barbir, C. R. Hall, T. A. Smith, M. A. Sani, R. Frkanec, F. Separovic, I. Vinković Vrček, *Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy* **268** (2022) 120707.