



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Lucija Božičević

**Endokrino disruptivno djelovanje smjesa  
nanočestica plastike i odabranih lijekova  
*in vitro***

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2024.



Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Lucija Božičević

**Endokrino disruptivno djelovanje smjesa  
nanočestica plastike i odabranih lijekova  
*in vitro***

DOKTORSKI RAD

Mentori:

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

prof. dr. sc. Valerije Vrček, redovni profesor u trajnom izboru

Zagreb, 2024.



University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Lucija Božičević

**Endocrine disrupting effects of mixtures  
containing plastic nanoparticles and  
selected pharmaceuticals *in vitro***

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisors:

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

Full Professor with Tenure Valerije Vrček, PhD

Zagreb, 2024.

Rad je predan na ocjenu Fakultetskom vijeću Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja akademskog stupnja doktora znanosti iz područja biomedicine i zdravstva, polje farmacija, grana farmacija.

Rad je izrađen na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada pod mentorstvom naslovne izv. prof. dr. sc. Ivane Vinković Vrček, znan. savj. u tr.iz. i komentorstvom prof. dr. sc. Valerija Vrčeka, u sklopu poslijediplomskog doktorskog studija „Farmaceutsko-biokemijske znanosti“ Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Idejni koncept rada i materijalni troškovi pokriveni su Obzor 2020 projektom „*Science-based Risk Governance of Nano-Technology*“ (RiskGONE, H2020-NMBP-13-2018 RIA) te hrvatsko-kineskim bilateralnim projektom „EmergeTox - Mehanizam hormonalnih učinaka tipičnih zagađivača okoliša“.

Doktorski je rad izrađen u okviru programa „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“ (natječajni rok DOK-01-2020) Hrvatske zaklade za znanost.



*Prije svega, želim zahvaliti svojoj mentorici nasl. izv. prof. dr. sc. Ivani Vinković Vrček. Hvala Vam na pruženoj prilici, hvala Vam što ste me iz dana u dan poticali da konstantno učim i usavršavam nove vještine. Hvala što ste mi omogućili samostalnost, a u isto vrijeme bili iznimna podrška prilikom svakog provedenog eksperimenta i napisanog rada. Bez Vašeg poticaja i ulaganja u mene kao mladu znanstvenicu - ne bih upoznala pola metoda i tehnika s kojima danas radim i sigurna sam da se ne bih razvila u osobu koja danas jesam. Hvala na svojoj pomoći, strpljenju, radovima, konferencijama, putovanjima, projektima i svim savjetima od prvog dana mojeg zaposlenja.*

*Želim zahvaliti i komentoru, prof. dr. sc. Valeriju Vrčeku na kontinuiranoj podršci još od studentskih dana. Hvala Vam na svakom konstruktivnom savjetu te cjelokupnom vremenu, trudu i strpljenju koje ste uložili u mene od prvog provedenog računa.*

*Hvala i svima onima koji su u bilo kojem trenutku bili dio mojeg doktorskog putovanja - od sobe 24 u sjevernoj zgradi do nove zgrade Instituta. Hvala kolegama i prijateljima Nikolinama P. i K., Mamiću, Anamariji, Rinei, Barbari, Kruni, Emeriku, ali i svim drugim zaposlenicima Instituta koji su mi u bilo kojem trenutku i na bilo koji način uveseljavali dane. Najviše hvala mojoj prijici koja je otkad je došla sa mnom dijelila sve dobro i loše skoro pa 24 sata u danu - od frustracije nad estrogenskim receptorima do savršene usklađenosti prilikom izolacije RNA.*

*Hvala svim mojim prijateljima - mojim ramenima za plakanje i onima koji su prisutni u svim najljepšim i najtežim trenucima. Mojim curama Mihaeli, Doris, Tonki i Heleni - da sam mogla birati, ne bih uspjela odabrati nikog s kim bi mi bilo draže odrasti. Hvala vam što je dio svake od vas dio mene, a i obrnuto.*

*Mojoj ekipi s faksa - hvala vam na stalnoj podršci i što ste me slušali i onda kad znam da vam se nije dalo slušati o pokusima. Hvala Borni i Heleni za sve poticaje i pogurance od ranih godina faksa pa nadalje - znate da bez vas dvoje ne bih bila tu gdje sam danas.*

*Na kraju svega, najviše hvala onima koji su tu oduvijek i zauvijek - mojoj obitelji.*

*Hvala mojima mami, tati, bratu te teti Vesni, teti Miri i njezinoj obitelji, teti Tanji i njezinoj obitelji - vi ste moj vjetar u leđa, oni koji vjeruju u mene kad ne vjerujem sama, oni koji me uvijek guraju dalje, oni koji se ne naljute kad pokus nije uspio pa mi se ne da razgovarati, oni koji me potiču svake sekunde svakog dana i oni zbog kojih sam apsolutno najviše osoba kakva jesam.*

*Dodatno, mami i tati - nemam što napisati osim hvala vam na svemu, sve na čemu sam vam zahvalna ne da se nabrojati, jer ne bi stalo niti na 1000 stranica.*

*Ovaj doktorat posvećujem svojim bakama Veri i Anki te djedovima Dušanu i Mići. Iako više nisu s nama, njihovu je ljubav, utjecaj i odgoj nemoguće zanemariti. Znam da bi danas bili ponosni.*

## SAŽETAK

Pretjerano korištenje i loše gospodarenje plastikom, doveli su do onečišćenja okoliša nanočesticama plastike (engl. *plastic nanoparticles*, PNP). Iako broj istraživanja o štetnim učincima PNP raste, nedostaju pouzdane informacije o učincima PNP na ljudsko zdravlje, posebice interakcijama s endokrinim sustavom. Osim PNP, okoliš je onečišćen i brojnim lijekovima. Paracetamol, ibuprofen, karbamazepin i fluoksetin svrstavaju su među lijekove koji su u okolišu kvantificirani u znatnim količinama. PNP mogu adsorbirati lijekove te činiti složene smjese čije djelovanje još nije istraženo. Unatoč tome, prisutnost okolišnih onečišćivala u složenim smjesama zanemaruje se te se primarno ispituje učinak pojedinačnih tvari.

Cilj istraživanja bio je utvrditi endokrino disruptivne učinke složenih smjesa PNP i lijekova. Istraživanje se temelji na ispitivanju učinaka na aktivnost estrogenskog receptora (ER) i proces steroidogeneze. Složene smjese pripremljene su miješanjem lijekova i/ili nanočestica polistirena, polipropilena i polietilena. PNP su karakterizirane obzirom na oblik, veličinu, raspodjelu veličina i  $\zeta$  potencijal. Učinci pojedinih tvari i njihovih smjesa na preživljenje stanica ispitani su pomoću MTS testa i protočne citometrije. Unos PNP u stanice određen je metodom protočne citometrije. Učinci na ER aktivaciju ispitani su luciferaznim testom prema OECD smjernici 455, a utjecaj na proces steroidogeneze qPCR-om i LC-MS/MS metodom prema OECD smjernici 456. Dobiveni rezultati pokazali su da se učinci pojedinačnih tvari značajno razlikuju u odnosu na učinke složenih smjesa. Smjese PNP i lijekova pokazale su znatno jače toksične i endokrino disruptivne učinke. Binarne i tercijarne smjese lijekova pokazuju složeni odnos doze i biološkog odgovora koji ovisi o sastavu smjese.

**Ključne riječi:** *nanočestice plastike, lijekovi, složene smjese, endokrini disruptori, estrogenski receptor, steroidogeneza*

## **SUMMARY**

### **Background and aim**

Plastic value chain has become central to modern living. Excessive production and use of plastic materials and inadequate waste management have led to the emergence of plastic microparticles (PMP) and nanoparticles (PNP) in the environment. PMP are classified as plastic polymer particles with size ranging from 1000 nm to 5 mm, while 1-1000 nm dimensions characterize PNP. Primary PMP and PNP are released to the environment in their original form from everyday consumer products, especially personal care products such as toothpaste or peeling. Secondary PMP and PNP are formed in the environment through mechanical, chemical or biological degradation of larger plastic objects. PMP and PNP have been detected in several human samples: from feces, urine, breast milk and meconium to hair, skin, lung tissue and even blood. Most frequently detected polymers were polystyrene (PS), polyethylene (PE), polyethylene terephthalate (PET) and polypropylene (PP). Such frequent detection of PMPs and PNP in human samples, alongside their unknown effects, have made them one of the primary health concerns in recent history.

Apart from PMP and PNP, pharmaceuticals are another emerging environmental contaminant that has been considered a significant risk for adverse effects on living organisms. Several studies have identified non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), anticonvulsants, antipsychotics and antidepressants, as well as steroid hormones and their derivatives as most frequently detected groups of drugs in the environment. These pharmaceuticals have been detected in ground waters, surface water and waste water treatment plants in concentrations from ng/L up to µg/L. Considering the scientific-based data, four drugs have been included in this research: over-the-counter (OTC) available analgesics and antipyretics paracetamol and ibuprofen, anticonvulsant carbamazepine and antidepressant fluoxetine. All of these drugs have not only been detected in the environment in significant amount, but they also possess endocrine disrupting properties.

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) were defined as chemicals that affect the normal function of endocrine system and cause adverse effects in affected population and its' progeny. Endocrine disrupting activity is caused by the agonistic or antagonistic interaction of chemical with hormone receptors or interferences with hormone synthesis, metabolism and transport. They have many specific toxicokinetic and toxicodynamic properties such as non-linear dose response,

causing effects at very low concentrations and interacting with more than one target tissue or function. Several main regulatory agencies such as United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA), European Chemicals Agency (ECHA), Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) and World Health Organisation (WHO) have recognized EDCs as one of the main global concerns for human health. To combat this growing issue, these organizations have developed different programs, guidelines and recommendation to provide the framework for complete risk assessment of endocrine disruptive activity.

Another major concern that is relatively unaddressed in scientific research is exposure to environmental contaminants in complex mixtures, rather than individual compounds. Risk assessment for environmental pollutants is primarily based on toxicological profiles of individual chemicals, but their presence in mixture can significantly change their effects on human health. This is especially prominent in mixtures with PMP and PNPs which can act as a “Trojan horse” and cause significant enhancement of adverse effects. The lack of scientific data in chemical mixture effects investigation is caused by complexity and costliness of the experiments.

The aim of the study was to determine the effects of PNP and selected pharmaceuticals on estrogen receptor (ER) activity and steroidogenesis in human cell lines T47D-KBluc and NCI-H295R, respectively. Additionally, effects of individual components were compared with the effects of complex mixtures containing PNPs and/or pharmaceuticals. The main hypothesis is that there will be a significant difference between the endocrine disrupting effects of individual components and complex mixtures.

## **Methods**

This study is based on the use of a complex model system to investigate endocrine disrupting properties of PNP, pharmaceuticals and their mixtures. The components of the model system are two cell lines - T47D-KBluc used to examine agonistic or antagonistic activity towards ER and NCI-H295R used for investigation of effects on steroidogenesis. Aside from the cell lines, model system includes tested substances: three types of PNPs (polystyrene, polypropylene and polyethylene nanoparticles) and four selected pharmaceuticals (paracetamol, ibuprofen, carbamazepine and fluoxetine).

PsNPs (25 nm), PpNPs (180 nm) and PeNPs (350 nm) were characterized by means of transmission electron microscopy (TEM), dynamic light scattering (DLS) and electrophoretic light

scattering (ELS). TEM was employed to determine the shape and primary size of PNPs, while DLS and ELS were used to investigate parameters related to colloidal stability and size distribution of PNPs in the suspension.

Effects of selected pharmaceuticals on cell viability were tested in a more extensive dose range using the MTS assay on cell line T47D-KBluc. After the determination of dose range to use in the experiments, two highest doses were tested for apoptosis activation using flow cytometry on both cell lines. Effects of PNPs on cell viability were determined solely using the flow cytometry, due to possibility of interference with colorimetric MTS Assay. Uptake of PNPs was also examined by determination of median fluorescence intensity on 525/40 detector. This was possible due to all PNPs being characterized with emission maxima in green spectrum.

ER activity was determined using the luciferase assay. T47D-KBluc are stably transfected with reporter gene for luciferase enzyme. This reporter gene is located downstream of the estrogen response element (ERE) and its transcription is activated after an agonist binds to the ER. After the treatment, cells are lysed and luciferase substrate oxyluciferin is added to the lysed cells, alongside some co-factors. Produces luminescence signal is then measured on the microplate reader and its' intensity is proportional to ER activity.

Effects on steroidogenesis were determined using quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR) and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). RT-qPCR was used to determine the change in expression of *CYP11*, *CYP17*, *CYP19*, *3 $\beta$ -HSD* and *17 $\beta$ -HSD* genes. LC-MS/MS analysis was done using the commercial MassChrom Steroids kit and changes in production of progesterone, 17-OH progesterone, dehydroepiandrosterone, androstenedione, testosterone and 17 $\beta$ -estradiol.

## Results

Results have shown that PsNP, PpNP and PeNP are spherical in shape with their primary size in accordance with the one provided by the manufacturer, which was  $25.3 \pm 2.9$  nm,  $187.5 \pm 28.7$  and  $344.9 \pm 18.9$  nm, respectively. They were characterized by hydrodynamic diameters of  $87.5 \pm 15.3$  nm for PsNP,  $497.9 \pm 37.9$  nm for PpNP and  $649.2 \pm 90.7$  nm for PeNP after the 48-hour incubation at 37°C.  $d_H$  is expectedly significantly higher than  $d_{TEM}$  due to the formation of protein corona in the cell culture media supplemented with charcoal-stripped fetal bovine serum rich in proteins.  $\zeta$  potential was negative and quite similar for all three types of PNP.

Cytotoxic effects of pharmaceuticals and/or PNP were determined by means of MTS for paracetamol, ibuprofen, carbamazepine and fluoxetine. Their IC<sub>50</sub> values were determined as 257.7, 312.7, 143.7 and 31.33 µm, respectively. Paracetamol, ibuprofen and carbamazepine in 100 and 50 µm concentrations and fluoxetine in 10 and 5 µm concentrations were tested for apoptosis activation in cell line T47D-KBluc. Due to the lack of cytotoxic effects, 10 µm for fluoxetine and 100 µm concentration for the other three drugs were chosen as highest used in further experiments. Additionally, paracetamol and ibuprofen were tested for apoptosis induction with NCI-H295R cell line, where the results were the same.

PpNP have shown slight, but not significant toxicity in concentration of 10 mg/L. PsNP and PeNP were not toxic to cells. Mixture of PNP, however, has caused a significant decrease in the number of live cells and decrease in the number of late apoptotic and dead cells. Therefore, individual PNPs were tested in the range from 0.001-10 mg/L, but their mixture was further tested with just up to 1 mg/L of each PNP in mixture. PsNP are the type of PNP that was most effectively internalized by cells. PpNP and PeNP have shown slight, but not statistically significant uptake. This was also expected due to the difference in size and the ability of 25 nm PsNP to passively enter the cells.

ER activity of more than 10 % of positive control (DES) was detected for PeNP, but not for PpNP, PsNP or any of tested pharmaceuticals. Mixture of PNP has shown a dose-related effect on ER activity. Mixture containing 1 mg/L of each PNP resulted in ER activity that was higher than 10 % of DES. This can be attributed to the additive effect of PNP proven by relative potency factor mixture effect assessment method. Agonistic activity towards ER was enhanced in all of the binary mixtures composed of pharmaceuticals and PNP with synergistic effects observed by interaction analysis using dose addition and independent action models. Mixtures of PsNP and drugs have shown a response that was dependent primarily on the concentration of drug in the mixture. With PpNs and PeNP, synergistic effect was diminished with higher concentration of PNP in the mixture, while the concentration of drug had little to no effect. Binary and ternary drug mixtures have shown complex interactions, dependent on both qualitative and quantitative composition of mixture. In general, obtained results have shown some type competitive antagonism of fluoxetine and carbamazepine with both paracetamol and ibuprofen. Mixture of ibuprofen and paracetamol had primarily synergistic interaction.

RT-qPCR results show that changes in the expression of several genes were more prominent at lower concentration of 10  $\mu\text{m}$  than at 100  $\mu\text{m}$ . It has affected primarily *CYP11*, *CYP17* and *3 $\beta$ -HSD*. On the other hand, response to paracetamol was proportional to the dose of the drug. Significant changes in gene expression were observed for *3 $\beta$ -HSD*, *CYP19* and *17 $\beta$ -HSD*. PsNP have not caused any significant changes by themselves, but their mixtures with ibuprofen and paracetamol have enhanced the effects of drugs. With steroid hormone production, ibuprofen caused increase in concentration of progesterone and 17-OH progesterone and decrease in concentration of all other products. Paracetamol has elevated produced levels of testosterone and 17 $\beta$ -estradiol. Dose-response relation was similar to the one observed with RT-qPCR analysis of gene expression. Again, PsNP have not caused any significant changes and in this case they enhanced the effects of ibuprofen, but not paracetamol. Mixture of paracetamol and ibuprofen acted similar to ibuprofen (increase in progesterone and 17-OH progesterone and decrease of other hormone levels).

## **Conclusion**

There was a clear and statistically significant difference between effects of individual components and complex mixtures for all examined endpoints. Mixtures of PNP and all four pharmaceuticals have achieved synergistic effects in almost all combinations. In mixtures of drugs with PsNP, the dose-response was proportional, while for PpNP and PeNP the agonistic activity was slightly diminished with higher concentrations of PNP in mixture. This is probably due to the difference in size of PNP. Smaller PsNP characterized by highest uptake in T47D-KBluc enhanced the uptake of adsorbed pharmaceuticals, while larger PpNP and PeNP decreased the uptake of absorbed drugs. Mixtures of pharmaceuticals have shown more complex interaction. Competitiveness between agents was observed for mixtures of fluoxetine and/or carbamazepine with paracetamol and ibuprofen in both binary and ternary mixtures. In NCI-H295R cell line, PsNP have not caused any significant effect by themselves. Ibuprofen and its mixture with PsNP increased production of progesterone and decreased production of all other hormones in the cascade. This was accompanied by increase in *3 $\beta$ -HSD* and *CYP17* expression, probably due to compensation caused by the increase in their substrate concentrations. On the other hand, paracetamol has increased production of both 17 $\beta$ -estradiol and testosterone and increased the



expression of all enzymes included in the process. Mixtures of paracetamol have caused the same effects and they were more prominent than the effects of individual components.

**Key words:** *plastic nanoparticles, pharmaceuticals, complex mixtures, endocrine disruptors, estrogen receptor, steroidogenesis*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Prisutnost nanočestica plastike u okolišu .....	1
1.2. Prisutnost lijekova u okolišu .....	2
1.2.1. Paracetamol .....	3
1.2.2. Ibuprofen .....	4
1.2.3. Karbamazepin.....	4
1.2.4. Fluoksetin .....	5
1.3. Endokrini disruptori .....	6
1.3.1. Učinci kemikalija na endokrini sustav .....	6
1.3.2. Regulatorne smjernice za ispitivanje endokrinih disruptora .....	7
1.3.3. Endokrino disruptivno djelovanje odabranih lijekova .....	8
1.3.4. Endokrino disruptivni učinci nanočestica plastike.....	10
1.4. Ispitivanje toksičnih učinaka složenih smjesa - regulatorni okvir i izazovi.....	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	13
3. MATERIJALI I METODE .....	14
3.1. Karakterizacija nanočestica.....	14
3.2. Priprema otopina lijekova i kontrolnih spojeva .....	16
3.3. Karakteristike, uzgoj i održavanje staničnih linija .....	17
3.3.1. Stanična linija T47D-KBluc.....	17
3.3.2. Stanična linija NCI-H295R .....	19
3.4. Ispitivanje preživljenja stanica i indukcije apoptoze.....	20
3.4.1. Ispitivanje utjecaja na preživljenje stanica pomoću MTS testa .....	21
3.4.2. Ispitivanje aktivacije apoptoze protočnom citometrijom .....	22
3.5. Određivanje staničnog unosa različitih plastičnih nanočestica .....	24
3.6. Ispitivanje aktivacije estrogenskih receptora .....	24
3.7. Ispitivanje učinaka na proces steroidogeneze .....	26
3.7.1. Određivanje ekspresije gena uključenih u proces steroidogeneze (RT-qPCR).....	27
3.7.2. Kvantifikacija međuprodukata steroidogeneze (LC-MS/MS) .....	30
3.8. Statistička obrada podataka.....	30
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	33
4.1. Fizikalno-kemijske karakteristike nanočestica plastike .....	33
4.2. Stanično preživljenje i aktivacija apoptoze .....	36

4.2.1. Učinak odabranih lijekova na preživljenje stanica i proces apoptoze.....	36
4.2.2. Učinak PNP na preživljenje stanica i proces apoptoze .....	40
4.3. Stanični unos različitih nanočestica plastike .....	42
4.4. Aktivacija estrogenskih receptora .....	45
4.4.1. Utjecaj pojedinačnih PNP i lijekova .....	45
4.4.2. Utjecaj složenih smjesa PNP i lijekova.....	47
4.5. Učinak na proces steroidogeneze .....	64
4.5.1. Utjecaj na ekspresiju gena.....	64
4.5.2. Utjecaj na produkciju steroidnih hormona .....	67
5. ZAKLJUČCI .....	70
6. POPIS LITERATURE .....	71
7. PRILOZI.....	89
8. POPIS KRATICA .....	123
9. ŽIVOTOPIS .....	126
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA .....	
BASIC DOCUMENTATION CARD.....	

## 1. UVOD

### 1.1. Prisutnost nanočestica plastike u okolišu

Korištenje plastike u svakodnevnom životu gotovo svugdje u svijetu postalo je sveprisutno i neizbježno. Razlog tome pogodnosti su plastike kao materijala za široki raspon predmeta za jednokratnu i višekratnu primjenu. Proizvodnja plastike jednostavan je i jeftin proces, a plastični materijal je multifunkcionalan, lagan, otporan i pristupačan (1). Procijenjeno je kako se proizvodnja plastike u posljednjih 50 godina uvećala 200 puta, a ukoliko se ne poduzmu nužni koraci za smanjenje proizvodnje plastičnih predmeta predviđa se kako će se kroz 20 godina trenutna razina proizvodnje plastike udvostručiti. Proizvodnja i pretjerano korištenje plastike, pogotovo one jednokratne, neadekvatno zbrinjavanje otpada te otpornost plastike na biološku razgradnju doveli su do onečišćenja okoliša plastičnim mikročesticama (engl. *plastic microparticles*, PMP) i plastičnim nanočesticama (engl. *plastic nanoparticles*, PNP) (2). Primarne PMP i PNP u okoliš dospijevaju direktno iz proizvoda za svakodnevnu upotrebu kakvi su primjerice paste za zube s mikrogranulama ili pilinzi koji sadrže sitne čestice. Sekundarne PMP i PNP u okolišu nastaju razgradnjom nepravilno zbrinutog otpada (3,4). Plastični predmeti u okolišu prolaze iznimno spori proces razgradnje koji može biti mehanički, kemijski ili biološki, a rezultira nastankom PNP i PMP. Prema procjenama različitih studija, na globalnoj razini godišnje u okoliš dospije i do 2,5 tone mikroplastike (5). Postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda mogu zadržati dio PMP koje u njih dospiju, no procjenjuje se kako značajna količina PMP i PNP do kojih se one razgrade dospijeva u rijeke, putem njih u mora i oceane, a zatim dopire i do svih dijelova okoliša uključujući nakupljanje u tlu, biljkama i životinjama. Tako je utvrđeno kako se u Kaliforniji iz dviju rijeka iz kojih su u uzorcima detektirane PMP i PNP u ocean prosječno otpusti do 2 bilijuna plastičnih čestica u vremenskom periodu od 3 dana (6).

Prema nekim klasifikacijama, nanočesticama se smatraju čestice promjera od 1 do 100 nm, dok drugi u nanočestice svrstavaju i one veličine do 1000 nm. S obzirom na takve podjele, mikročesticama se smatraju čestice promjera od 100 ili 1000 nanometara do 5 mikrometara. Zbog svoje veličine na nanoskali te mogućnosti pasivnog prolaska kroz stanične membrane, PNP se smatraju potencijalno opasnijima po ljudsko zdravlje od PMP (7). Nanočestice različitih plastičnih polimera detektirane su u oceanima, morima, rijekama i jezerima pri čemu se procjenjuje kako se na površini takvih vodenih tijela može naći prosječno 67 000 čestica/km<sup>2</sup>, dok određene studije pokazuju kako se ovaj broj u mediteranskim morima penje i do 100 000 čestica/km<sup>2</sup> (8). Osim u

prirodi, ljudi su izloženi PMP i PNP i kroz konzumaciju hrane i pića pa se tako u prethodno provedenim istraživanjima procjenjuje kako su na godišnjoj razini djeca izložena čak i do 70 000 - 80 000 PMP i PNP godišnje, dok su odrasli izloženi i većim količinama PMP i PNP od otprilike 100 000 - 120 000 čestica godišnje. U novijim je istraživanjima iznesena i poražavajuća činjenica kako broj PMP i PNP u jednokratnim plastičnim bocama za vodu različitih proizvođača doseže i do 300 000 PMP i PNP po boci, dok se donedavno smatralo kako je taj broj i do 100 puta manji (9). S obzirom na ta novija saznanja, može se pretpostaviti i kako bi ljudi mogli biti izloženi znatno većem broju PMP i PNP. Velike razlike u navedenim procjenama moguće je pojasniti činjenicom kako se analitičke metode za kvantifikaciju PMP i PNP još uvijek razvijaju te vremenom postaju sve preciznije i osjetljivije.

Tvrđnje kako izloženost plastici u okolišu, svakodnevnom životu te konzumacijom hrane i pića predstavlja značajan problem za ljudsko zdravlje podupiru i brojne studije koje su dokazale prisutnost mikro- i nanočestica različitih polimera u ljudskom organizmu (3,10). Iako je prisutnost PMP i PNP u humanom fecesu dokazana u nekoliko različitih studija (11,12), konkretne potvrde o njihovoj apsorpciji iz probavnog sustava nije bilo do studije objavljene 2022. godine u kojoj je prisutnost PMP i PNP različitih polimera dokazana u 17 od 22 uzorka krvi dobrovoljaca (13). Osim u fecesu i krvi, PMP i PNP pronađene su u različitim humanim uzorcima i tkivima, primjerice urinu (14), 26 od 34 uzorka majčina mlijeka (15), svim ispitanim uzorcima placente (16) te mekonijumu (17), plućima zdravih nepušača (18,19) a ponajviše u uzorcima kose te kože lica i ruku (20). Prisutnost čestica plastičnih polimera potvrđuje tezu brojnih istraživanja kako su glavni putevi izloženosti ljudi PMP i PNP oralni, inhalacijski te dermalni put unosa (21). Među najčešće detektirane plastične polimere u okolišu i humanim uzorcima ubrajaju se polistiren (PS), polipropilen (PP), polietilen (PE) te polietilen-tereftalat (PET) (22). PMP i PNP ovakvih polimera izgrađene su od ugljikovodičnih lanaca iznimno otpornih na kemijsku i enzimsku razgradnju, zbog čega predstavljaju značajan izvor rizika od štetnih utjecaja i na okoliš i na ljudsko zdravlje.

## **1.2. Prisutnost lijekova u okolišu**

Sve češća prisutnost različitih lijekova u okolišu podiže sve veću zabrinutost javnosti i znanstvene zajednice (23). Istraživanja su pokazala kako su među najčešće detektiranim lijekovima u okolišu nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAIL), antikonvulzivi, psihijatrijski lijekovi (antipsihotici, antidepresivi) te spolni hormoni i njihovi derivati (24,25). Lijekovi u okoliš

dospijevaju iz postrojenja za preradu otpadnih voda u kojima se ne razgrađuju u potpunosti, iz kanalizacije, ukoliko se izlučuju iz organizma nepromijenjeni te nepravilnim zbrinjavanjem starih lijekova (26). Različiti su lijekovi u otpadnim vodama, ali i površinskim te podzemnim kopnenim vodama pronađeni u koncentracijskom rasponu od ng/L do µg/L, dok su u morima i oceanima te koncentracije nešto niže, ali i dalje mjerljive (27). S obzirom na najzastupljenije skupine lijekova u okolišu te podatke prikupljene iz brojnih publikacija, u izradu ove disertacije uključeni su paracetamol i ibuprofen kao bezreceptni analgetici i antipiretici te antikonvulziv karbamazepin i antidepresiv fluoksetin.

### *1.2.1. Paracetamol*

Zahvaljujući činjenici kako se u javnosti smatra jednim od lijekova šireg terapijskog raspona te malog broja nuspojava, paracetamol je analgetik i antipiretik najčešće korišten u Sjedinjenim Američkim Državama te jedan od najčešće korištenih u Europi (28,29). U SAD-u se godišnje distribuira više od 28 milijuna doza paracetamola, dok je u periodu od 10 godina u Francuskoj učestalost korištenja paracetamola porasla za 53 % sa otprilike 40 primijenjenih definiranih dnevnih doza (DDD) na 60 DDD na 1000 stanovnika (30,31). Sličan broj DDD na 1000 stanovnika primjenjuje se i u brojnim skandinavskim zemljama, dok je njegova primjena nešto niža u baltičkim i srednjeeuropskim zemljama (32). Neke procjene ukazuju na to da se u Ujedinjenom Kraljevstvu konzumira i do  $3,2 \times 10^9$  tableta paracetamola (55 tableta po osobi godišnje), dok se u Walesu primjeni i do 45 grama paracetamola po stanovniku godišnje (33). Unatoč činjenici kako je razgradnja paracetamola u postrojenjima za preradu otpadnih voda u više slučajeva dokazana kao iznimno učinkovita, paracetamol se redovito detektira u okolišu u kojeg vjerojatno dospijeva iz ljudskih izlučevina te zbog nepravilnog zbrinjavanja lijekova u farmaceutskim tvornicama ili bolnicama (34–36). Tako je paracetamol detektiran u značajnim količinama u rijekama u Ujedinjenom Kraljevstvu (65 µg/L), SAD-u (10 µg/L) te u nešto nižim koncentracijama u ng/L u rijekama Brazila, Švedske, Srbije i Španjolske (37,38). U uzorcima pitke vode iz Francuske detektirano je 211 ng/L paracetamola (31,39). Jedan od glavnih metabolita paracetamola koji nastaje hidrolizom je 4-aminofenol, spoj kojeg se uz paracetamol često detektira u okolišu, a ima dokazano nefrotoksično i teratogeno djelovanje (28,31). S obzirom na brojne dokaze kako kronična izloženost niskim koncentracijama paracetamola kakve su prisutne u okolišu može izazvati štetne

neželjene učinke, brojni autori smatraju kako je potrebno prilikom procjene rizika testiranja prilagoditi upravo takvim uvjetima (31,34,40).

### *1.2.2. Ibuprofen*

Ibuprofen, najčešće prodavani lijek iz NSAIL skupine, molekula je slabo topljiva u vodi koja se u ljudskom organizmu ne metabolizira u potpunosti te se stoga otpušta u okoliš u najvećem dijelu kao nepromijenjena molekula (41,42). Postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda također ne uklanjaju ibuprofen u potpunosti, no važno je napomenuti kako je on biorazgradiv te mu je poluvrijeme raspada u okolišu procijenjeno na 5-32 dana. Takvo kratko poluvrijeme raspada upućivalo bi na to kako ibuprofen ne spada u skupinu postojanih okolišnih onečišćivala, no on se zbog svoje svakodnevne upotrebe velikog broja ljudi te opetovane upotrebe naziva pseudo-postojanim okolišnim onečišćivalom (43-46). Primjerice, prema nekim procjenama, u Poljskoj se godišnje konzumira oko 58 tona ibuprofena, u Ujedinjenom Kraljevstvu otprilike 3 puta više (162 tone), dok se u SAD-u godišnje potroši i do 300 tona ibuprofena (47). Procjena rizika u okolišnim uvjetima, provedena u Danskoj, pokazala je kako su predviđene okolišne koncentracije ibuprofena veće od predviđenih koncentracija koje ne uzrokuju efekte, što potvrđuje kako otpuštanje ibuprofena u okoliš, čak i kod normalne i pravilne primjene, predstavlja značajan rizik za ljudsko zdravlje (48,49). Koncentracije ibuprofena u zabilježene u podzemnim vodama u Europi sežu do 20-30 ng/L, a u površinskim vodama u Grčkoj zabilježene su koncentracije do 67 µg/L. Znatno više koncentracije ibuprofena u površinskim vodama u odnosu na Europu zabilježene su u Aziji, gdje ga u Tajvanu u površinskim vodama ima do 280 µg/L, u Koreji do 414 µg/L, a u Kini i do 1,4 mg/L (50).

### *1.2.3. Karbamazepin*

Karbamazepin spada u skupinu antikonvulziva te se često propisuje u terapiji epilepsije, ali i bipolarnog poremećaja te odnedavno za pomoć kod neuropatskih boli poput trigeminalne neuralgije (51,52). Konzumacija karbamazepina, kao i drugih antikonvulzivnih lijekova, posljednjih je godina u velikom porastu pri čemu se procjenjuje kako se navedeni lijek prepíše i do 3 milijuna puta godišne u Sjedinjenim Američkim Državama te 6 milijuna puta godišnje u dijelovima Južne Amerike i Europe (53). Antikonvulzivni lijekovi detektirani su u vodama gotovo svih kontinenata, a karbamazepin je jedan od najzastupljenijih antikonvulziva u okolišu.

Karbamazepin se u nekim studijama smatra i modelnim potencijalnim postojećim okolišnim onečišćivačem (engl. *persistent organic pollutants*, POPs) zbog niskog stupnja razgradnje u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda (<10 %), kao i otpornosti na biološku i kemijsku razgradnju u okolišu (54). Koncentracije karbamazepina detektirane u različitim vodama u okolišu variraju između koncentracija od 13 ng/L do 20 µg/L (55). Prosječna koncentracija karbamazepina u vodama diljem svijeta procjenjuje se na 11,6 µg/L, dok je u Europi detektirano u prosjeku 12 µg/L (56–58). Prisutnost karbamazepina u okolišu rezultira slučajnim unosom u ljudski organizam, što je dokazala i studija koju su proveli Schapira i suradnici, a u kojoj je karbamazepin detektiran iznad granice detekcije (>1,66 ng/L) u 84 % dobrovoljnih ispitanika, dok je kod njih čak 54 % razina karbamazepina bila iznad granice kvantifikacije (dobrovoljni ispitanici bili su odrasli ljudi bez restrikcija u prehrani) (59). Nužnost ispitivanja ekotoksikološkog profila različitih lijekova, među kojima je i karbamazepin, naglašena je u dokumentima i programima Europske Komisije (60) kao što su „*Strategic Approach to Pharmaceuticals in the Environment*“ (COM/2019/128final) (61) i „*The European Green Deal*“ (62).

#### 1.2.4. Fluoksetin

Fluoksetin je treći najčešće propisivani antidepresiv iz skupine selektivnih inhibitora ponovne pohrane serotonina (engl. *selective serotonin reuptake inhibitor*, SSRI) u Sjedinjenim Američkim Državama gdje se godišnje propiše u terapiji čak i do 27 milijuna puta te je na 20. mjestu liste 200 najpropisivanijih lijekova (63). Osim u terapiji depresije, koristi se i za pomoć kod opsesivno-kompulzivnih i anksioznih poremećaja te poremećaja prehrane i osobnosti (64,65). Procjenjuje se kako se u Europi u posljednjih nekoliko godina primjeni približno 60 definiranih dnevnih doza na 1000 stanovnika (otprilike 6 % stanovništva). Fluoksetin se u okolišu pojavljuje u koncentracijama sličnim dosad opisanim lijekovima (66). U različitim studijama detektirane su slijedeće količine fluoksetina u različitim medijima: do 1,4 µg/L u različitim vodama u svijetu, do 50 ng/L u površinskim vodama u Ujedinjenom Kraljevstvu i drugim dijelovima Europe te između 0,5 i 0,8 ng/L u pitkoj vodi (67,68). Razgradnja fluoksetina u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda (pri čemu su glavni izvori fluoksetina urin ljudi koji ga koriste u terapiji te nepravilno zbrinuti lijekovi) predstavlja značajan izazov te se stoga otpušta nerazgrađen u okoliš u znatnim količinama. Osim fluoksetina, s obzirom na biološku aktivnost i potencijal uzrokovanja štetnih učinaka uslijed slučajne izloženosti, problematičan je i njegov metabolit norfluoksetin (69).



Zbog dokazanih štetnih učinaka koji su utvrđeni rezultatima okolišne procjene rizika provedene prema smjernicama Europske agencije za lijekove (engl. *European Medicines Agency*, EMA) (70) te Europske Komisije (71) u kojima je fluoksetin odabran kao modelni spoj iz skupine SSRI-a, neke države (primjerice Švicarska) već su uključile antidepresive među spojeve koji su prioritetni za praćenje u okolišu (72).

### **1.3. Endokrini disruptori**

#### *1.3.1. Učinci kemikalija na endokrini sustav*

Regulatorne agencije poput Američke agencije za zaštitu okoliša (engl. *United States Environmental Protection Agency*, U.S. EPA) i Europske kemijske agencije (engl. *European Chemicals Agency*, ECHA) definiraju endokrine disruptore kao tvari koje utječu na normalnu funkciju endokrinog sustava te posljedično uzrokuju učinke štetne po zdravlje u organizmima i njihovim potomcima (73,74). Takve učinke endokrini disruptori ostvaruju različitim mehanizmima, uključujući oponašanje ili blokiranje funkcije endokrinih hormona te uzrokovanje disbalansa u njihovoj sintezi, metabolizmu ili prijenosu kroz organizam čime ometaju normalne signalne putove hormona (75,76). Dodatno, regulatorne agencije upozoravaju na neuobičajeno djelovanje endokrinih disruptora u smislu ostvarivanja štetnih učinaka pri vrlo niskim dozama, nelinearnog odnosa doze i učinka te uzrokovanja štetnih učinaka koji se ne zamjećuju kod jedinke koja je endokrinom disruptoru bila izložena već u idućim generacijama (77–79).

Pojačano istraživanje endokrinih disruptora potaknula je takozvana kriza dietilstilbestrola (DES), incident koji je do današnjeg dana jedna od najpogubnijih šteta nanesenih od strane kemikalije u modernoj povijesti (80). DES, sintetski estrogen, od 1930-ih do 1970-ih je godina bio prepisivan trudnicama kako bi se spriječili pobačaji te druge komplikacije u trudnoći. Međutim, već tijekom 1960-ih godina uočeno je kako primjena DES-a korelira sa širokim rasponom teških defekata u potomaka majki koje su primale DES primarno povezanih sa zdravljem reproduktivnog trakta - od neplodnosti do razvoja brojnih karcinoma (81). Štetni učinci DES-a bilježe se još i danas, pri čemu su štetnom djelovanju podložni čak i unuci te praunuci žena koje su u trudnoći uzimale DES. Katastrofa ovakvih razmjera dovela je do rigoroznog testiranja teratogenosti i reproduktivne toksičnosti te endokrino disruptivnih učinaka (82).

Pesticidi, aditivi u plastičnim proizvodima, brojne industrijske kemikalije i lijekovi najčešće su skupine tvari unutar kojih se mogu pronaći endokrini disruptori (73,76,83,84).

Uzimajući u obzir ranije opisana odstupanja od linearnih odnosa doza i odgovora te potencijal da štetne učinke ostvare pri znatno nižim koncentracijama, postaje jasna važnost ispitivanja endokrino disruptivnih učinaka okolišnih onečišćivala kojima su ljudi izloženi svakodnevno i kronično upravo u takvim niskim koncentracijama. Takva izloženost može dovesti do reproduktivnih poremećaja, razvojnih nedostataka, narušavanja funkcije imunosnog sustava te pojave brojnih karcinoma kao što su karcinom prostate, jajnika, maternice ili dojke (85–87). Iz svega navedenog, jasno je kako se procjena rizika endokrinih disruptora prisutnih u okolišu mora prioritizirati kako bi se minimizirala izloženost endokrinim disruptorima regulacijom njihova korištenja te razvojem metodologija za zbrinjavanje takvih kemikalija i razgradnju onih već prisutnih u okolišu (76,88–90).

### *1.3.2. Regulatorne smjernice za ispitivanje endokrinih disruptora*

Važnost kvalitetne procjene rizika izloženosti endokrinim disruptorima i njihovim štetnim učincima na zdravlje spoznale su sve regulatorne agencije za zaštitu okoliša te su u svoje programe uključile i smjernice te zahtjeve za njihovo testiranje (74,75,91). U.S. EPA je tako 1998. razvila te počela primjenjivati program testiranja endokrinih disruptora (*Endocrine disruptor screening programme*, EDSP) koji uključuje niz testova za procjenu endokrino disruptivnih učinaka podijeljenih u 2 razine testiranja (92,93). Razina 1 uključuje *in vitro* i *in vivo* testove za ispitivanje utjecaja kemikalija na signalne puteve hormona endokrinog sustava (estrogena, androgena i tiroidnih hormona). Kemikalijama kojima se potvrde štetni učinci na navedene hormone, u testovima na razini 2 ispituju se učinci na sintezu i transport hormona, ali i na reproduktivnu, odnosno razvojnu toksičnost. Takvi se testovi provode na više generacija animalnih modela pri čemu se ispitivana kemikalija primjenjuje gravidnim ženkama te se procjenjuju utjecaji na zdravlje trudnoće i ploda, ali i na razvoj ploda nakon rođenja. Za razliku od U.S. EPA-e, američka Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) ne izdaje posebne zahtjeve za testiranje endokrinih disruptora, kao niti akcije za već indentificirane endokrine disruptore pa su aditivi poput nonilfenola, bisfenola A, triklosana i ftalata dozvoljeni za korištenje u raznim proizvodima u Sjedinjenim Američkim Državama (94).

ECHA je uključila slične zahtjeve za detekciju i testiranje endokrinih disruptora u program REACH (engl. *Registration, Evaluation, Authorization, and Restriction of Chemicals*) (95,96) što je od iznimne važnosti, uzimajući u obzir da je upravo ECHA glavna organizacija u Europi za

registraciju i evaluaciju različitih kemikalija, čime je procjena endokrine disrupcije uključena u sve takve procese i vodi do znatnog smanjenja rizika. Osim ECHA-e, u Europi je istraživanje endokrinih disruptora pokriveno programom Organizacije za ekonomsku suradnju i razvoj (engl. *Organisation for Economic Co-operation and Development*, OECD) (75,97). OECD je razvio jedan od najdetaljnijih programa za ispitivanje endokrine disrupcije koji uključuje set smjernica za različita *in vitro* i *in vivo* ispitivanja (98,99). Smjernice su dizajnirane i potom validirane kako bi se omogućilo ujednačeno provođenje ispitivanja koja pružaju uvid u interakcije s receptorima za hormone te učinke na niz povezanih krajnjih ishoda sve do reproduktivnih i razvojnih poremećaja. Jedna od ključnih komponenti programa OECD-a su *in vitro* eseji kojima se mogu ispitati afinitet vezanja na receptore, aktivacija ili inhibicija receptora za estrogene, androgene i tiroidne hormone te utjecaj na njihovu sintezu dalje komponente u signalnom putu određenog hormona. *In vivo* smjernice razvijene su za ispitivanje štetnih učinaka na reprodukciju i razvoj ploda, ali i funkciju tiroidnog sustava te spolni razvoj u pubertetu. Dodatno, OECD je u svoj program uklopio i radni okvir za identifikaciju i karakterizaciju putova štetnih ishoda (engl. *adverse outcome pathways*, AOP) koji pružaju strukturirani način za razumijevanje redoslijeda i povezanosti ključnih događaja od izloženosti kemikaliji do ostvarenih štetnih učinaka te pomažu u razvoju strategija za poboljšanje testiranja i interpretacije endokrino disruptivnih učinaka (89,98,100).

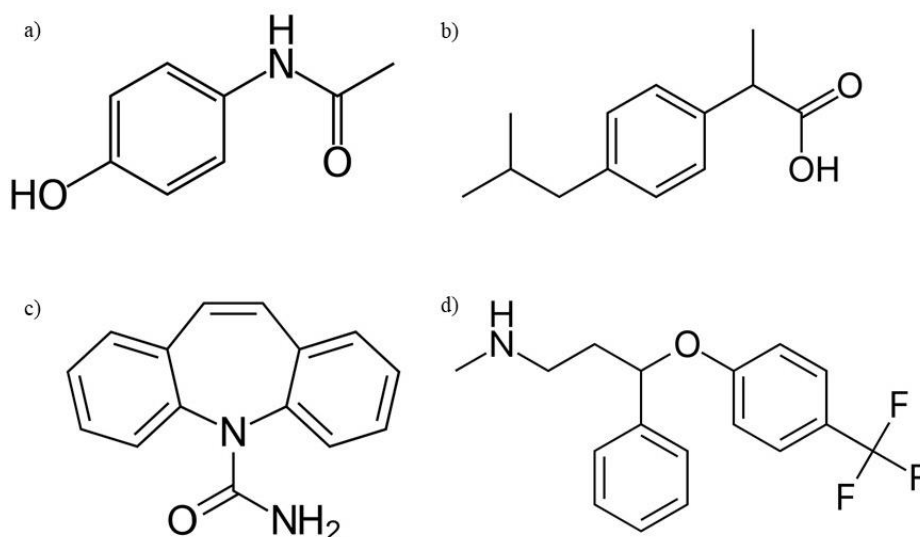
Svjetska zdravstvena organizacija (engl. *World Health Organization*, WHO), kao i UNEP (engl. *UN Environment Programme*) nemaju razvijene programe koji uključuju smjernice za testiranje, ali su prepoznali problem endokrinih disruptora kao jedan od prioritetnih izvora ugroze za ljudsko zdravlje, zbog čega kontinuirano podržavaju druge ranije opisane programe izdavanjem mišljenja temeljenih na znanstvenih dokazima (88,92).

### 1.3.3. Endokrino disruptivno djelovanje odabranih lijekova

Paracetamol, ibuprofen, karbamazepin i fluoksetin izabrani su kao lijekovi koji će biti ispitani prilikom izrade ove disertacije zbog svoje široke rasprotranjenosti u okolišu, ali i znanstveno utemeljenih podataka dostupnih u literaturi koji pokazuju njihov potencijal ostvarivanja endokrino disruptivnih učinaka.

U studiji u kojoj je procijenjen potencijal interakcije za 58 000 kemikalija, opisani su strukturni elementi molekula koji mogu ukazati na povećani rizik od takvih interakcija (101).

Fenolni prsten jedan je od takvih motiva, a u svojoj ga strukturi sadržava paracetamol, dok fluoksetin u strukturi ima kostur dietilstilbestrola (Slika 1).



**Slika 1.** Strukturni prikazi a) paracetamola, b) ibuprofena, c) karbamazepina i d) fluoksetina. Strukturni prikazi lijekova izrađeni su pomoću programa ChemDraw.

Kostur dietilstilbestrola sastoji se od dviju benzenskih jezgri međusobno povezanih i udaljenih 2 C-atoma pri čemu način na koji su povezani može biti različit. Takav element u strukturi zapravo ima i karbamazepin, iako su kod njega dvije benzenske jezgre povezane trećim središnjim prstenom pa ovaj element nije odmah uočljiv. Od 131 kemikalije koja se u toj studiji pokazala aktivnom, njih 84 % sadržavale su fenolni prsten, a njih 23 % kostur DES-a.

Za paracetamol je u radovima prikazano kako utječe na produkciju testosterona (102), sintezu (103) i metabolizam steroidnih hormona (104) te stupa u agonističke i antagonističke interakcije s estrogenskim i androgenim receptorima (105–110). U studiji autora Harnagea-Theophilus i Miller paracetamol je ostvario agonistički učinak prema estrogenskim receptorima (ER) koji je bio izraženiji kod viših, nego kod nižih koncentracija (111).

Ibuprofen također ima dokazane učinke na sintezu i metabolizam steroidnih hormona (112–115), na širu regulaciju prijenosa hormona unutar endokrinog sustava (116), no istraživanja o njegovim interakcijama s estrogenskim ili androgenim receptorima nema. Prema ranije objašnjenim strukturnim svojstvima, ibuprofen je jedini koji ne sadržava konkretne elemente koji bi ostvarili interakciju s ER. Utjecaj ibuprofena na steroidogenezu prethodno je i ispitan na modelnoj staničnoj liniji pri čemu je povisio razine progesterona, a snizio razine estradiola i

testosterona te povećao ekspresiju gena *CYP11*, a smanjio ekspresiju ostalih gena uključenih u proces steroidogeneze (117).

Istraživanja o endokrino disruptivnim učincima fluoksetina pokazuju kako on stupa u agonističke interakcije s ER (118,119), a to je potvrđeno i u *in vivo* eksperimentu u kojem je estrogena aktivnost fluoksetina potvrđena povećanjem mase maternice štakora (120). SSRI generalno, a među njima i fluoksetin, utjecali su na proces steroidogeneze na način da je povećanj omjer estradiola i testosterona, što ukazuje na povećanje aktivnosti aromataze te su generalno uzrokovali smanjenje produkcije testosterona, ponajprije zbog inhibicije enzima CYP17 (121).

Karbamazepin je u istraživanjima pokazao različite učinke prema aktivnosti ER, od antagonističkih do agonističkih (122–124). Kao jedan od njegovih najprominentnijih endokrino disruptivnih učinaka opisan je utjecaj na metabolizam steroidnih hormona, zato što je karbamazepin induktor CYP450 enzima (125–128). Kod ispitivanja utjecaja na steroidogenezu, nisu uočeni učinci karbamazepina na razinu proizvedenih hormona, ali je primjećeno smanjenje ekspresije *CYP11* i *CYP17* gena (129,130). Svi korišteni lijekovi pokazali su određene učinke na aktivnost ER ili općenito signalizacije i regulacije estradiola u organizmu, a većina njih utječe i na proces steroidogeneze. Smjese ovih lijekova nisu ispitane s obzirom na takva endokrino disruptivna svojstva, stoga će ova disertacija pružiti jedan od prvih uvida u njihove interakcije.

#### 1.3.4. Endokrino disruptivni učinci nanočestica plastike

Većina ispitivanja toksičnosti nanočestica plastike fokusirana je na učinke kao što su oksidativni stres, citotoksičnost, imunotoksičnost i genotoksičnost, dok je broj ispitivanja endokrino disruptivnih učinaka vrlo malen (131,132). Čak i kada su prisutna, ispitivanja endokrino disruptivnih učinaka plastike i plastičnih nanočestica uglavnom obrađuju učinke aditiva koji se iz takvih materijala otpuštaju (133). Primjerice, bisfenol A zabranjen je za korištenje zbog iznimne estrogene aktivnosti, ali su određene studije pokazale kako neki uzorci plastike bez bisfenola A ostvaruju i jače estrogene učinke od onih koji ne sadrže bisfenol A (134). Dostupna istraživanja o učincima čestica plastike primarno su fokusirana na učinke mikroplastike u različitim jednostavnim beskralježnjacima, dok su ispitivanja nanočestica plastike gotovo nepostojeća (135–138). Istraživanje koje su proveli Amereh i suradnici (139) opisano je kao prva studija koja ispituje endokrino disruptivne učinke nanočestica polistirena te su zaključili kako se vidi znatna toksičnost koja se očituje kroz promjene u tkivu testisa, ali i produkciji steroidnih hormona te promjenama u

ekspresiji enzima povezanih s njihovom funkcijom. Kod tretmana mikročesticama plastike uočeni su učinci na tiroidni te reproduktivni sustav (140). Uočeno je kako smjese nanoplastike s endokrinim disruptorima i postojećim onečišćivačima uzrokuju disfunkciju štitne žlijezde, smanjene koncentracije T3, a u nekim slučajevima i povišene koncentracije T3 i T4. Kod muškog spolnog sustava uglavnom se navode učinci kao što su smanjene razine produkcije hormona te oštećenje tkiva testisa uzrokovanjem oksidativnog stresa i apoptoze, dok su kod ženskog opisani oštećenje tkiva jajnika istim procesima te uzrokovanje spontanih pobačaja. Osim navedenog, opisano je u literaturi i kako mikročestice plastike mogu potaknuti unos endokrino-disruptivnih kemikalija u organizam i time doprinijeti njihovim toksičnim učincima (141).

#### **1.4. Ispitivanje toksičnih učinaka složenih smjesa - regulatorni okvir i izazovi**

Ispitivanje toksičnosti i procjena rizika u pravilu se provode za pojedinačnu tvar, no u posljednjih desetak godina regulatorne smjernice upućuju na nužnost ispitivanja toksikoloških učinaka složenih smjesa u odnosu na pojedinačne tvari, zbog čega je razvijeno i nekoliko radnih okvira za procjenu potencijalnih učinaka smjesa (142–144). Unatoč tome, broj istraživanja koji se bavi ispitivanjem toksičnosti kompleksnih smjesa, a posebno onih u okolišno relevantnim uvjetima, još je uvijek nedovoljan. Razlog tome je činjenica da su eksperimenti koji uključuju procjenu toksičnih učinaka smjesa opsežni, složeni i dugotrajni.

Ispitivanja toksičnih učinaka smjesa mogu se provoditi primjenom stvarne smjese (primjerice otpadna voda iz okoliša) ili odabirom modelnih smjesa temeljenim na dostupnim podacima (145). Kod ispitivanja stvarne smjese iz okoliša problem je određivanje kompletnog sastava smjese, jer se najčešće radi o iznimno složenom matriksu s velikim brojem analita koje je gotovo nemoguće u potpunosti odvojiti i pojedinačno kvantificirati kako bi se smjesa opisala u potpunosti. S druge strane, kod odabira modelnih smjesa, potrebni parametri poput mehanizma djelovanja te odnosa doze i odgovora nisu jednako dostupni i pouzdani za sve skupine spojeva. Izazovi ispitivanja smjesa prisutni su i nakon odabira dizajna eksperimenta (143,146,147). Naime, vjerojatno je da će komponente smjese stupati u interakcije (bile one aditivne, sinergističke ili antagonističke). Prema najjednostavnijim definicijama, aditivni učinak može se pripisati onim smjesama u kojima pojedinačne komponente imaju isti mehanizam djelovanja te je učinak smjese jednak zbroju učinaka pojedinačnih kemikalija. Sinergizam i antagonizam nisu ovisni o mehanizmu djelovanja lijeka, a podrazumijevaju djelovanje koje je jače, odnosno slabije u

usporedbi sa aditivnim učinkom koji se smatra temeljnom pretpostavkom. Sinergističke ili antagonističke interakcije mogu se ostvariti međusobnim utjecajem komponenti na toksikokinetička (apsorpcija, metabolizam, izlučivanje) ili toksikodinamička svojstva (interakcije s receptorima, učinci na molekulskoj razini). Dodatni je izazov i odabir ostalih eksperimentalnih uvjeta kako bi se izloženost smjesi kemikalija odradila na način da bude što sličnija realnoj izloženosti. U tom smislu, valja pripaziti na vrijeme izloženosti (akutno/subkronično/kronično), o tome treba li kemikalije dodavati sekvencijalno ili u isto vrijeme (npr. sekvencijalno se koristi kod ispitivanja postojećih okolišnih onečišćivala koja su karakterizirana znatnom bioakumulacijom) te da se u obzir uzmu svi najčešći i najvjerojatniji putevi unosa, a ne samo jedan.

Nakon pravilnog dizajna eksperimenta i dobivenih rezultata, analiza podataka kojom se ispituje je li učinak neke smjese aditivni, sinergistički ili antagonistički iznimno je kompleksna te su vrlo često potrebne značajne prilagodbe za svaki novi tip sustava koji se ispituje (148). Uglavnom se prilikom analize koriste adicija koncentracije ili nezavisna akcija. Za određene skupine kemikalija, kao što su pesticidi, uvedene su i drukčije metodologije kakva je i određivanje relativnog faktora potencije (engl. *relative potency factor*, RPF). Odabir ispravnog modela ovisi o broju komponenti smjese, prikladnosti podataka za obradu takvim modelom te vještinu analitičara koji treba model znati i prilagoditi na određene načine. Situacija se dodatno komplicira kad se radi sa smjesama u okolišno relevantnim koncentracijama ili kada se ispituje toksičnost smjesa kemikalija koje nemaju linearni odnos doze i odgovora (149–151). Okolišno relevantne koncentracije najčešće su vrlo niske te pojedinačna tvar najčešće ne ostvaruje primjerice koncentracija koja uzrokuje 50 % odgovora ( $EC_{50}$ ) što onemogućuje korištenje većeg broja modela koji takav parametar zahtijevaju. Problem kod nelinearnih odnosa doze i odgovora proizlazi iz činjenice kako je prilikom analize rezultata teško procijeniti što je točno uzrokovalo sinergističke ili antagonističke učinke (koje doze, koje kombinacije) jer zbog svoje nelinearnosti njihov odgovor ne slijedi monotonu logiku. Povećanjem broja komponenti u smjesi, postaje sve teže procijeniti zajedničke učinke u potpunosti jer učinak smjese ovisi o koncentracijama pojedinačne tvari, omjerima koncentracija tvari u smjesi, kao i sastavu smjese.

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Nanočestice plastike različitih polimera, kao i različiti lijekovi, u modernom svijetu postaju učestala okolišna onečišćivala. Stoga je razumijevanje njihove interakcije s ljudskim organizmom, kao i utjecaja na ljudsko zdravlje od iznimne važnosti i sve je češća tematika znanstvenih istraživanja. Unatoč brojnim istraživanjima u čijem su središtu neželjeni učinci nanočestica plastike ili lijekova, njihov je učinak na endokrini sustav nedovoljno istražen. Dodatno, istraživanja štetnosti tvari koje dopijevaju u okoliš provode se uglavnom pojedinačno za svaku tvar, a vrlo rijetko se u obzir uzimaju učinci smjesa tih tvari, unatoč činjenici kako prisutnosti tvari u smjesama mogu znatno promijeniti profil njihove toksičnosti. Stoga je, kako bi se mogla odraditi kvalitetna procjena rizika okolišnih onečišćivala, nužno istražiti njihove učinke u okolišno relevantnim koncentracijama te ispitati učinke složenih smjesa tih onečišćivala.

Osnovna hipoteza ovog doktorskog istraživanja jest da postoje značajne razlike utjecaja smjesa nanočestica plastike i odabranih lijekova na aktivnost ER i steroidogenezu u humanim stanicama u odnosu na učinke koje ostvaruju pojedine komponente smjese. Glavni je cilj ovog doktorskog istraživanja utvrditi pojedinačne učinke nanočestica plastike i odabranih lijekova na aktivaciju ER i steroidogenezu u humanim staničnim kulturama te usporediti učinke pojedinačnih sastavnica s učincima smjesa nanočestica plastike i/ili lijekova.

Predloženo doktorsko istraživanje temelji se na primjeni modelnog sustava kako bi se ostvario glavni postavljeni cilj. Komponentne modelnog sustava čine 2 stanične linije za ispitivanje endokrino disruptivnih učinaka (T47D-KBluc i NCI-H295R), 3 vrste nanočestica plastike (PsNP, PpNP i PeNP) te 4 lijeka (paracetamol, ibuprofen, karbamazepin i fluoksetin). U svrhu ostvarenja glavnog cilja doktorskog istraživanja, postavljeni su sljedeći specifični ciljevi:

1. odrediti odnos doze pojedinačnih nanočestica plastike i lijekova te njihovih smjesa i preživljenja stanica;
2. analizirati unos nanočestica plastike u stanice;
3. ispitati učinak pojedinačnih nanočestica plastike i lijekova te njihovih smjesa na aktivaciju ER koristeći staničnu liniju T47D-KBluc;
4. izmjeriti promjene u ekspresiji gena te kvantificirati produkte steroidogeneze u NCI-H29R stanicama nakon tretmana pojedinačnim komponentama te njihovim smjesama.



### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Karakterizacija nanočestica

Nanočestice polistirena promjera 25 nm (PsNP; 10500 mg/L) korištene pri provedbi istraživanja komercijalno su nabavljene od tvrtke Phosphorex (Hopkinton, SAD). Nanočestice polietilena promjera 350 nm (PeNP; 82 mg/L) te nanočestice polipropilena (PpNP; 41 mg/L) pripravljene su u Saveznom zavodu za istraživanje i ispitivanje materijala (njem. *Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung*, BAM, Berlin, Njemačka) prema ranije opisanoj proceduri (152). U navedenom je istraživanju opisana procedura pripreme nanočestica polipropilena, a za pripremu nanočestica polietilena korišten je identičan postupak sa drugim početnim sirovinama. PeNP i PpNP pripremaju se u BAM-u s ciljem razvoja referentnih polimernih nanočestica za ispitivanje svojstava materijala te su nam ljubazno ustupili količinu potrebnu za odrađivanje istraživanja endokrino disruptivnih učinaka. Za razliku od PsNP koje su široko komercijalno dostupne u različitim veličinama i sa brojnim modifikacijama površine, PeNP i PpNP znatno su manje dostupne, zbog čega su vrlo rijetko zastupljene u znanstvenim istraživanjima u odnosu na PsNP.

Fizikalno-kemijska karakterizacija nanočestica plastike provedena je u svrhu određivanja njihova oblika, raspodjele veličina te procjene stabilnosti PNP u eksperimentalnim uvjetima. Karakterizacija PNP provedena je u ultračistoj vodi te staničnom mediju.

Za vizualizaciju PNP te određivanje njihove primarne veličine ( $d_{\text{TEM}}$ ) i stupnja agregacije korištena je tehnika transmisijske elektronske mikroskopije (TEM). TEM spada među najčešće korištene tehnike u nanotehnologiji te se uspješno primjenjuje ispitivanje svojstava različitih tipova nanomaterijala (153,154). Priprema uzoraka za ovu tehniku provedena je tako da su suspenzije PNP razrijeđene u staničnom mediju s 5 % fetalnog goveđeg seruma pročišćenog ugljenom te je 5  $\mu\text{L}$  takvog uzorka nanoseno na bakrene mrežice obložene Formvar<sup>®</sup> polimerom (SPI Supplies, Westchester, SAD) te su ostavljene preko noći kako bi se osušile na zraku. Snimanje je odrađeno na instrumentu JEOL JEM 1010 (JEOL, Tokio, Japan) postavljen u način rada sa svijetlim poljem te je korišten napon od 80 kV. Slike su snimljene koristeći kameru Canon PowerShot S50 (Canon, Tokio, Japan).  $d_{\text{TEM}}$  označava primarnu veličinu čestice bez njene solvacijske ljuske. Ukupno je izmjeren promjer najmanje 60 nanočestica za svaku pojedinu vrstu PNP korištenjem programa ImageJ 1.53k (155).

Hidrodinamički promjer ( $d_H$ ) i raspodjela veličina PNP određeni su metodama dinamičkog raspršenja svjetlosti (engl. *dynamic light scattering*, DLS), dok je zeta ( $\zeta$ ) potencijal određen metodom elektroforetskog raspršenja svjetlosti (engl. *electrophoretic light scattering*, ELS).  $d_H$  se može definirati kao promjer nanočestice koji uključuje i njezinu solvacijsku ovojnici koja se u mediju giba zajedno s nanočesticom. Princip rada metode temelji se na detekciji svjetlosti raspršene sa čestica prisutnih u suspenziji (156). Unatoč činjenici da  $d_H$  ne prikazuje stvarnu veličinu nanočestice, njegovo određivanje, kao i poznavanje raspodjele veličina nanočestica važno je kako bi se moglo opisati i predvidjeti njihovo ponašanje u eksperimentalnim uvjetima. Suspenzije PNP razrijeđene su u ultračistoj vodi i potpunom staničnom mediju do koncentracije od 10 mg/L. Volumen od 1 mL uzorka prenesen je automatskom pipetom u jednokratnu plastičnu kivetu (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka). Uzorci PNP pripremljeni razrjeđivanjem istih u potpunom staničnom mediju ispitani su u dvije vremenske točke: odmah nakon pripreme suspenzije ( $t = 0h$ ) te nakon 48-satne inkubacije na  $37^\circ C$  kako bi se oponašali uvjeti eksperimenta na staničnim kulturama. Veličina NP dobiva se iz raspodjele po intenzitetu te se izražava kao prosječna vrijednost 6 mjerenja. S obzirom na to da je DLS neinvazivna tehnika koja ne oštećuje uzorak, pripremljeni je uzorak nakon mjerenja prenesen u posebne kivete za ELS mjerenja (Malvern Instruments, Malvern, UK) kako bi se odredio  $\zeta$  potencijal PNP. Metoda se temelji na određivanju elektroforetske pokretljivosti nanočestica, a poznavanje  $\zeta$  potencijala važno je za predviđanje elektrostatske stabilizacije i specifičnih interakcija nanočestica u suspenzijama (157).  $\zeta$  potencijal je potencijal na plohi smicanja električnog dvosloja koji je prisutan u otopini oko nabijene čestice, a ovisi o površinskom naboju nanočestice te svojstvima otopine koja okružuje nanočesticu. Ukoliko nanočestice u suspenziji posjeduju  $\zeta$  potencijal istog predznaka te apsolutne vrijednosti veće od 20 mV moguće je pretpostaviti kako su elektrostatski stabilizirane, a  $\zeta$  potencijal može utjecati i na njihove interakcije sa stanicama (158). Vrijednosti  $\zeta$  potencijala izračunate su iz izmjerenih elektroforetskih pokretljivosti prema Henryjevoj jednadžbi koristeći Smolchowskowljevu aproksimaciju te su prikazani kao uprosječena vrijednost triju uzastopnih mjerenja. Sva mjerenja  $d_H$  i  $\zeta$  potencijala odrađena su pomoću Zetasizer Ultra instrumenta (Malvern Panalytical, Malvern, UK) pri temperaturi od  $25^\circ C$ , a rezultati su obrađeni u programskom paketu ZS Explorer 3.21 (Malvern Panalytical, Malvern, UK).

### 3.2. Priprema otopina lijekova i kontrolnih spojeva

U svrhu ispitivanja endokrino disruptivnih učinaka, korišteni su paracetamol (kat. broj: A7085), ibuprofen (kat. broj: I4883), karbamazepin (kat. broj: C4024) i fluoksetin hidroklorid (kat. broj: F0253000) nabavljeni iz Sigmee Aldrich (Darmstadt, Njemačka). Temeljne standardne otopine ispitivanih lijekova pripravljane su prilikom provedbe eksperimenata u koncentracijama od 0,1 mol/dm<sup>3</sup> otapanjem u dimetilsulfoksidu (DMSO, kat. broj: 04532 01) nabavljenom od tvrtke Kemika (Zagreb, Hrvatska). Radne otopine korištene za tretmane stanica uvijek su pripravane kao 10 puta koncentriranije od željene završne koncentracije u jažici kako bi se izbjeglo značajno razrjeđenje kompletnog staničnog medija koje može naštetiti preživljenju stanica. Prethodno tretiranju staničnih kultura, sve su radne otopine terminalno sterilizirane korištenjem sterilnih filtera od celuloznog acetata (CA) s veličinom pore od 0,22 µm (Filter-Bio, Nantong City, Kina). Iznimno su za tretmane NCI-H295R stanica prilikom ispitivanja utjecaja na proces korištene nerazrijeđene temeljne standardne otopine dekontaminirane sterilnim filterima od politetrafluoretilena (PTFE), također veličine pore od 0,22 µm (Filter-Bio, Nantong City, Kina). Ovakav način sterilizacije otopina uklanja potencijalno prisutne bakterijske i virusne kontaminacije, kao i gljivice te njihove spore.

U svrhu ispitivanja učinaka kemikalija na aktivnost ER korišteni su 17β-estradiol (E2, kat. broj: E2758) i dietilstilbestrol (DES, kat. broj: D4628) kao tretmani za pozitivne kontrole te fulvestrant (FLV, kat. broj: I4409) kao tretman za negativnu kontrolu. Sve tri kontrolne kemikalije nabavljene su od tvrtke Sigma Aldrich. Temeljne standardne otopine pripravljene su otapanjem u etanolu (kat. broj: 05056 01; Kemika, Zagreb, Hrvatska) u koncentraciji od 0,1 mol/dm<sup>3</sup>. S obzirom na slabiju topljivost kontrolnih spojeva u odnosu na ispitivane spojeve, radne otopine pripravljene su na način da je temeljna standardna otopina prvo razrijeđena u 2 koraka u omjeru 1:100 u etanolu, a nakon toga u još 2 koraka u omjeru 1:10 u vodi čime je dobivena radna otopina koja je dodavana u jažice. Radne otopine sterilizirane su na ranije opisani način.

Smjernica za ispitivanje utjecaja kemikalija na proces steroidogeneze propisuje forskolin (FOR, kat. broj: 93049) kao pozitivnu kontrolu (induktor steroidogeneze) te prokloraz (PRO, kat. broj: 45631) kao negativnu kontrolu (inhibitor steroidogeneze). Obje kemikalije nabavljene su od tvrtke Sigma Aldrich. Smjernica također detaljno opisuje i proces pripreme temeljne standardne

otopine, kao i radnih otopina navedenih kontrola. Temeljna standardna otopina forskolina (0,1 mol/dm<sup>3</sup>) pripremljena je odvagom 4,1050 miligrama kemikalije pomoću analitičke vage te otapanjem u 100 µL DMSO-a. Radna otopina (1 mmol/dm<sup>3</sup>) pripremljena je razrjeđivanjem temeljne standardne otopine u 2 koraka u omjerima 1:10 u DMSO-u. Temeljna standardna otopina prokloraza (0,1 mol/dm<sup>3</sup>) pripremljena je odvagom 3,7667 miligrama kemikalije pomoću analitičke vage te otapanjem u 100 µL DMSO-a. Radna otopina (0,1 mmol/dm<sup>3</sup>) pripremljena je razrjeđivanjem temeljne standardne otopine u 3 koraka u omjerima 1:10 u DMSO-u.

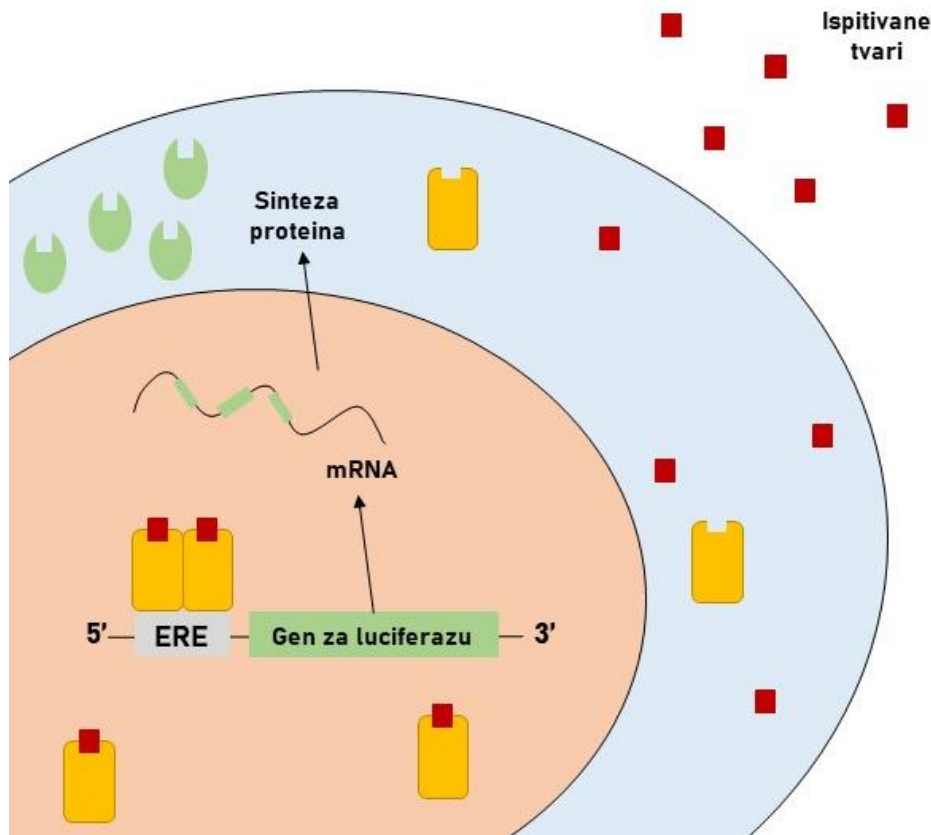
### **3.3. Karakteristike, uzgoj i održavanje staničnih linija**

Stanične linije T47D-KBluc te NCI-H295R odabrane su kao modelni sustavi za ispitivanje širokog spektra endokrino disruptivnih učinaka PNP i odabranih lijekova. Obje odabrane stanične linije humanog su podrijetla te su opisane od strane regulatornih agencija (U.S. EPA, OECD) kao relevantni modeli za ispitivanje utjecaja kemikalija na reproduktivne funkcije endokrinog sustava.

#### *3.3.1. Stanična linija T47D-KBluc*

T47D-KBluc (ATCC oznaka CRL-2865) stanična je linija koja stabilno eksprimira reporterski gen luciferazu kao element odgovora aktivaciju ER. Stanična linija razvijena je i detaljno okarakterizirana od strane Wilson i suradnika (159) stabilnom transfekcijom genskog konstrukta reporterskog gena za luciferazu u staničnu liniju T47D. Stanice T47D epitelne su stanice izolirane iz pleuralnog izljeva 54-godišnje pacijentice s duktalnim karcinomom mliječne žlijezde te ih odlikuje prirodna stabilna ekspresija ER  $\alpha$  i  $\beta$  (160,161). Razvoj *in vitro* testova koji koriste reporterske gene od iznimne je važnosti, zato što takvi eseji predstavljaju selektivne sustave visokog odziva na aktivaciju ER te su jedna od bržih i jednostavnijih metoda za ispitivanje agonističkih, ali i antagonističkih učinaka različitih vrsta tvari na aktivnost ER (162). Molekulski mehanizam kojim se može detektirati afinitet tvari da utječe na aktivnost ER započinje ulaskom ispitivane tvari u stanicu gdje će se, ukoliko je ligand za ER, vezati na njega. Kada se na dva ER vežu ligandi, takvi će receptori dimerizirati te se u jezgri vezati na element odgovora na estrogen (engl. *estrogen responsive element*, ERE) na konstruktu reporterskog gena i aktivirati ekspresiju gena za luciferazu (Slika 2). Prisutnost sintetiziranog enzima luciferaze potvrđuje se dodatkom

supstrata luciferina te odgovarajućih koenzima pri čemu dolazi do pojave luminiscencije. Jačina izmjerenog luminiscentnog signala proporcionalna je aktivnosti ER.



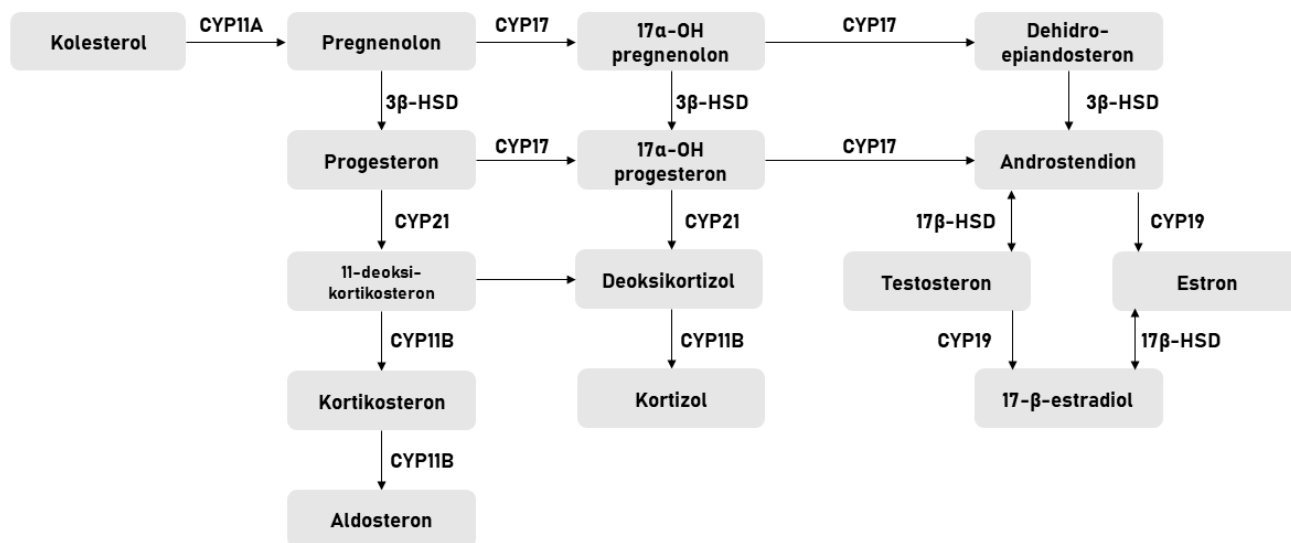
**Slika 2.** Shematski prikaz vezanja liganda na estrogenski receptor i aktivacije kaskadnog procesa koji rezultira produkcijom enzima luciferaze u staničnoj liniji T47D-KBluc. Shematski prikaz izrađen je u programu Microsoft PowerPoint.

Stanična linija T47D-KBluc nabavljena je iz banke stanica ATCC (engl. *American Type Culture Collection*) te je stanična kultura uspostavljena otapanjem originalne vijale stanica i njihovim nasađivanjem u T-25 flasku (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka). Stanice su uzgajane u potpunom staničnom mediju koji se sastoji od medija RPMI-1640 (kat. broj: R8758, Sigma Aldrich), 10 % volumnog udjela fetalnog goveđeg seruma (engl. *fetal bovine serum*, FBS; kat. broj: F0679, Sigma Aldrich), 1 % volumnog udjela otopine antibiotika i antimikotika (kat. broj: A5955, Sigma Aldrich) te 0,2 IU/mL goveđeg inzulina. Stanice su nakon odmrzavanja uzgajane korištenjem istog staničnog medija, ali u staničnim flaskovima T-75 (Sarstedt, Nümbrecht,

Njemačka) do pasaže 10 kako bi se osigurala odgovarajuća stabilnost ekspresije ER te su za eksperimente korištene između pasaža 10 i 25.

### 3.3.2. Stanična linija NCI-H295R

NCI-H295R (ATCC oznaka CRL-2128) epitelna je stanična linija nastala modifikacijom stanične linije NCI-H295 izolirane iz tumora kore nadbubrežne žlijezde 48-godišnje pacijentice. Izniman značaj ove stanične linije u ispitivanju utjecaja kemikalija na proces sinteze steroidnih hormona proizlazi iz činjenice da su u NCI-H295R stanicama eksprimirani svi enzimi koji sudjeluju u procesu steroidogeneze te je moguće kvantificirati sve C<sub>19</sub> i C<sub>21</sub> steroidne hormone koji nastaju u spomenutom procesu (Slika 3).



**Slika 3.** Shematski prikaz procesa steroidogeneze. Slika je prilagođena prema prikazu steroidogeneze iz OECD smjernice broj 456 (163) i izrađena u programu Microsoft PowerPoint.

U *in vivo* uvjetima, ovakvu je ekspresiju enzima gotovo nemoguće pronaći, zato što su i ekspresija enzima, kao i produkcija hormona tkivno- i razvojno-specifični procesi, odnosno ne odvijaju se u istim tkivima niti u istim fazama razvoja (164). Stoga je jedinstveno svojstvo NCI-H295R stanica da se ponašaju kao zonalno nediferencirane humane fetalne adrenalne stanice koje mogu producirati sve steroidne hormone koji inače nastaju u svim zonama kore nadbubrežne

žlijezde te u gonadama, odnosno omogućuju ispitivanje učinaka tvari na sintezu spolnih, ali i kortikosteroidnih hormona (165,166). Osim učinaka na sintezu steroidnih hormona, moguće je utvrditi i promjene u ekspresiji gena koji kataliziraju reakcije uključene u proces steroidogeneze (167,168), čime stanična linija NCI-H295R omogućuje uvid u potencijalne molekulske mehanizme kojima određene tvari utječu na proces steroidogeneze.

Stanična kultura NCI-H295R uspostavljena je otapanjem originalne vijale stanica nabavljene iz banke stanica ATCC. Kompletni stanični medij sačinjen je od medija DMEM:F12 (kat. broj: D6421, Sigma Aldrich) sa 2,5 % volumnog udjela FBS-a (kat. broj: F0679, Sigma Aldrich), 1 % volumnog udjela otopine penicilina i streptomicina (kat. broj: P433, Sigma Aldrich) te 1 % volumnog udjela otopine ITS+ Premix (kat. broj: 354352, Corning, Sommerville, SAD). ITS+ Premix unaprijed je formulirani dodatak za stanični medij te su konačne koncentracije njegovih sastavnica u potpunom staničnom mediju slijedeće: 0,00625 mg/mL humanog inzulina, 0,00625 mg/mL transferina, 6,25 ng/mL selena, 1,25 mg/mL goveđeg serumskog albumina i 0,00535 mg/mL linolne kiseline. Nakon odmrzavanja, stanična linija održavana je uzgojem u T-75 staničnim flaskovima (Sarstedt, Nümbrecht, Njemačka), a za eksperimente su korištene stanice između pasaže 4 i pasaže 10, sukladno uputama iz OECD smjernice 456 koja opisuje proceduru za ispitivanje utjecaja kemikalija na proces steroidogeneze (163).

### **3.4. Ispitivanje preživljenja stanica i indukcije apoptoze**

Kako bi se izbjegli potencijalno nepouzdana rezultati ispitivanja endokrino disruptivnih učinaka odabranih nanočestica i lijekova, prije provođenja eksperimenata bilo je potrebno utvrditi pri kojim koncentracijama korištene nanočestice i lijekovi ostvaruju citotoksični učinak prema staničnim linijama T47D-KBluc i NCI-H295R. Utjecaj paracetamola, ibuprofena, karbamazepina i fluoksetina na preživljenje stanica ispitan je primarno MTS testom, dok je za određene koncentracije ispitana i aktivacija procesa stanične smrti metodom protočne citometrije. Utjecaji PeNP, PpNP i PsNP na preživljenje stanica ispitan su isključivo metodom protočne citometrije zbog potencijalnih interferencija s spektrofotometrijskom metodom kakva je MTS test (169).

### 3.4.1. Ispitivanje utjecaja na preživljenje stanica pomoću MTS testa

MTS test jedna je od najčešće korištenih metoda za ispitivanje utjecaja kemikalija na preživljenje stanica. Metoda se temelji na redukciji žuto obojenog 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolija u smeđe obojeni formazan, što je moguće samo u živim i metabolički aktivnim stanicama (170).

T47D-KBluc i NCI-H295R stanice nasadene su u prozirne pločice s 96 jažica (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) u 100  $\mu\text{L}$  stanične suspenzije koncentracije  $4 \times 10^4$  stanica/mL u ranije opisanim kompletnim staničnim medijima. Nakon što su ostavljene 24 sata u inkubatoru (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) na  $37^\circ\text{C}$  i 5 %  $\text{CO}_2$  kako bi se prihvatile za dno jažice, stanice su tretirane odgovarajućim koncentracijama lijekova. Neposredno prije tretmana stanica iz temeljne standardne otopine svakog od ispitivanih lijekova, pripravljene su slijedeće radne otopine (10x koncentrirane vodene otopine najviše ispitivane koncentracije): 10 mM otopine paracetamola i ibuprofena, 5 mM otopina karbamazepina te 1 mM otopina fluoksetina. Nakon 24-satne inkubacije, stanice su izvađene iz inkubatora, stanični je medij uklonjen, stanice su isprane fiziološkom otopinom puferiranom fosfatnim puferom (engl. *phosphate-buffered saline*, PBS) te je u jažice dodano 100  $\mu\text{L}$  svježeg staničnog medija, odnosno 180  $\mu\text{L}$  medija u jažici koja će biti tretirana najvećom koncentracijom lijeka. U prvu je jažicu dodano 20  $\mu\text{L}$  radne otopine lijeka kako bi se postigla željena koncentracija lijeka (1000  $\mu\text{M}$  za paracetamol i ibuprofen, 500  $\mu\text{M}$  za karbamazepin i 100  $\mu\text{M}$  za fluoksetin), nakon čega je prijenosom 100  $\mu\text{L}$  volumena iz jažice u jažicu postignuto dvostruko serijsko razrijeđenje i uspostavljen konačni korišteni raspon koncentracija. Pozitivna kontrola bile su stanice tretirane sa DMSO-om (volumni udio u jažici 10 %), dok su kao negativna kontrola korištene netretirane stanice, a kao slijepa proba kompletni stanični medij bez stanica. Stanice su potom inkubirane 48 sati na  $37^\circ\text{C}$  i u atmosferi s 5 %  $\text{CO}_2$  kako bi se ispitali utjecaji spojeva na preživljenje stanica u eksperimentalnim uvjetima relevantnim za daljne eksperimente.

Nakon inkubacije s tretmanom, pločica sa stanicama izvađena je iz inkubatora te je uklonjen stanični medij koji sadrži ispitivane lijekove, stanice su isprane 2 puta PBS-om i dodano je 100  $\mu\text{L}$  svježeg staničnog medija. MTS test provodi se pomoću komercijalno dostupnog kita CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, Madison, SAD). Navedeni kit



sadrži unaprijed pripremljene sterilne otopine MTS reagensa te otopinu fenazin metosulfata (engl. *phenazine methosulfate*, PMS) koji služi kao reagens za prijenos elektrona. Navedene otopine pomiješane su u omjeru 20:1 u korist MTS-a. Kada je reagens u potpunosti pripremljen miješanjem dvaju otopina, dodano je 20  $\mu$ L otopine u svaku jažicu te inkubirati pločicu na 37°C i 5 % CO<sub>2</sub> od 1 do 4 sata, ovisno o brzini formiranja boje u jažicama. Svi procesi opisani u pripremi uzoraka za ovaj test provedeni su u kabinetu za laminarni protok zraka kako bi se osigurala sterilnost postupka. Nakon završetka inkubacije, izmjerena je apsorbancija na valnoj duljini 490 nm pomoću čitača mikrotitarskih ploča Victor3 (Perkin Elmer, Waltham, SAD).

### *3.4.2. Ispitivanje aktivacije apoptoze protočnom citometrijom*

Korištenjem protočne citometrije uz pravilan odabir protutijela i/ili staničnih boja moguće je analizirati prisutnost brojnih proteina na površini ili u unutrašnjosti stanice. Za ispitivanje aktivacije procesa stanične smrti metodom protočne citometrije koriste se protutijelo aneksin V na koji je vezan fluorescein izotiocijanat (FITC) te boja propidij jodid (PI). Aneksin V protutijelo je koje se veže na fosfatidilserin, protein koji se u normalnim stanicama nalazi s unutrašnje strane stanične membrane, dok je njegova translokacija na vanjsku stranu stanične membrane igra ključnu ulogu u signalizaciji apoptoze. Aneksin V-FITC ne ulazi u žive, neoštećene stanice jer ne može preći cjelovite stanične membrane pa obilježava samo stanice u kojima je započet proces apoptoze. PI je fluorescentna interkalirajuća boja koja se ugrađuje u dvolančanu DNA isključivo nekrotičnih stanica kojima je integritet stanične membrane toliko narušen da PI uspijeva ući u jezgru stanice. Analizom aktivacije apoptoze protočnom citometrijom, moguće je stanice odrediti postotak živih (potpuno neobilježene), rano apoptotičnih (pozitivne na FITC), kasno apoptotičnih (pozitivne na FITC i PI) te nekrotičnih (pozitivne na PI) stanica u ukupnom broju stanica u uzorku.

Za provođenje ovog eksperimenta, stanice su nasadene u prozirne pločice sa 12 jažica (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) u 1 mL kompletnog staničnog medija za odgovarajuću staničnu liniju pri koncentraciji od  $1 \times 10^5$  stanica/mL. Nakon što su bile inkubirane 24 sata na 37°C i 5 % CO<sub>2</sub>, stanični medij zamijenjen je sa 900  $\mu$ L staničnog medija uz prethodno ispiranje sa 500  $\mu$ L PBS-a. Stanice su potom tretirane radnim otopinama nanočestica i lijekova te kontrolnim spojevima. Kao kontrolni spojevi koriste se staurosporin (kat. broj: 569396, Sigma Aldrich) kao pozitivna kontrola za apoptotične stanice te DMSO pri volumnom udjelu od 10 % u jažici kao

pozitivna kontrola za nekrotične stanice. Kao negativna kontrola korištene su stanice kod kojih je u jažice dodano 100  $\mu$ L sterilne destilirane vode.

Nakon 48-satne inkubacije s tretmanima na 37°C i 5 % CO<sub>2</sub>, stanični medij iz jažica prikupljen je u prikladno označene tubice od 2 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) te su stanice isprane 2 puta sa 1 mL PBS-a. Nakon toga su stanice odlijepljene od podloge dodatkom 300  $\mu$ L tripsin-etilendiamintetraoctena kiselina (tripsin-EDTA) otopine. Stanice su inkubirane dok provjerom pod mikroskopom nije utvrđeno kako su se sve stanice odvojile od podloge. Nakon toga je u svaku jažicu dodano 500  $\mu$ L kompletnog staničnog medija te su tako pripravljene suspenzije stanica pridružene ranije prikupljenim supernatantima staničnog medija. Stanice su potom centrifugirane 5 minuta pri 800 $\times$ g te je supernatant uklonjen, a stanice su resuspendirane u 800  $\mu$ L PBS-a te ponovno centrifugirane 5 minuta pri 800 $\times$ g. Priprema uzoraka u slijedećim koracima odrađena je prema uputama iz paketa reagensa Annexin V:FITC Assay (kat. broj: ANNEX300F, Bio-Rad, Hercules, SAD). Nakon centrifugiranja, uzorci su resuspendirani u 195  $\mu$ L pufera za bojanje (engl. *staining buffer*) razrijeđenog prema uputama iz kita te je dodano 5  $\mu$ L reagensa Annexin V-FITC. Uzorci su inkubirani 10 minuta na sobnoj temperaturi u potpunom mraku. Nakon inkubacije, uzorcima je dodano 800  $\mu$ L pufera za bojanje te su centrifugirani na 800 $\times$ g. Supernatanti su ponovno odbačeni, a stanice su resuspendirane u 190  $\mu$ L pufera za bojanje, dodano je 10  $\mu$ L PI boje te su opet inkubirani u mraku na sobnoj temperaturi 10 minuta. Nakon posljednjeg centrifugiranja u prethodno opisanim uvjetima, stanice su resuspendirane u 300  $\mu$ L PBS-a te su vorteksirane, filtrirane kroz pluriStrainer<sup>®</sup> filter s porama veličine 40  $\mu$ m (kat. broj: 43-57040-51, PluriSelect, Leipzig, Njemačka) i odmah analizirane na uređaju Cytotflex SRT (Beckman Coulter, Brea, SAD). Fluorescencija boje FITC vezane na protutijelo aneksin V pobuđena je laserom valne duljine 488 nm i detektirana na detektoru s emisijskim filtrom 525/40, dok je fluorescencija propidij jodida pobuđena žuto-zelenim laserom valne duljine 561 nm te zabilježena na detektoru sa emisijskim filtrom 585/42. Dobiveni rezultati analizirani su u računalnom programu CytExpert.

### 3.5. Određivanje staničnog unosa različitih plastičnih nanočestica

Stanični unos PsNP, PpNP i PeNP kvantificiran je koristeći stanice T47D-KBluc metodom protočne citometrije mjerenjem intenziteta fluorescencije na detektoru s emisijskim filtrom 525/40. Korištenje upravo ove metode za određivanje parametara staničnog unosa različitih plastičnih nanočestica bilo je moguće zato što su fluorescentno obilježene PsNP komercijalno dostupne, dok su snimljeni fluorescencijski spektri PeNP i PpNP pokazali fluorescencijske pikove na 523 i 524 nm te ih je također moguće uočiti na korištenom detektoru (Slika 32). Svojstvo autofluorescencije PeNP i PpNP moguće je pripisati ketonskim skupinama uočenima prilikom ispitivanja svojstava površine nanočestica s obzirom na starenje i promjene koje prolaze prilikom same pripreme metodom fotoelektronske spektroskopije X-zraka (Slika 33).

T47D-KBluc stanice nasađene su u prozirne pločice sa 12 jažica (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) u 1 mL kompletnog staničnog medija pri koncentraciji od  $1 \times 10^5$  stanica/mL. Nakon što su bile inkubirane 24 sata na 37°C i 5 % CO<sub>2</sub>, stanični medij zamijenjen je sa 900 µL vježeg staničnog medija uz prethodno ispiranje sa 500 µL PBS-a. Stanice su potom tretirane radnim otopinama PsNP, PpNP i PeNP te njihove smjese. Negativne kontrole tretirane su odgovarajućom količinom sterilne vode kako bi oponašale uvjete. Nakon inkubacije od 48 sati, stanični medij je odbačen, stanice su isprane tri puta PBS-om te odlijepljene od podloge inkubacijom sa 300 µL tripsin-EDTA otopine. Nakon što su se odlijepile od podloge, stanicama je dodano 500 µL kompletnog staničnog medija. Stanice su potom centrifugirane na 800×g te su supernatanti odbačeni, a stanice resuspendirane u 300 µL PBS-a, filtrirane kroz ranije spomenute pluriStrainer® filter s porama veličine 40 µm i analizirane na CytOflex SRT uređaju. Izmjereni su medijani intenziteta fluorescencije negativnih kontrola te tretiranih stanica na detektoru 525/40. Rezultati su obrađeni u CytExpert računalnom programu.

### 3.6. Ispitivanje aktivacije estrogenskih receptora

Aktivacija ER ispitana je sukladno protokolima opisanima prilikom razvoja i karakterizacije korištene stanične linije T47D-KBluc (159), kao i OECD smjernice broj 455 (171). Prethodno početku eksperimenta, stanice su prošle period pre-inkubacije od 7 dana u kojem su

umjesto u ranije opisanom kompletnom staničnom mediju bile uzgajane u mediju koji sadrži medija RPMI-1640 (kat. broj: R8758, Sigma Aldrich), 10 % volumnog udjela FBS-a pročišćenog aktivnim ugljenom (kat. broj: F6765), 1 % volumnog udjela otopine antibiotika i antimikotika (kat. broj: A5955, Sigma Aldrich) te 0,2 IU/mL goveđeg inzulina (kat. broj: I056, Sigma Aldrich). Aktivnim ugljenom pročišćeni FBS koristi se kako bi se uklonile interferencije hormona prisutnih u običnom, nepročišćenom FBS-u, a koje mogu dati lažno pozitivne rezultate. Prethodno eksperimentima sa PNP i lijekovima, prikladnost sustava ispitana je tretmanom stanica sa dvama agonistima 17- $\beta$ -estradiolom i dietilstilbestrolom te antagonistom fulvestrantom. Osim prikladnosti sustava, ispitane su i interferencije svih komponenti prisutnih u lizatu stanica na način da je reagens dodan u otopinu ili suspenziju takve komponente, ali bez stanica. Sustav je ispitivan na prisutnost interferencija ponajprije zbog nanočestica plastike za koje je trebalo provjeriti uzrokuju li same raspršenje svjetlosnih signala i time lažno pozitivne rezultate. Nakon što su potvrđeni funkcionalnost stanične linije (slika 34) prema uvjetima opisanim u OECD smjernici TG 455 (omjer luminescentnih signala pozitivnih kontrola i netretiranih stanica je bio veći od 4) te izostanak interferencija (slika 35), provedeni su i eksperimenti sa PNP, lijekovima te njihovim kompleksnim smjesama pri čemu je na svakoj pločici kao pozitivna kontrola bio uključen DES u koncentraciji od 10 nM. DES je izabran kao pozitivna kontrola umjesto E2, zato što se njegova otopina pokazala jednostavnijom za pripremu s obzirom na topljivost spojeva i stabilnijom kroz dulje vrijeme te je davala reproducibilnije rezultate u odnosu na otopinu E2.

Nakon 7 dana pre-inkubacije, T47D-KBluc stanice nasađene su u neprozirne Nunc<sup>TM</sup> bijele pločice sa 96 jažica (kat. broj: 136101, Thermo Scientific, Waltham, SAD) u koncentraciji od  $2 \times 10^4$  stanica po jažici u 100  $\mu$ L staničnog medija u kojem je 10 % volumnog udjela aktivnim ugljenom pročišćenog FBS-a smanjeno na 5 % volumnog udjela istog FBS-a. Stanice su inkubirane 24 sata na 37°C i pri 5 % CO<sub>2</sub> kako bi se prihvatile za dno jažice, a po isteku 24 sata, medij je odbačen te je u jažice dodan odgovarajući volumen staničnog medija s 5 % FBS-a pročišćenog aktivnim ugljenom. Kad su stanice tretirane individualnim komponentama, u jažice je dodano 90  $\mu$ L medija, za dvokomponentne smjese 80  $\mu$ L medija, a za trokomponentne smjese 70  $\mu$ L medija. S obzirom na rad sa višekomponentnim smjesama, radne otopine PNP i lijekova za ovaj su eksperiment pripremljene razrjeđivanjem u staničnom mediju, a ne u sterilnoj vodi, kako medij u konačnici ne bi bio previše razrijeđen i time se ostvario citotoksični učinak prema stanicama kroz inkubacijski period od 48 sati.

Nakon 48-satne inkubacije s tretmanima na 37°C i 5 % CO<sub>2</sub>, stanični je medij odbačen, a stanice su isprane dva puta sa po 100 µL PBS-a. Nakon toga, priprema uzoraka odrađena je po uputama iz kita sa luciferazni esej, Luciferase Assay System (kat. broj: E1501 i E1500) koji se sastoji od 5× koncentriranog pufera za lizu stanica (engl. *Cell Culture Lysis Reagent*, CCLR), supstrata za luciferazni esej te pufera za luciferazni esej. Prethodno pripremi uzoraka, sve komponente kita termostatirane su na 25°C kako bi bile na temperaturi optimalnoj za funkcioniranje luciferaze. Nakon ispiranja s PBS-om na stanice je dodano 20 µL CCLR razrijeđenog 5× destiliranom vodom te su stanice centrifugirane pri 300 rpm 20 minuta u centrifugi Eppendorf 5810R (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) termostatiranoj na 25°C kako bi se postigla potpuna liza stanica. Tijekom perioda lize stanica, uređaj SpectraMax iD3 i njegov injektorski sustav, kao i reagens za luciferazni esej pripremljeni su za eksperiment. Reagens za luciferazni esej priprema se miješanjem supstrata za luciferazni esej (liofilizirani prah) te pufera za luciferazni esej. Tako pripremljenim reagensom puni se injektorski sustav mikročitača ploča te se putem softverskog paketa mjerenje isprogramira na način da se u svaku od jažica injektira 100 µL reagensa za luciferazni esej koje slijedi odgoda mjerenja od 2 sekunde tijekom koje se pločica protrese i potom se mjere luminescentni signali kroz period od 10 sekundi. Tijekom reakcije, luciferaza producirana u stanicama prevodi luciferin iz reagensa u oksiluciferin koji producira svjetlost na svim valnim duljinama te se mjerenje provodi na svim kanalima za luminiscenciju SpectraMax iD3 uređaja.

### **3.7. Ispitivanje učinaka na proces steroidogeneze**

NCI-H295R stanice nasadene su u prozirne pločice s 24 jažice (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) u koncentraciji od  $2 \times 10^5$  stanica po jažici u 1 mL kompletnog staničnog medija kako bi postigle konfluentnost od 50-60 % kakva je potrebna za ispitivanje utjecaja na steroidogenezu prema smjernici OECD broj 456 (163). Nakon 24-satne inkubacije na 37°C i pri 5 % CO<sub>2</sub>, stanice su tretirane 1000× koncentriranim radnim otopinama paracetamola i ibuprofena te PsNP i njihovim smjesama, kao i pozitivnom kontrolom forskolinom te negativnom kontrolom proklorazom. Otopine su pripravljene kako je opisano u OECD smjernici broj 456. Iznimno za ovaj eksperiment, radne otopine su pripravljene u DMSO-u te su stanice tretirane na način da je 1 µL 1000× koncentrirane otopine dodan u 999 µL kompletnog staničnog medija u prikladno označenoj

plastičnoj tubici od 1,5 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) te je tubica vorteksirana kako bi se sadržaj što bolje izmiješao. Nakon toga je iz stanica jažicu po jažicu uklonjen prisutni stanični medij, stanice su isprane sa 300  $\mu$ L PBS-a te je dodan odgovarajući tretman pripremljen na opisani način. Stanice su potom inkubirane na 37°C i u atmosferi sa 5 % CO<sub>2</sub> tijekom 48 sati. Nakon 48 sati, stanični medij iz jažica koji sadržava producirane steroidne hormone prikupljen je u prikladno označene plastične tubice od 2 mL (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) te pohranjeni u zamrzivaču na -80°C. Steroidni hormoni stabilni su na toj temperaturi do 3 mjeseca te je kvantifikaciju potrebno odraditi unutar tog vremenskog perioda. Stanice preostale u jažici iskorištene su za izolaciju ukupne RNA za određivanje ekspresije gena uključenih u steroidogenezu .

### 3.7.1. Određivanje ekspresije gena uključenih u proces steroidogeneze (RT-qPCR)

Ekspresija gena uključenih u proces steroidogeneze utvrđena je kvantitativnom lančanom reakcijom polimeraze u stvarnom vremenu (engl. *quantitative real time polymerase chain reaction*, RT-qPCR). RT-qPCR omogućuje ispitivanje promjena razine ekspresije gena putem glasničke RNA (engl. *messenger ribonucleic acid*, mRNA) koja se izolira iz stanica na kojima se provodi eksperiment. mRNA se potom prevodi u cDNA (engl. *complementary deoxyribonucleic acid*) pomoću enzima reverzne transkriptaze (172,173). Nakon sinteze cDNA, lančanom reakcijom polimeraze moguće je uz pomoć prikladno odabranih početnica analizirati ekspresiju ciljnih gena, što su u slučaju ove doktorske disertacije bili *CYP11*, *CYP17*, *3 $\beta$ -HSD*, *17 $\beta$ -HSD* te *CYP19* (174–176).

Prvi korak u pripremi uzoraka za RT-qPCR je izolacija ukupne RNA iz NCI-H295R stanica koja je odrađena prema uputama iz kita Aurum Total RNA Mini (kat. broj: 7326820, Bio-Rad, Hercules, SAD). Nakon prikupljanja medija, u stanice je dodano 350  $\mu$ L pufera za lizu stanica (engl. *lysis solution*, jedna od komponenti kita) te je nakon provjere da su stanice lizirane pod mikroskopom u svaku jažicu dodano 350  $\mu$ L etanola pripravljenog iz etanola visoke čistoće (kat. broj: 1.08543, Sigma Aldrich) i sterilne vode tretirane dietilpirokarbonatom (voda bez RNA-za). Nakon temeljitog miješanja, ukupni volumen od 700  $\mu$ L prenesen je pomoću automatske pipete u kolonicu za pročišćavanje RNA koja dolazi u kitu. Kolonice su centrifugirane u Megafuge ST4R Plus centrifugi (Thermo Scientific, Waltham, SAD) na 12000 x g 30 sekundi. Potom je u svaku

kolonicu dodano 700  $\mu\text{L}$  prve otopine za pročišćavanje (engl. *low stringency wash solution*) te je ponovno proveden korak centrifugiranja sa istim ranije opisanim uvjetima. U slijedećem koraku na dno svake kolonice dodaje se 80  $\mu\text{L}$  svježe pripremljene otopine DNaze I nakon čega slijedi inkubacija u trajanju od 15 minuta na temperaturi od 25°C. Nakon inkubacije, u svaku je kolonicu dodano 700  $\mu\text{L}$  druge otopine za ispiranje (engl. *high stringency wash solution*) te su kolonice ponovno centrifugirane kako je ranije opisano. Slijedeći korak uključuje dodavanje 700  $\mu\text{L}$  prve otopine za ispiranje te 2 koraka centrifugiranja na 12000 x g od kojih prvi traje 30 sekundi, a drugi 2 minute. Na samom kraju dodano je 40  $\mu\text{L}$  otopine za ispiranje RNA (engl. *elution solution*). Od svakog je uzorka izolirane RNA uzeto 5  $\mu\text{L}$  volumena iz kojeg je pomoću NanoDrop uređaja (Thermo Scientific) određena količina te čistoća izolirane RNA. Uzorci RNA pohranjeni su na -80°C do korištenja.

Uzorci RNA prevedeni su u komplementarnu DNA (engl. *complementary DNA*, cDNA) pomoću iScript cDNA Synthesis kita (Bio-Rad). U twin.tec pločici za PCR sa 96 jažica (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) u svaku od jažica dodano je 4  $\mu\text{L}$  5 $\times$  koncentriranog iScript reakcijskog miksa te 1  $\mu\text{L}$  iScript reverzne transkriptaze te 5  $\mu\text{L}$  izolirane RNA po uzorku i 10  $\mu\text{L}$  vode bez nukleaza (sve otopine osim izolirane RNA su komponente kita). Pločica je potom smještena u ThermoMixer C (Eppendorf) te je reakcija reverzne transkriptaze provedena u 3 koraka: 5 minuta na 25°C, 20 minuta na 46°C te 1 minuta na 95°C. Nakon navedenih triju koraka, ThermoMixer C je programiran na temperaturu od 4°C kako bi se temperatura uzoraka u pločici postupno spustila. Uzorci cDNA do provođenja PCR reakcije pohranjeni su na -20°C.

Kvantitativna lančana reakcija polimeraze (engl. *quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) provedena je na uređaju Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, SAD). Kao fluorescentna boja za kvantifikaciju umnažanja ciljnih gena korištena je boja SYBR Green (Roche, Basel, Švicarska). Reakcijske smjese pripremljene su u twin.tec pločicama za PCR s 96 jažica (Eppendorf) pri čemu je u svaku jažicu dodan odgovarajući volumen uzvodne (engl. *forward*) i nizvodne (engl. *reverse*) početnice ciljnog ili referentnog gena, 5  $\mu\text{L}$  uzorka cDNA, 10  $\mu\text{L}$  SYBR Green reagensa te je volumen nadopunjen do 20  $\mu\text{L}$  vodom bez nukleaza. Kao kontrola reakcije (engl. *no template control*) korištene su reakcijske smjese sa početnicama za referentni ili ciljni gen u koje je umjesto uzorka cDNA dodan odgovarajući volumen vode bez nukleaza. Slijedovi, krajnje koncentracije i volumeni koji su dodani u reakcijsku

smjesu za svaku od korištenih početnica prikazani su u Tablici 1. Kao referentni gen, korišten je gen za  $\beta$ -aktin. Reakcija je provedena korištenjem slijedećeg programa (168,174–176): 10 minuta na 95°C (denaturacija) nakon koje slijedi 40 ciklusa amplifikacije koji se sastoje od dvaju koraka - 15 sekundi na 95°C i 60 sekundi na 60°C. Nakon amplifikacije, u program je dodana i disocijacijska faza od 3 koraka: 15 sekundi na 95°C, 60 sekundi na 60°C i ponovno 15 sekundi na 95°C. Iz posljednje faze programa moguće je dobiti disocijacijske krivulje za svaki od uzoraka. Disocijacijske krivulje (slika 36) pružaju uvid u homogenost nastalih produkata PCR reakcije te specifičnost umnažanja.

**Tablica 1.** Slijedovi (engl. *forward*, F i *reverse*, R), početna i reakcijska koncentracija ( $c_0$  i  $c_R$ ) i volumeni ( $V_R$ ) početnica korištenih u pripremi reakcijskih smjesa za ispitivanje ekspresije gena uključenih u proces steroidogeneze.

<i>Gen</i>	$c_0$ ( $\mu\text{M}$ )	$c_R$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_R$ ( $\mu\text{L}$ )	<i>Slijed</i>
<i>CYP19</i>	10	0,4	0,8	F: AGGTGCTATTGGTCATCTGCTC R: TGGTGGAATCGGGTCTTTATGG
<i>CYP17</i>	10	0,6	1,2	F: AGCCGCACACCAACTATCAG R: TCACCGATGCTGGAGTCAAC
<i>CYP11</i>	10	0,4	0,8	F: GAGATGGCACGCAACCTGAAG R: CTTAGTGTCTCCTTGATGCTGGC
<i>3<math>\beta</math>-HSD</i>	10	0,4	0,8	F: TGCCAGTCTTCATCTACACCAG R: TTCCAGAGGCTCTTCTTCGTG
<i>17<math>\beta</math>-HSD</i>	10	0,4	0,8	F: TGCGGGATCACGGATGACTC R: GCCACCATTCTCCTCACAACCTC
<i><math>\beta</math>-aktin</i>	10	0,2	0,4	F: CACTCTTCCAGCCTTCCTTCC R: AGGTCTTTGCGGATGTCCAC



### 3.7.2. Kvantifikacija međuprodukata steroidogeneze (LC-MS/MS)

Kao što je opisano ranije, steroidni hormoni koje su NCI-H295R stanice proizvele uslijed izloženosti ispitivanim lijekovima i nanočesticama kvantificirani su u supernatantima staničnog medija prikupljenog nakon 48-satnog tretmana stanica. Kvantifikacija 6 steroidnih hormona (progesterona,  $17\alpha$ -hidroksiprogesterona, dehidroepiandrosterona, androstendiona, estradiola i testosterona) provedena je pomoću MassChrom® Steroids kita (kat. broj: 72072/C, Chromsystems, Gräfelfing, Njemačka) vezanim sustavom tekućinske kromatografije - tandemске spektrometrije masa (LC-MS/MS). Metodologije određivanja steroidnih hormona pomoću ovog kita i korištenjem LC-MS/MS metode opisani su ranije u literaturi (165,177), a kromatogrami kontrolnih uzoraka pokazali su kako je metodologija funkcionalna i na uzorcima pripremljenim za ovu doktorsku disertaciju te u uvjetima rada u našem laboratoriju (Slika 37). Uzorci su pripremljeni na kolonicama za pročišćavanje uzoraka (engl. *sample clean up columns*) prema proceduri upisanoj u uputama za rad s navedenim kitom. Kolonice su pripremljene ekvibracijom sa dvama ekvibracijskim reagensima (engl. *equilibration reagents*) te centrifugiranjem na 400 x g. 500  $\mu$ L uzorka ispipetirano je na kolonicu uz 50  $\mu$ L smjese internog standarda i 450  $\mu$ L ekstrakcijskog pufera (engl. *extraction buffer*). Nakon vorteksiranja od 15 sekundi, kolonice su centrifugirane na 400 x g 1 minutu. Potom je dodano 700  $\mu$ L pufera za ispiranje (engl. *wash buffer*) te je kolonica centrifugirana opet 1 minutu na 400 x g, a nakon odbacivanja iscentrifugiranog sadržaja, dodano je 700  $\mu$ L istog pufera nakon čega je uzorak centrifugiran na 3000 x g do potpune suhoće. Kolonice su prebačene u čiste tubice za prikupljanje uzorka te je dodan pufer za ispiranje hormona (engl. *elution buffer*) te su kolonice centrifugirane na 400 x g 1 minutu. Eluati su evaporirani do suhoće na 50°C, a potom resuspendirani u 100  $\mu$ L pufera za rekonstituciju (engl. *reconstitution buffer*). Priprema uzoraka, kao i analiza na uređaju Nexera X2 spregnutom sa LCMS 8050 spektrometrom masa, odrađeni su u biokemijskom laboratoriju Odjela za kliničku kemiju i kontrolu kvalitete Kliničkog bolničkog centra Osijek.

### 3.8. Statistička obrada podataka

Rezultati dobiveni metodama TEM, DLS i ELS opisani su mjerom središnjice te rasapa i obrađeni deskriptivnim metodama (grafički i tablični prikazi).

Rezultati MTS testa, unosa nanočestica u stanice te kvantifikacije međuprodukata steroidogeneze metodom LC-MS/MS izraženi su kao relativna promjena u odnosu na negativne kontrole pri čemu je korištena slijedeća jednadžba:

$$\text{relativna promjena u odnosu na kontrolu} = \frac{\text{rezultat izmjeren u uzorku}}{\text{aritmetička sredina rezultata negativne kontrole}} \times 100 (\%)$$

S obzirom na zahtjeve smjernice za ispitivanje utjecaja kemikalija na aktivnost ER, rezultati luciferaznog eseya prikazani su kao relativna promjena u odnosu na pozitivnu kontrolu (10 nM dietilstilbestrol) pri čemu se postavlja uvjet kako kemikalije koje ostvaruju barem 10 % aktivnosti pozitivne kontrole ostvaruju agonističke učinke prema ER.

Udjeli živih, mrtvih te stanica u ranoj i kasnoj apoptozi utvrđenih analizom indukcije apoptoze metodom protočne citometrije izraženi su kao postotci od ukupnog broja stanica u uzorku te opisani aritmetičkom sredinom i mjerom rasapa.

Promjene u ekspresiji gena analizirane metodom RT-qPCR kvantificirane su metodom  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  koju opisuju Livak i suradnici (178). Vrijednost  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  izračunata je za sve uzorke te prikazuje koje su se promjene u ekspresiji ciljnih gena dogodile u odnosu na negativne kontrole ( $2^{-\Delta\Delta C_T} = 1$  - nema promjene u ekspresiji gena u odnosu na negativnu kontrolu;  $2^{-\Delta\Delta C_T} > 1$  - ekspresija ciljnog gena pojačana je u odnosu na netretirane stanice;  $2^{-\Delta\Delta C_T} < 1$  - ekspresija ciljnog gena smanjena je u odnosu na negativnu kontrolu). Za izračun te vrijednosti potrebno je odrediti  $\Delta C_T$  i  $\Delta\Delta C_T$  pomoću slijedećih jednadžbi:

$$\Delta C_T = \frac{C_T \text{ vrijednost ciljnog gena u uzorku}}{C_T \text{ vrijednost referentnog gena u uzorku}}$$

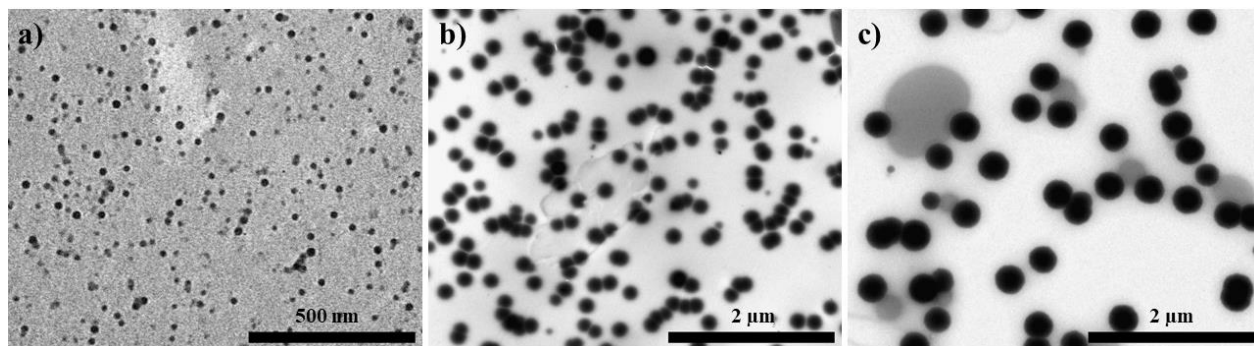
$$\Delta\Delta C_T = \frac{\Delta C_T \text{ vrijednost ciljnog gena u uzorku}}{\Delta C_T \text{ vrijednost ciljnog gena u negativnoj kontroli}}$$

Svi dobiveni rezultati statistički su obrađeni izračunom aritmetičke sredine vrijednosti dobivenih iz bioloških i/ili tehničkih replikata provedenih eksperimenata kao mjere središnjice te standardne devijacije kao mjere rasapa. Statistička značajnost rezultata stanica tretiranih ispitivanim tvarima u usporedbi s netretiranim stanicama te stanica tretiranih smjesama u usporedbi sa stanicama tretiranim pojedinačnim tvarima ispitana je metodom ANOVA (engl. *analysis of variance*). Nakon ANOVA testa korišten je Dunettov post-test kako bi se utvrdilo postoje li značajne razlike između netretiranih i tretiranih stanica, kao i između stanica tretiranih smjesama i zasebnim komponentama istih. Kriterij statističkih značajnosti postavljen je na razinu značajnosti  $p > 0,05$ . Učinci smjesa dodatno su testirani modelima adicije koncentracije (engl. *concentration addition*), nezavisne akcije (engl. *independent action*) (179) te faktora relativne potencije (engl. *relative potency factor*) (180) kako bi se pokušalo utvrditi pokazuju li kompleksne smjese aditivne, sinergističke ili antagonističke učinke.

## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. Fizikalno-kemijske karakteristike nanočestica plastike

Karakterizacija oblika PsNP, PpNP i PeNP transmisijskom elektronskom mikroskopijom pokazala je kako su sva tri tipa PNP sferičnog oblika (Slika 4). Njihove su primarne veličine ( $d_{TEM}$ ) određene na temelju mjerenja minimalno 60 PNP svakog tipa bile 25,3 nm za PsNP, 187,5 nm za PpNP te 344,9 nm za PeNP, što je u skladu sa deklariranim veličinama svake od navedenih PNP (Tablica 2).



**Slika 4.** Slike a) PsNP, b) PpNP, c) PeNP dobivene transmisijskom elektronskom mikroskopijom (TEM). PNP su karakterizirane u potpunom staničnom mediju pri koncentraciji od 1 mg/L.

Hidrodinamički promjer ( $d_H$ ) i vrijednosti  $\zeta$  potencijala (Tablica 2) izmjerene su u ultračistoj vodi te u mediju korištenom u tretmanima stanica (RPMI-1640 sa 5 % FBS-a pročišćenog aktivnim ugljenom). Primarni cilj određivanja ovih dvaju parametara bilo je razumijevanje stabilnosti suspenzije PNP u eksperimentalnim uvjetima. Uzimajući u obzir kako oba navedena svojstva iznimno ovise o mediju u kojem se čestica nalazi te kako su sva tri tipa PNP u svojem originalnom stanju dispergirana u ultračistoj vodi, mjerenja provedena u ultračistoj vodi odmah nakon razrjeđivanja suspenzije nanočestica uzeta su kao inicijalne vrijednosti za nanočestice. U staničnom mediju, mjerenja su provedena odmah nakon dodatka PNP u medij te nakon 48-satne inkubacije na 37°C čime su oponašani uvjeti u kojima se nanočestice nalaze tijekom provođenja staničnih eksperimenata. Kao što je i očekivano, vrijednosti  $d_H$  su se povećale, dok su se apsolutne vrijednosti negativnog  $\zeta$  potencijala smanjile za sva tri tipa nanočestica u usporedbi s mjerenjima u ultračistoj vodi. Ovakve promjene mogu se pripisati spontanom formiranju hidratacijske ljuske i proteinske korone na površini nanočestica. Do povećanja hidrodinamičkog promjera dolazi zbog adsorpcije velikog broja proteina veličine 1-20 nm prisutnih u mediju, dok se promjene u  $\zeta$

potencijalu mogu pripisati različitoj ionskoj jakosti u odnosu na ultračistu vodu te također nabojima aminokiselinskih ostataka prisutnih u vezanim proteinima (181,182). Povećanje  $d_H$  može biti uzrokovano i agregacijom PNP kroz 48-satni period koja je moguća kod smanjenja apsolutne vrijednosti  $\zeta$  potencijala te promjene ionske jakosti medija u kojem se nanočestice nalaze (183). Dobiveni rezultati ukazuju na to da se sve tri vrste PNP ponašaju vrlo slično u mediju, što se da zaključiti iz sličnih promjena  $d_H$  vrijednosti, kao i  $\zeta$  potencijala pri čemu potonje ukazuje i na slične procese „starenja“ odnosno promjena na površini nanočestica u prisutnosti medija i pri povišenoj temperaturi od 37°C.

**Tablica 2.** Fizikalno-kemijske karakteristike PsNP, PpNP i PeNP. Primarna veličina čestica ( $d_{TEM}$ , nm) dobivena je transmisijskom elektronskom mikroskopijom (TEM). Hidrodinamički promjer ( $d_H$ ) određen je metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS), a vrijednosti  $\zeta$  potencijala elektroforetskim raspršenjem svjetlosti (ELS). Sva mjerenja provedena su u ultračistoj vodi te potpunom staničnom mediju (SM; RPMI-1640 sa 5 % FBS-a pročišćenog aktivnim ugljenom) te su sve korištene koncentracije nanočestica bile 10 mg/L.

	$d_{TEM}$ (nm)	Parametar	Uvjeti mjerenja (medij, vrijeme inkubacije)		
			ultračista voda, t=0 h	kompletni stanični medij, t=0 h	kompletni stanični medij, t=48 h
<b>PsNP</b>	25,3 ± 2,9	$d_H$ (nm)	27,0 ± 1,8	53,9 ± 5,7	87,5 ± 15,3
		$\zeta$ potencijal (mV)	-26,2 ± 3,3	-8,5 ± 1,3	-18,5 ± 1,8
<b>PpNP</b>	187,5 ± 28,7	$d_H$ (nm)	208,5 ± 6,3	345,8 ± 16,3	497,9 ± 37,9
		$\zeta$ potencijal (mV)	-31,1 ± 0,5	-15,3 ± 2,9	-21,8 ± 1,3
<b>PeNP</b>	344,9 ± 18,9	$d_H$ (nm)	372,6 ± 16,9	565,9 ± 72,4	649,2 ± 90,7
		$\zeta$ potencijal (mV)	-32,6 ± 1,6	-15,8 ± 1,3	-22,3 ± 0,6

Osim koloidne stabilnosti pojedinačnih PNP, ispitana je stabilnost suspenzija smjese PNP pri istim uvjetima (Tablica 3). Iako su u smjesi prisutna tri tipa nanočestica plastike različitih

veličina, prilikom ispitivanja raspodjele veličina u smjesi PNP koja sadrži 10 mg/L svake od triju nanočestica metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti uočen je samo jedan pik ( $261,2 \pm 9,4$  nm). Iako bi se iz dobivenog rezultata na prvi pogled moglo zaključiti kako je došlo do znatne agregacije nanočestica u smjesi, zapravo je riječ o ograničenjima korištene metode. Naime, metoda dinamičkog raspršenja svjetlosti nije prikladna za karakterizaciju smjesa jer ne može u potpunosti razlikovati više tipova nanočestica različitih veličina te pruža uvid u prosječnu raspodjelu veličina. Dodatno, s obzirom na princip metode, može se dogoditi da veće nanočestice „maskiraju“ manje nanočestice te su vidljivi pikovi samo takvih većih nanočestica koje su prisutne u suspenziji. Iako postoje druge metode kojima bi se moglo preciznije opisati ponašanje nanočestica u smjesi, potpuna karakterizacija nanočestica te njihovih složenih interakcija u smjesama nije bila u fokusu ovog doktorskog istraživanja, već je primarni fokus stavljen na ispitivanje njihova endokrino disruptivnog djelovanja.

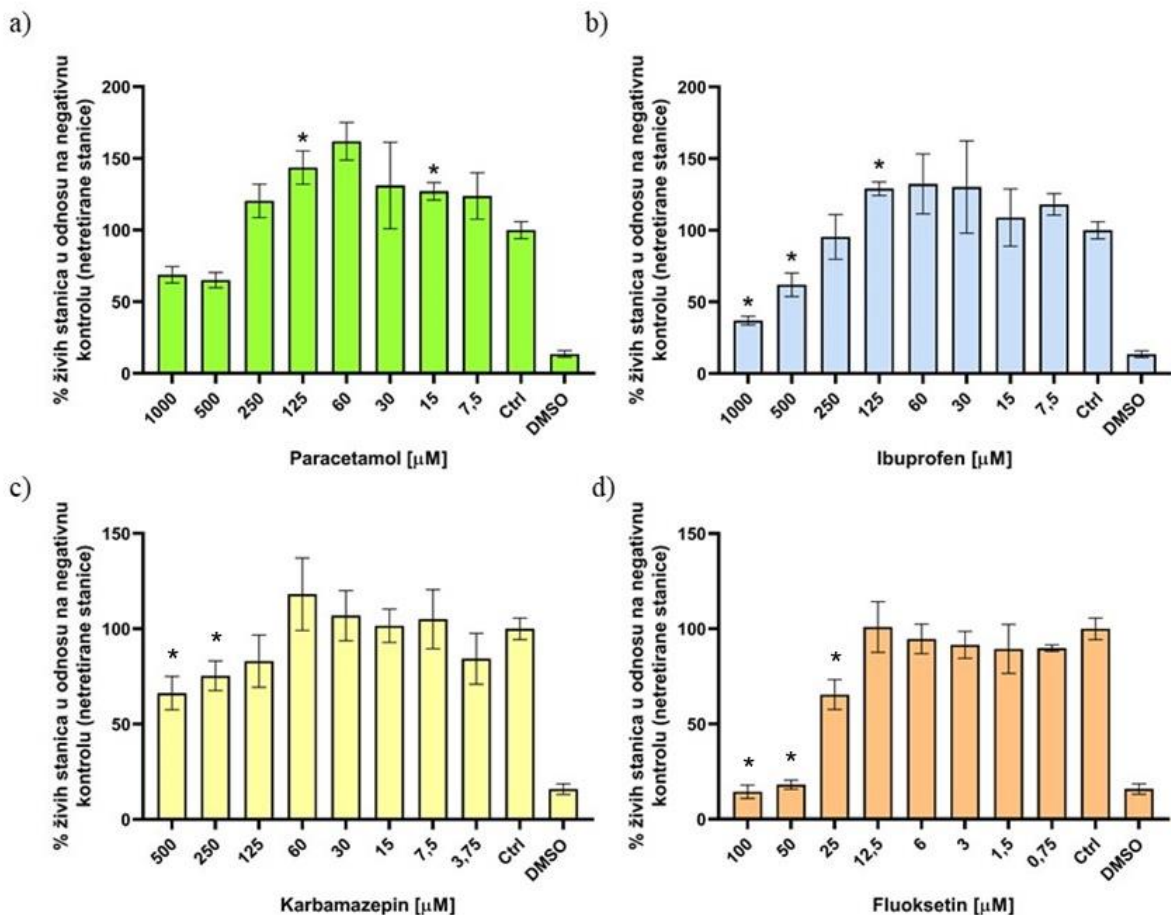
**Tablica 3.** Fizikalno-kemijske karakteristike smjesa PsNP, PpNP i PeNP. Hidrodinamički promjer ( $d_H$ ) i indeks polidisperznosti (PDI) određeni su metodom dinamičkog raspršenja svjetlosti (DLS) pri temperaturi od 25°C u potpunom staničnom mediju nakon 48-satne inkubacije na 37°C. Koncentracije nanočestica u smjesama bile su od 0,001 - 10 mg/L.

<b>PsNP + PpNP + PeNP (mg/L)</b>	<b><math>d_H</math></b>	<b>%</b>	<b>PDI</b>
<b>10 + 10 + 10</b>	$261,2 \pm 9,4$	100	$0,2 \pm 0,0$
<b>1 + 1 + 1</b>	$240,0 \pm 41,0$	73,2	$1,0 \pm 0,0$
	$29,6 \pm 8,2$	15,5	
	$8,8 \pm 0,8$	11,3	
<b>0,1 + 0,1 + 0,1</b>	$252,0 \pm 23,5$	15,7	$0,6 \pm 0,0$
	$48,9 \pm 4,6$	44,7	
	$10,9 \pm 0,9$	39,6	
<b>0,01 + 0,01 + 0,01</b>	$12,0 \pm 1,5$	55,6	$0,4 \pm 0,0$
	$55,9 \pm 13,2$	44,4	
<b>0,001 + 0,001 + 0,001</b>	$12,4 \pm 0,6$	55,7	$0,4 \pm 0,0$
	$52,9 \pm 12,3$	44,3	

## 4.2. Stanično preživljenje i aktivacija apoptoze

### 4.2.1. Učinak odabranih lijekova na preživljenje stanica i proces apoptoze

Uzimajući u obzir kako je luciferazni test za ispitivanje aktivnosti ER metoda koja je visokoprotočna, ali i znatno pristupačnijih troškova u odnosu na LC-MS/MS metodu za određivanje koncentracija steroidnih hormona, ekstenzivno ispitivanje učinaka doze lijekova na preživljenje stanica pomoću MTS testa provedeno je samo na staničnoj liniji T47D-KBluc, dok su na staničnoj liniji NCI-H295R ispitane samo izabrane koncentracije i to metodom protočne citometrije.



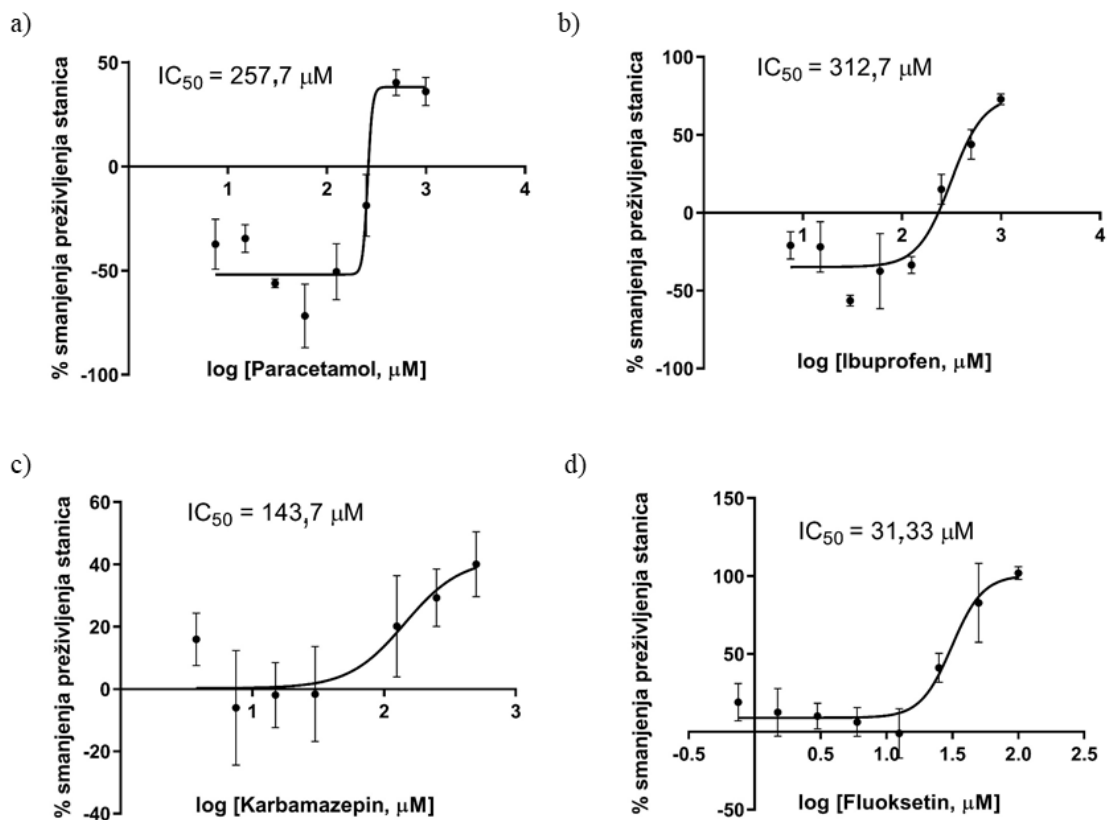
**Slika 5.** Rezultati MTS testa na staničnoj liniji T47D-KBluc za a) paracetamol, b) ibuprofen, c) karbamazepin i d) fluoksetin. Kao negativna kontrola korištene su netretirane stanice, dok su pozitivne kontrole tretirane sa 10 % (v/v) DMSO-a. Prikazani rezultati dobiveni su iz triplikata

dvaju ponovljenih eksperimenata. Statistički značajne razlike u odnosu na negativne kontrole ( $p < 0,05$ ) označene su zvjezdicom (\*).

U tretmane stanične linije T47D-KBluc, na temelju literaturnog pregleda ranijih podataka, uključene su koncentracije znatno više od onih okolišno relevantnih kako bi se dobio dovoljan broj točaka te dovoljno toksične doze za izračun relevantnih parametara citotoksičnosti. Svi tretmani stanica lijekovima provedeni su kroz 48 sati kako bi se utvrdio njihov učinak na preživljenje stanica i pokretanje procesa apoptoze prije početka eksperimenata endokrino disruptivnih učinaka.

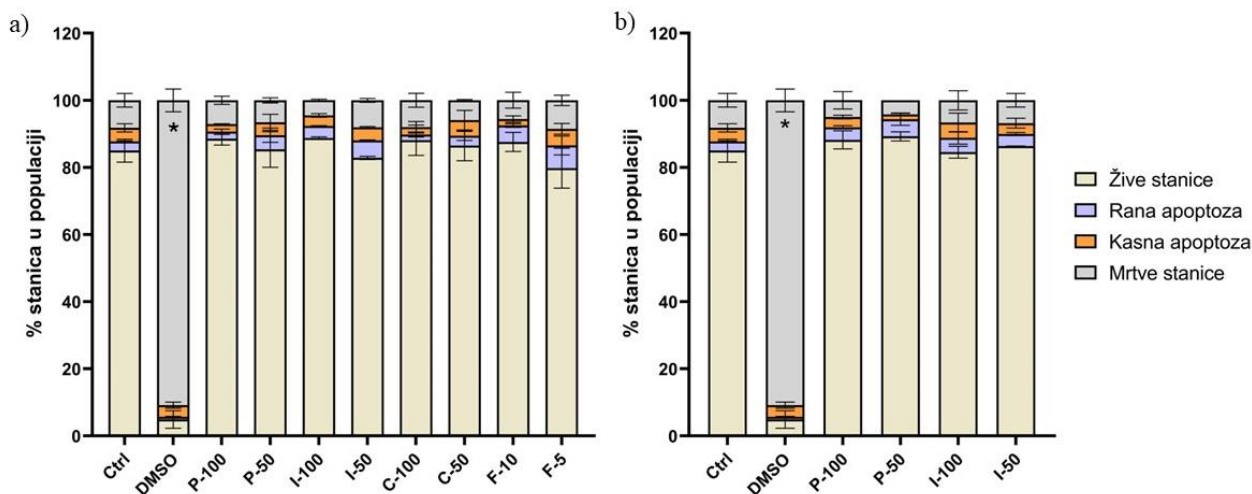
Rezultati MTS testa na staničnoj liniji T47D-KBluc prikazani su kao relativna promjena u odnosu na kontrolu (Slika 5) te su sigmoidalne krivulje odnosa doze i postotka smanjenja preživljenja stanica generirane u programu GraphPad Prism te je statističkom analizom ugrađenom u model nelinearne regresije utvrđena koncentracija koja ubija 50 % stanica ( $IC_{50}$ ). Na T47D-KBluc stanicama uvjerljivo najtoksičnijim se pokazao fluoksetin čija je  $IC_{50}$  bila čak od 3 do 10 puta niža u odnosu na ostale spojeve. Najmanju je citotoksičnost pokazao ibuprofen, kojem je  $IC_{50}$  procijenjena na približno 300  $\mu M$  (Slika 6).





**Slika 6.** Krivulje odnosa doze i postotka smanjenja preživljenja stanica prema rezultatima MTS testa na staničnoj liniji T47D-KBluc. Krivulje su generirane u programu GraphPad Prism te je pomoću unaprijed definiranog modela određena koncentracija koja ubija 50 % populacije stanica ( $IC_{50}$ ) za svaki od lijekova.

Zanimljivo je i kako su određene niske koncentracije paracetamola i ibuprofena izazvale porast broja vijabilnih stanica u odnosu na kontrolu (Slika 5). S obzirom na činjenicu kako se radi o stanicama karcinoma ovisnog o hormonima, moglo bi se predvidjeti kako bi paracetamol i ibuprofen mogli imati agonističke učinke na ER te time doprinijeti agresivnosti karcinoma. Ipak, ovakav zaključak ne bi trebalo izvoditi iz rezultata MTS testa koji nije odgovarajuća metoda za ovakva ispitivanja, već bi se utjecaj na proliferaciju stanica (i time potencijalno metastaziranje karcinomskih stanica) trebao provjeriti testom migracije stanica (184).



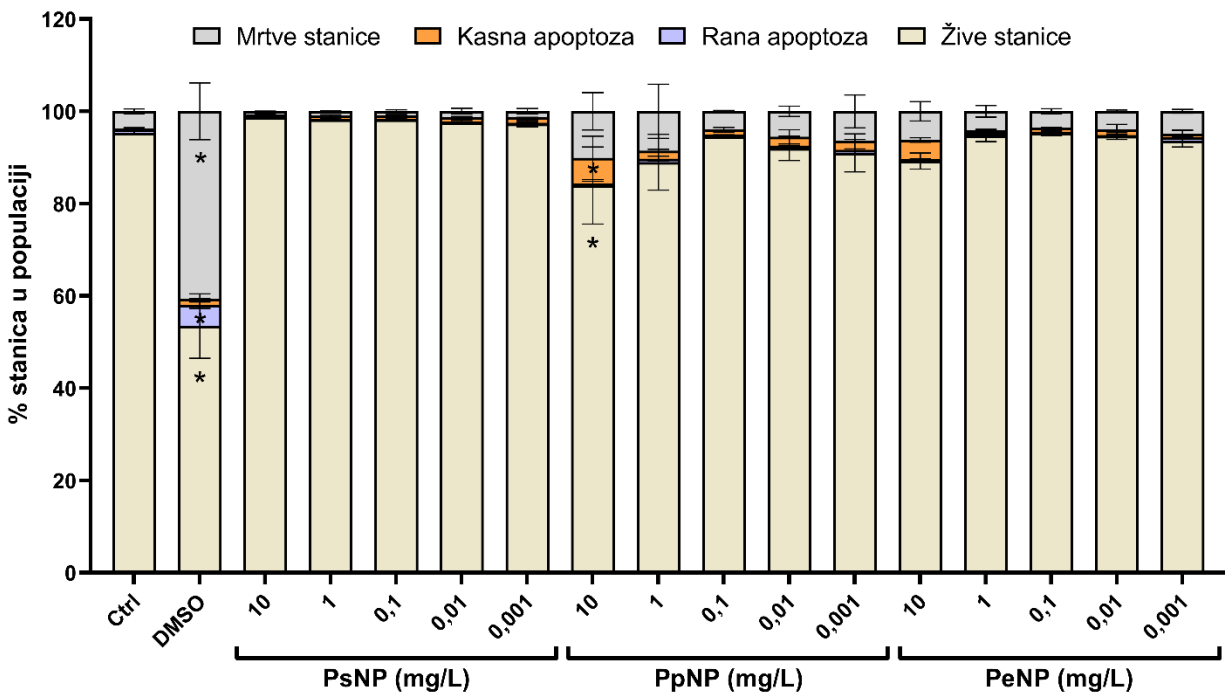
**Slika 7.** Rezultati ispitivanja aktivacije apoptoze i preživljena stanica nakon tretmana lijekovima na staničnoj liniji a) T47D-KBluc te b) NCI-H295R. Kao negativna kontrola korištene su netretirane stanice, dok su pozitivne kontrole tretirane sa 10 % (v/v) DMSO-a. Prikazani rezultati dobiveni su iz duplikata dvaju ponovljenih eksperimenata. Statistički značajne razlike u odnosu na negativne kontrole ( $p < 0,05$ ) označene su zvjezdicom (\*).

Utjecaj lijekova na pokretanje procesa programirane stanične smrti ispitan je za paracetamol i ibuprofen u koncentracijama od 50 i 100  $\mu\text{M}$  na staničnim linijama T47D-KBluc i NCI-H295R, dok su učinci karbamazepina u koncentracijama od 50 i 100  $\mu\text{M}$  te fluoksetina u koncentracijama 5 i 10  $\mu\text{M}$  ispitani samo na staničnoj liniji T47D-KBluc. Niti jedan od tretmana na obje stanične linije nije uzrokovao statistički značajan porast u broju rano apoptotičnih, kasno apoptotičnih ili mrtvih stanica u odnosu na netretirane stanice (Slika 7). Provjera utjecaja na vijabilnost najviših koncentracija koje će biti korištene u eksperimentima metodom protočne citometrije odrađena je zbog njezine veće pouzdanosti u odnosu na MTS test (185).

Nakon odrađenih ispitivanja utjecaja na staničnu vijabilnost, utvrđeno je kako se u daljnje eksperimente mogu uzeti paracetamol, ibuprofen i karbamazepin u maksimalnoj koncentraciji od 100  $\mu\text{M}$  te fluoksetin pri najvišoj koncentraciji od 10  $\mu\text{M}$ .

#### 4.2.2. Učinak PNP na preživljenje stanica i proces apoptoze

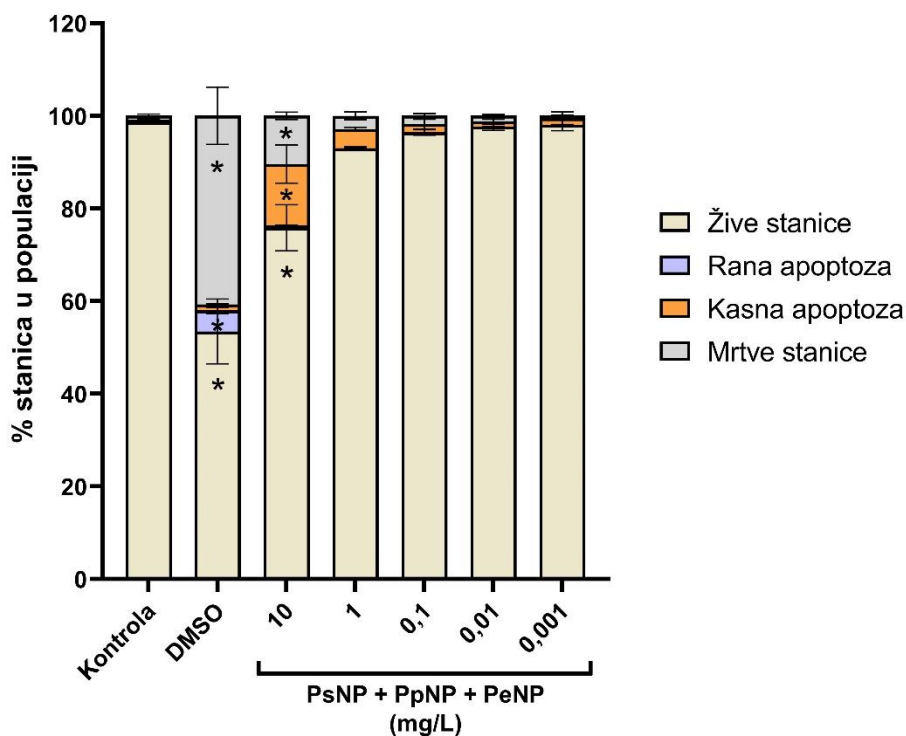
Utjecaji PNP na aktivaciju procesa apoptoze te preživljenje stanica ispitani su pojedinačno za PsNP, PpNP i PeNP te za njihove smjese prethodno provođenju svih eksperimenata za utvrđivanje endokrino disruptivnih učinaka. Ovaj korak bio je ključan za odabir raspona doza koje će biti korištene u daljnjim ispitivanjima jer je njime ispitano koje koncentracije nanočestica te smjese kojih sastava neće značajno narušiti vijabilnost stanica ili oštetiti stanice.



**Slika 8.** Rezultati ispitivanja aktivacije apoptoze i preživljenja stanica nakon tretmana PsNP, PpNP i PeNP na staničnoj liniji T47D-KBluc. Kao negativna kontrola korištene su netretirane stanice, dok su pozitivne kontrole tretirane sa 10 % (v/v) DMSO-a. Prikazani rezultati dobiveni su iz duplikata dvaju ponovljenih eksperimenata. Statistički značajne razlike u odnosu na negativne kontrole ( $p < 0,05$ ) označene su zvjezdicom (\*).

S obzirom na to da je u eksperimente na NCI-H295R stanicama zbog visoke zahtjevnosti i cijene eksperimenata uvršteno svega nekoliko koncentracija PsNP odabranih prema zaključcima izvedenih iz eksperimenata na T47D-KBluc stanicama, temeljito ispitivanje utjecaja PNP i njihovih smjesa na preživljenje provedeno je samo na staničnoj liniji T47D-KBluc.

Tijekom ovog eksperimenta ispitane su koncentracije PsNP, PpNP te PeNP od 0,001 - 10 mg/L te 5 različitih smjesa PNP koje sadržavaju sva tri tipa PNP u jednakim koncentracijama. Rezultati su pokazali kako PsNP i PeNP nisu uzrokovale statistički značajnu indukciju apoptoze ili smrt stanica (Slika 8).



**Slika 9.** Rezultati ispitivanja aktivacije apoptoze i preživljenja stanica nakon tretmana smjesama koje sadrže ekvivalente koncentracije sva tri tipa PNP - PsNP, PpNP i PeNP na staničnoj liniji T47D-KBluc. Kao negativna kontrola korištene su netretirane stanice, dok su pozitivne kontrole tretirane sa 10 % (v/v) DMSO-a. Prikazani rezultati dobiveni su iz duplikata dvaju ponovljenih eksperimenata. Statistički značajne razlike u odnosu na negativne kontrole ( $p < 0,05$ ) označene su zvjezdicom (\*).

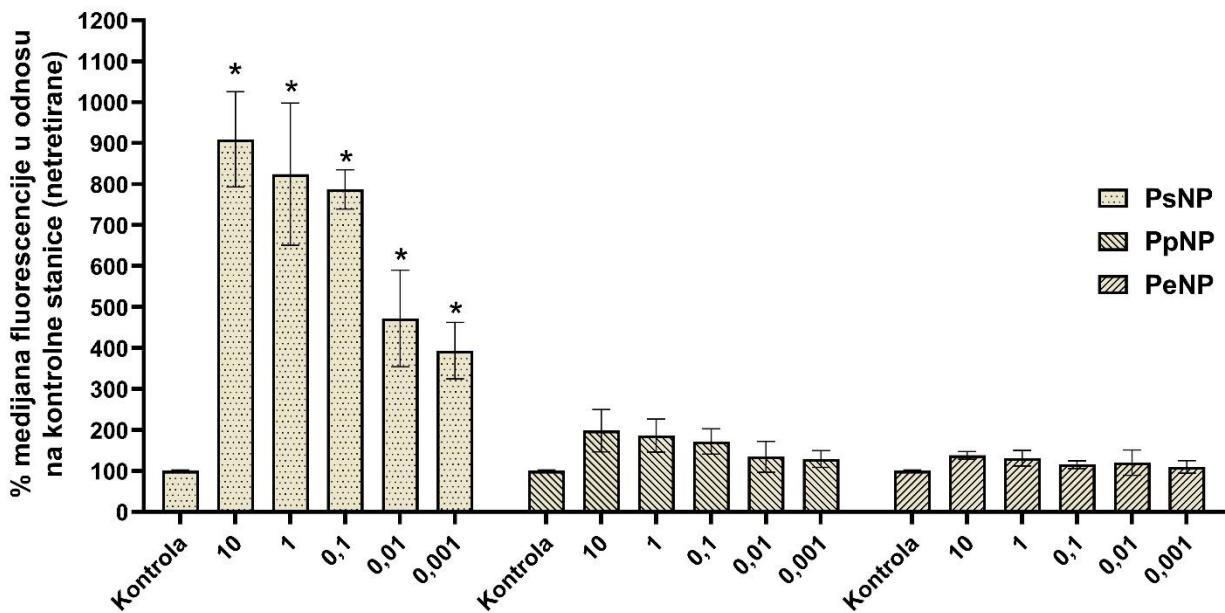
Iako su i PeNP pokazale određeni citotoksični učinak (porast broja mrtvih i stanica u kasnoj apoptozi), najviši postotak mrtvih stanica uočen je kod PpNP. Ono što je zanimljivo jest činjenica kako je i kod PpNP i kod PeNP povećan specifično broj stanica u kasnoj apoptozi (Slika 8). Može se uočiti kako DMSO primarno uzrokuje smrt stanica, a i kod ispitivanja učinaka lijekova na

pokretanje apoptoze uočeno je kako je prisutan određeno povišenje broja rano apoptotičnih ili mrtvih stanica, više nego onih kasno apoptotičnih (Slika 7). Prethodno je u literaturi dokazano kako i čestice polipropilena (186–189) i čestice polietilena mogu dovesti do aktivacije procesa apoptoze (190–193). Postotak živih stanica bio je 84 % za PpNP, 89 % kod PeNP te 98 % kod tretmana sa PsNP. PsNP nisu pokazale gotovo nikakvu promjenu u odnosu na kontrolu kroz cijeli raspon koncentracija, iako je prethodno u literaturi bilo dokaza o njihovoj indukciji apoptoze (194–196). Unatoč određenim zamijećenim učincima, utjecaj na aktivaciju apoptoze te staničnu smrt nisu bili značajni te je potvrđena mogućnost korištenja ispitanih koncentracija PNP.

U slučaju primjene smjese triju PNP, smjesa koja sadrži po 10 mg/L od svakog tipa nanočestica detektirano je 14 % kasno apoptotičnih stanica te 11 % mrtvih stanica, što je rezultiralo i statistički značajnim smanjenjem broja živih stanica (Slika 9). Ovakav učinak može se pripisati aditivnim efektima u smjesi nanočestica plastike koje su zajedničkim djelovanjem uzrokovale jače citotoksične efekte u odnosu na zasebne komponente smjese. S obzirom na dobiveni rezultat, smjesa koja sadržava 10 mg/L svake PNP isključena je iz daljnjih ispitivanja kako bi se izbjegli lažno negativni rezultati uzrokovani smanjenjem broja živih i metabolički aktivnih stanica.

#### **4.3. Stanični unos različitih nanočestica plastike**

Unos PsNP, PpNP i PeNP i smjesa nanočestica u stanice analiziran je metodom protočne citometrije. Sva tri tipa nanočestica fluoresciraju u zelenom području u vidljivom dijelu spektra elektromagnetskog zračenja. PpNP i PeNP svojstvo autofluorescencije posjeduju zbog starenja površine materijala i pojave ketonskih skupina (197), dok je PsNP moguće nabaviti komercijalno već fluorescentno obilježene. Zahvaljujući emisijskim maksimumima u istom području spektra, bilo je moguće procijeniti unos nanočestica, ali i smjesa nanočestica u stanice praćenjem promjene medijana intenziteta fluorescencije na detektoru 525/40.

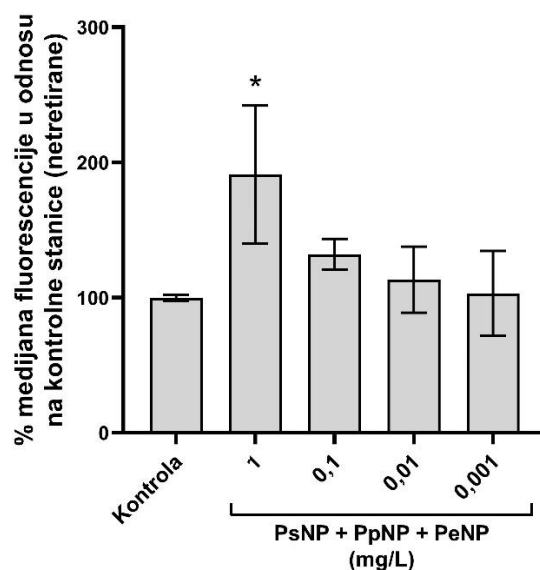


**Slika 10.** Unos PsNP, PpNP te PeNP u T47D-KBluc stanice određen pomoću protočne citometrije. Rezultati su prikazani kao relativni u odnosu na netretirane stanice, odnosno kao % medijana intenziteta fluorescencije kontrolnih stanica. Prikazani rezultati dobiveni su iz duplikata dvaju ponovljenih eksperimenata. Statistički značajne razlike u odnosu na negativne kontrole ( $p < 0,05$ ) označene su zvjezdicom (\*).

PsNP su pokazale jasan proporcionalni odnos doze primjenjenih nanočestica i njihova unosa u stanicu, dok PpNP i PeNP nisu pokazale statistički značajne razlike u odnosu na kontrolu (Slika 10). Također, valja primjetiti kako su PsNP pokazale znatno veću relativnu promjenu medijana intenziteta fluorescencije u odnosu na PpNP i PeNP, što pokazuje kako PsNP imaju najveći potencijal ulaska u stanicu od ispitivanih tipova nanočestica. Dio ovakvog rezultata valja pripisati i činjenici kako je signal fluorescentnog biljega jači od signala autofluorescencije PpNP i PeNP, no razlika je veoma značajna pa je validan i zaključak kako je unos PsNP najizraženiji.

Ovakve rezultate moguće je pripisati razlikama u veličini nanočestica. PsNP čiji je promjer svega 25 nm, čak i nakon eventualne aglomeracije u staničnom mediju tijekom 48 sati i dalje će biti lakše internalizirane od strane stanica nego PpNP od 180 nm ili PeNP od 350 nm. Trend obrnute proporcionalnosti veličine i relativne količine unosa PNP u stanice vidljiv je i iz razlika unosa PpNP i PeNP pri čemu su razlike između PpNP i kontrole nešto veće u odnosu na PeNP i kontrole između kojih je razlika gotovo zanemariva. Ovisnost internalizacije nanočestica o njihovoj veličini

pri čemu manje nanočestice lakše prodiru u stanice opisana je i ranije u literaturi, stoga su ovakvi rezultati očekivani (198–203).



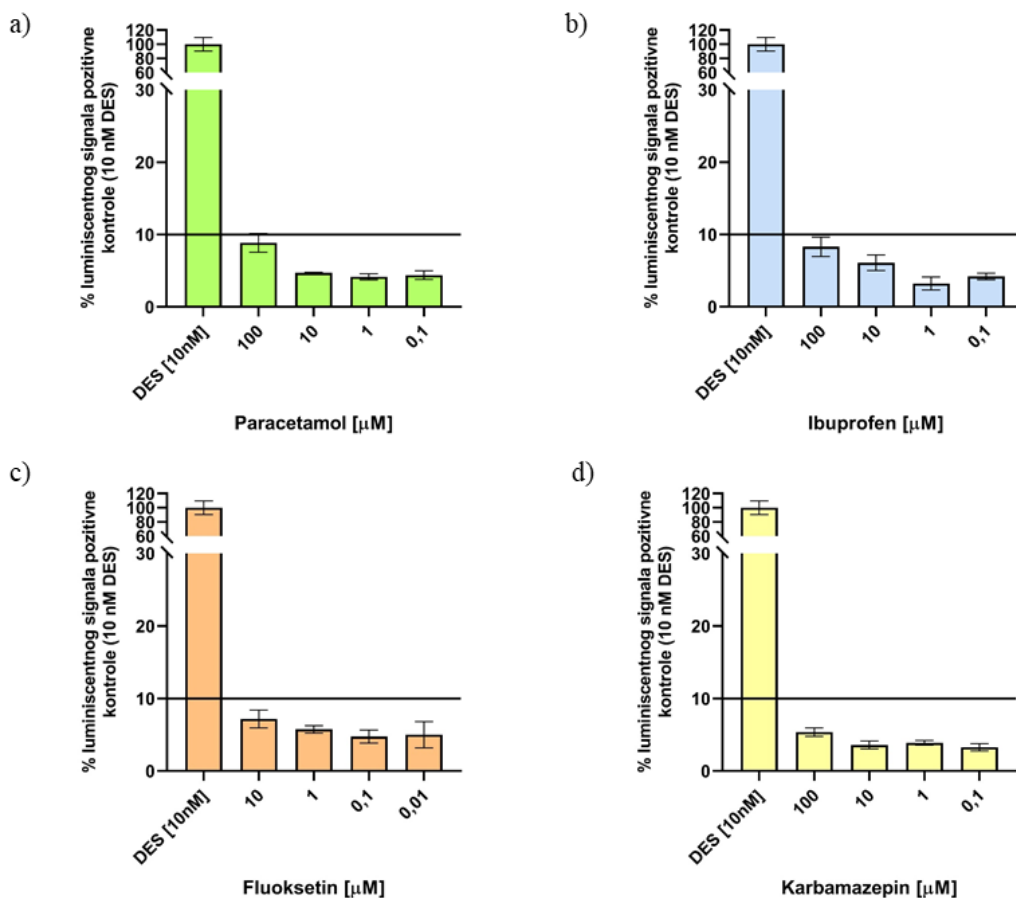
**Slika 11.** Unos smjesa PsNP, PpNP te PeNP u T47D-KBluc stanice određen pomoću protočne citometrije. Rezultati su prikazani kao relativni u odnosu na netretirane stanice, odnosno kao % medijana intenziteta fluorescencije kontrolnih stanica. Prikazani rezultati dobiveni su iz duplikata dvaju ponovljenih eksperimenata. Statistički značajne razlike u odnosu na negativne kontrole ( $p < 0,05$ ) označene su zvjezdicom (\*).

Stanični unos smjesa PsNP, PpNP i PeNP također je pokazao proporcionalnu ovisnost o primjenjenoj dozi. Statistički značajna razlika uočena je samo za smjesu koja je sadržavala 1 mg/L svake od nanočestica (Slika 11). Iz opisanog rezultata može se zaključiti kako je unos PsNP znatno smanjen kada su primjene u smjesi sa PpNP i PeNP, najvjerojatnije zbog agregacije i aglomeracije nanočestica u suspenziji smjese, čime je i kontakt PsNP sa stanicama manje vjerojatan te njihova mogućnost ulaska u stanicu smanjena.

## 4.4. Aktivacija estrogenskih receptora

### 4.4.1. Utjecaj pojedinačnih PNP i lijekova

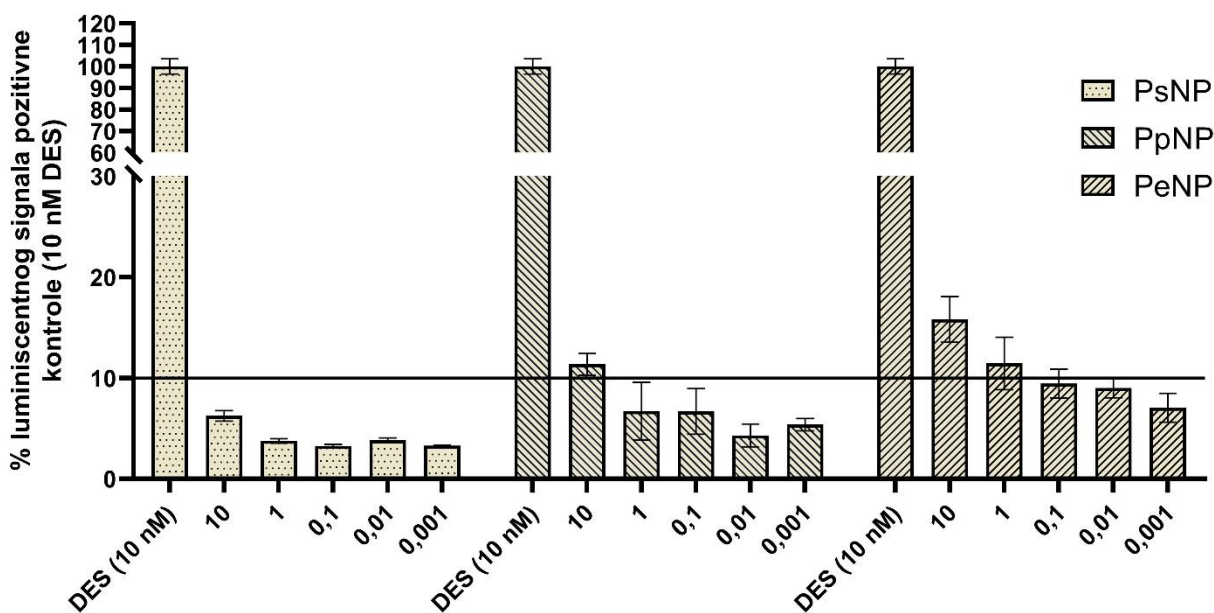
Aktivacija ER ispitana je luciferaznim esejem na staničnoj liniji T47D-KBluc te su pritom korišteni paracetamol, ibuprofen i karbamazepin u koncentracijama od 0,1-100  $\mu\text{M}$  te fluoksetin u koncentracijama od 0,01-10  $\mu\text{M}$ . Stanice su tretirane 48 sati, nakon čega su lizirane te su izmjereni luminescentni signali uslijed dodatka supstrata luciferina.



**Slika 12.** Aktivnost ER uzrokovana tretmanom a) paracetamolom, b) ibuprofenom, c) karbamazepinom i d) fluoksetinom. Rezultati su prikazani kao % luminescentnog signala pozitivne kontrole (10 nM) DES. Ukoliko je odziv ispitivane kemikalije >10 % luminescentnog signala pozitivne kontrole (označeno punom linijom na grafu), kemikalija se smatra endokrino disruptivnom s obzirom na djelovanje na ER. Prikazani rezultati dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.



Niti jedan od četiri ispitana lijeka nije ostvario više od 10 % aktivnosti DES-a kao pozitivne kontrole te se stoga sukladno kriteriju OECD smjernice broj 455 lijekovi kao individualne komponente ne mogu smatrati agonistima ER. Paracetamol je bio najbliže tome da ostvari 10 % učinka pozitivne kontrole, dok je kod karbamazepina uočena najmanja promjena. Sva 4 lijeka pokazala su proporcionalan odnos doze i odgovora (Slika 12).



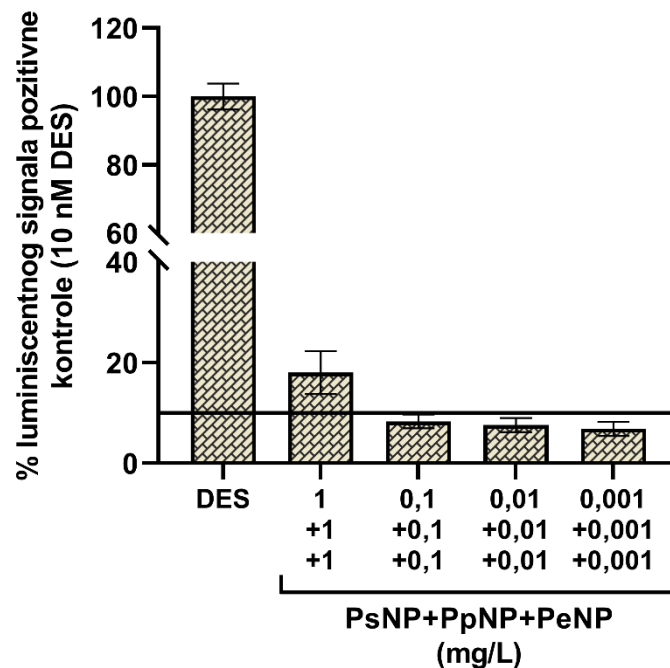
**Slika 13.** Aktivnost ER uzrokovana tretmanom PsNP, PpNP i PeNP. Rezultati su prikazani kao % luminescentnog signala pozitivne kontrole (10 nM) DES. Ukoliko je odaziv ispitivane kemikalije >10 % luminescentnog signala pozitivne kontrole (označeno punom linijom na grafu), kemikalija se smatra endokrino disruptivnom s obzirom na djelovanje na ER. Prikazani rezultati dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

Ispitivanjem učinaka PNP na aktivnost ER prikazano je kako sva tri tipa nanočestica ostvaruju proporcionalni odgovor u odnosu na primjenjene doze. PeNP su pokazale agonistički učinak prema ER u koncentracijama od 10 i 1 mg/L (Slika 13), PpNP su prešle prag od 10 % samo pri najvišoj koncentraciji, a PsNP su u svim dozama bile znatno ispod razine od 10 % pozitivne kontrole. Ovakvi rezultati zanimljivi su zbog potpuno suprotne situacije kod unosa nanočestica u

stanice opisanog ranije te su odgovori također proporcionalni veličini, dok je u većini slučajeva ispitivanja toksičnosti nanočestica u literaturi utvrđeno kako manje nanočestice djeluju potentnije.

#### 4.4.2. Utjecaj složenih smjesa PNP i lijekova

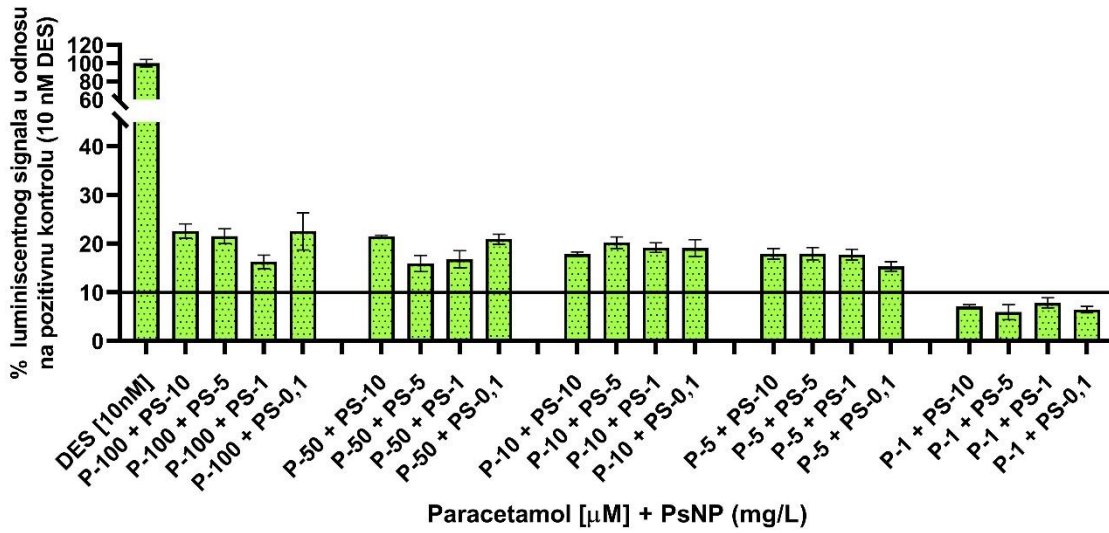
Kad su T47D-KBluc stanice tretirane smjesama PNP, učinci koji prelaze 10 % aktivnosti DES-a uočeni su za smjese svih koncentracija pri čemu je odgovor bio ovisan o dozi (Slika 14). Omjer % luminescentnih signala samih nanočestica te smjesa ukazuje na aditivne učinke jer sve nanočestice djeluju na isti receptor, a učinak smjese jednak je zbroju učinaka pojedinačnih nanočestica. Takav učinak potvrđen je karakterizacijom smjese pomoću metode relativnih faktora potencije. Krivulje za pojedinačne nanočestice generirane su u online softveru PROAST (Slike 38-41) te je određena doza željenog efekta (engl. *benchmark dose*, BMD) za svaku pojedinačnu nanočesticu te smjese. Relativni faktor potencije (engl. *relative potency factor*, RPF) računa se tako da se podijeli BMD smjese sa BMD same nanočestice (Tablica 5). Prednost ovakvog pristupa je činjenica kako se RPF računa iz doza koje potiču unaprijed definirani odgovor zbog čega su BMD ekvipotentne doze za svaku kemikaliju i stoga se mogu primijeniti čak i ako se odnos doze i odgovora za pojedine kemikalije znatno razlikuje, što je slučaj sa PNP. U ovom slučaju, sve RPF vrijednosti bile su veće od 1, što potvrđuje aditivni učinak PNP u smjesi.



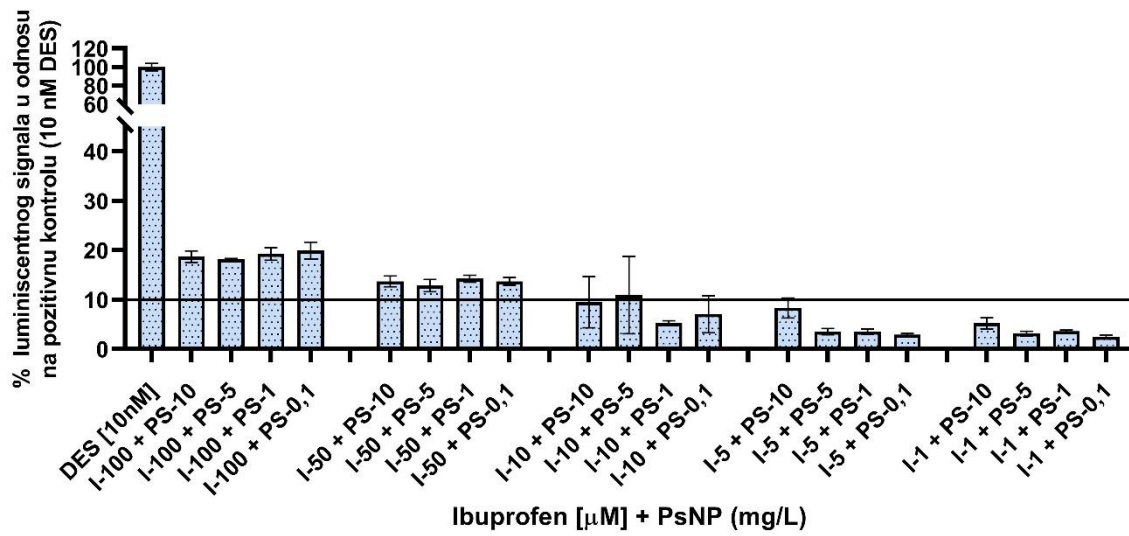
**Slika 14.** Aktivnost ER uzrokovana tretmanom smjesama PsNP, PpNP i PeNP. Rezultati su prikazani kao % luminiscentnog signala pozitivne kontrole (10 nM) DES. Ukoliko je odaziv ispitivane kemikalije >10 % luminiscentnog signala pozitivne kontrole (označeno punom linijom na grafu), kemikalija se smatra endokrino disruptivnom s obzirom na djelovanje na ER. Prikazani rezultati dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

Nakon ispitivanja samih lijekova, samih nanočestica te smjesa nanočestica, ispitane su i binarne smjese nanočestica i lijekova te binarne i tercijarne smjese samih lijekova. Binarne smjese lijekova s nanočesticama u svim su kombinacijama pokazale jasni zajednički efekt na aktivnost ER. Čak i one komponente koje zasebno nisu ostvarivale nikakve učinke, u slučaju ovakvih smjesa u većini slučajeva ostvaruju učinke koji prelaze 10 % aktivnosti DES.

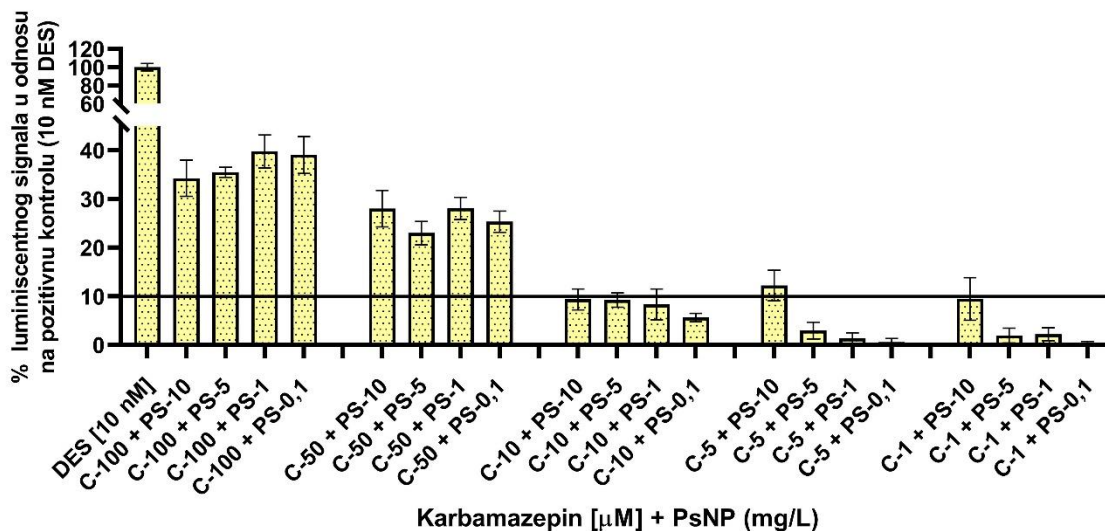
Kod smjesa PsNP i lijekova, jačina aktivacije ER ovisila je primarno o koncentraciji lijeka za sve ispitivane lijekove (Slika 15).



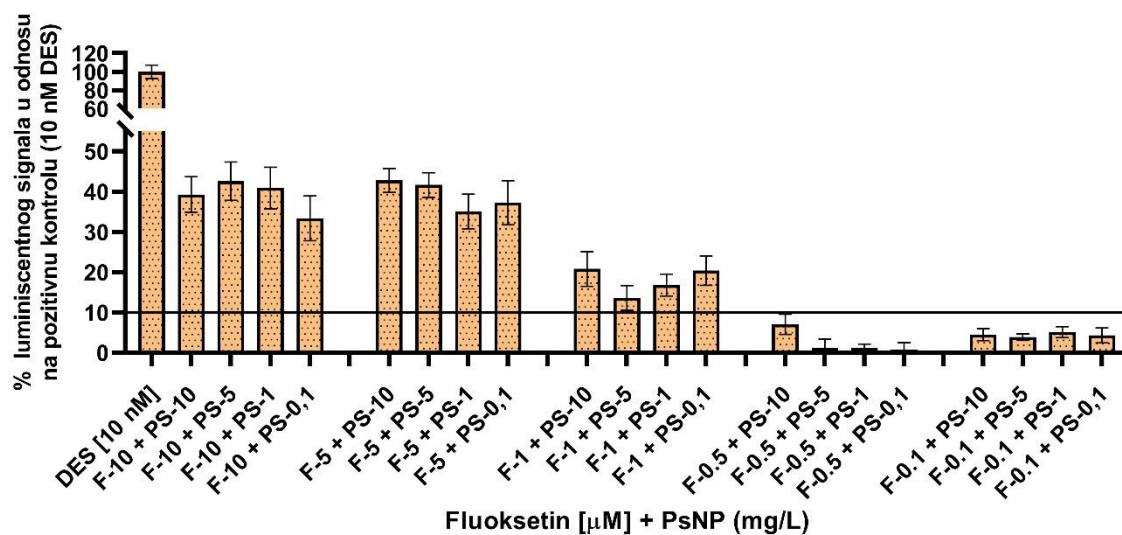
a)



b)



c)

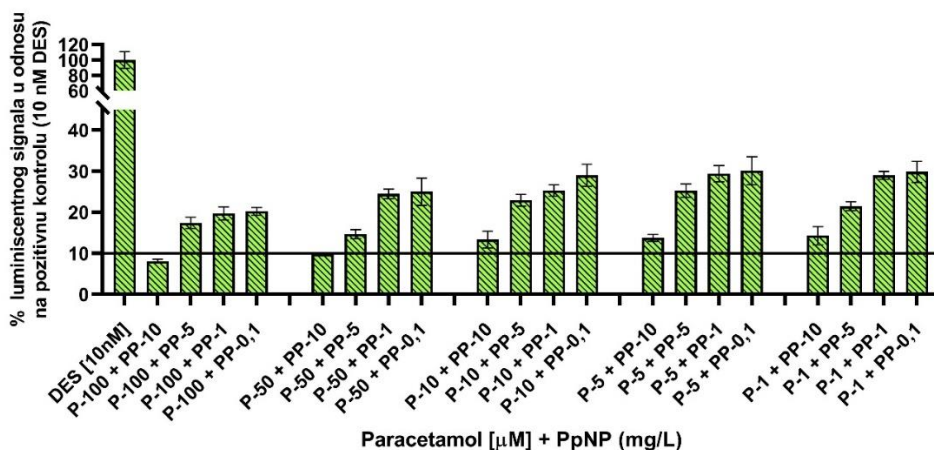


d)

**Slika 15.** Aktivnost ER uzrokovana tretmanom smjesama PsNP s a) paracetamolom, b) ibuprofenom, c) karbamazepinom i d) fluoksetinom. Rezultati su prikazani kao % luminiscentnog signala pozitivne kontrole (10 nM) DES. Ukoliko je odaziv ispitivane kemikalije >10 % luminiscentnog signala pozitivne kontrole (označeno punom linijom na grafu), kemikalija se smatra endokrino disruptivnom s obzirom na djelovanje na ER. Prikazani rezultati dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

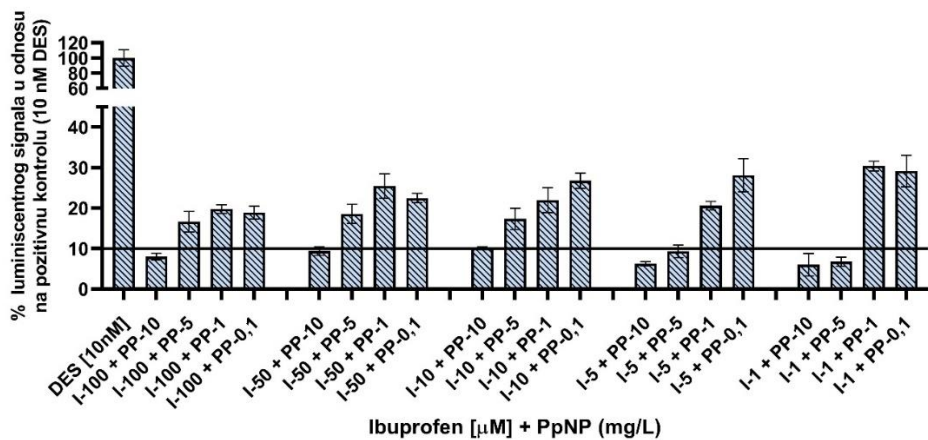
Pri višim dozama lijekova, bez obzira na to kolika je koncentracija primijenjena uz njih. Pri nižim koncentracijama lijeka, ne ostvaruje se endokrino disruptivni učinak. Ovisnost učinka o dozi lijeka znatno je viša za karbamazepin i fluoksetin, nego za paracetamol i ibuprofen. Paracetamol ostvaruje učinke preko 10 % DES u svim koncentracijama osim 1  $\mu\text{M}$ , dok je kod karbamazepina i fluoksetina ovisnost odgovora o koncentraciji znatno izraženija pa su i zajednički učinci u višim koncentracijama jači, a prestaju biti značajni već pri 5  $\mu\text{M}$  koncentraciji. Ibuprofen u kombinaciji s PsNP ostvaruje učinke preko 10 % DES samo pri koncentracijama od 10 i 5  $\mu\text{M}$ .

Kod PpNP i PeNP jasno je vidljiva razlika u smislu da je utjecaj koncentracije nanočestice na aktivaciju ER znatno važnija od koncentracije lijeka (Slike 16 i 17). Kod smjesa PpNP, PeNP i lijekova, za sve smjese vrijedi kako je utjecaj na aktivaciju ER izraženiji kada je koncentracija nanočestica manja. Dodatno se može primijetiti kako su % aktivacije ER u odnosu na pozitivnu kontrolu nešto viši kod smjesa lijekova i PpNP, nego kod smjesa lijekova i PeNP. Iz ovakvih rezultata moguće je zaključiti kako se lijekovi adsorbiraju na površinu nanočestica, a s obzirom na veći unos manjih nanočestica u stanice, dolazi do izraženih razlika u trendovima utjecaja koncentracije nanočestica na aktivnost ER. U slučaju PpNP i PeNP, unos lijeka u stanicu je manji kod većih koncentracija nanočestica, zbog čega su potentnije smjese s nižim koncentracijama nanočestica, dok je u slučaju PsNP situacija obrnuta te se može pretpostaviti kako je unos lijeka u stanicu pri većim koncentracijama PsNP u smjesi veći i stoga je učinak izraženiji.

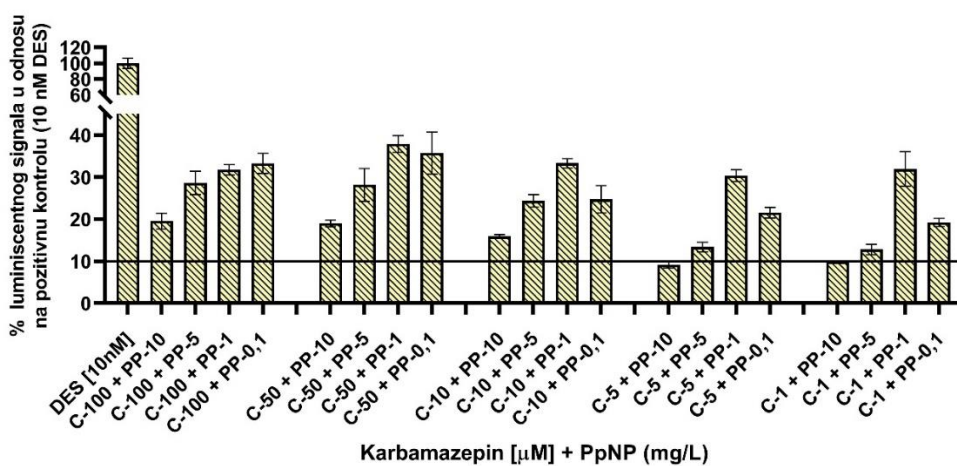


a)

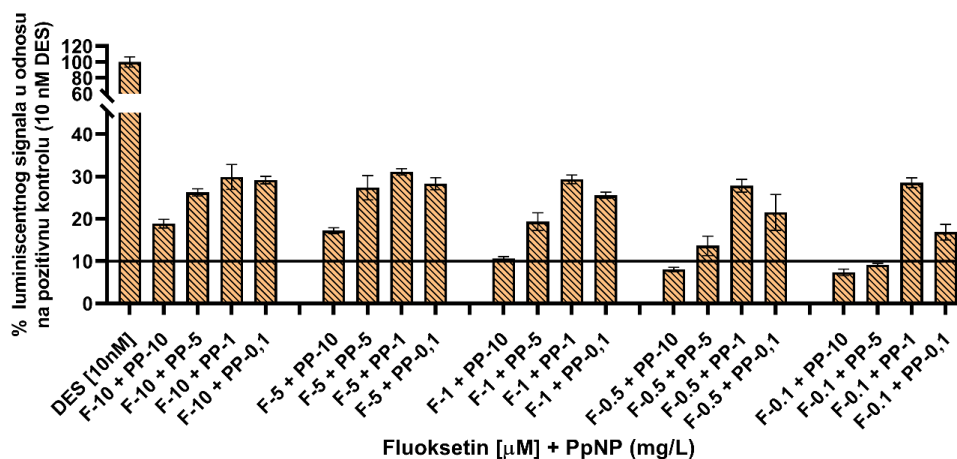




b)



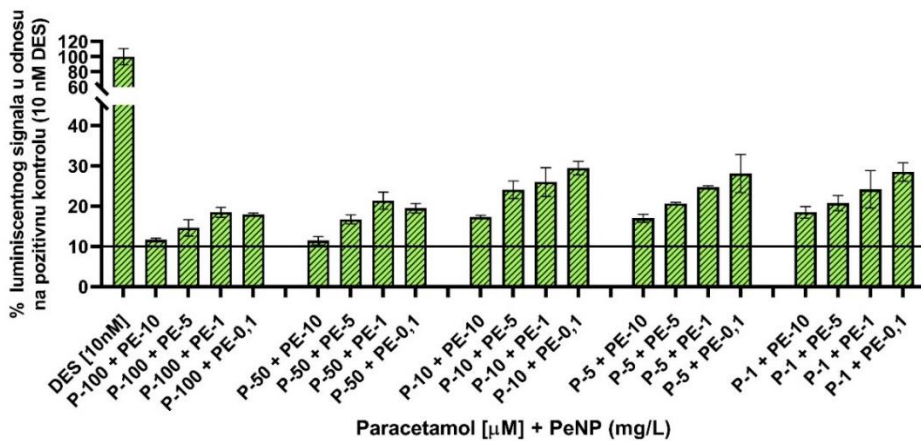
c)



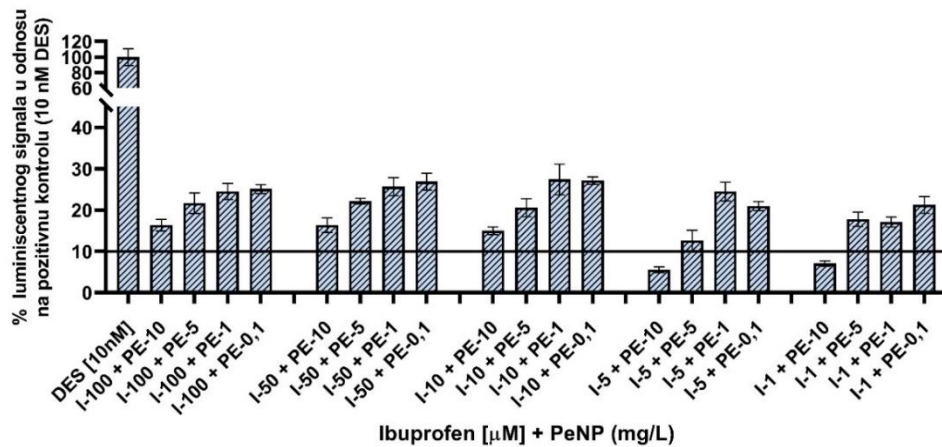
d)

**Slika 16.** Aktivnost ER uzrokovana tretmanom smjesama PpNP s a) paracetamolom, b) ibuprofenom, c) karbamazepinom i d) fluoksetinom. Rezultati su prikazani kao % luminiscentnog signala pozitivne kontrole (10 nM) DES. Ukoliko je odaziv ispitivane kemikalije >10 %

luminiscentnog signala pozitivne kontrole (označeno punom linijom na grafu), kemikalija se smatra endokrino disruptivnom s obzirom na djelovanje na ER. Prikazani rezultati dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

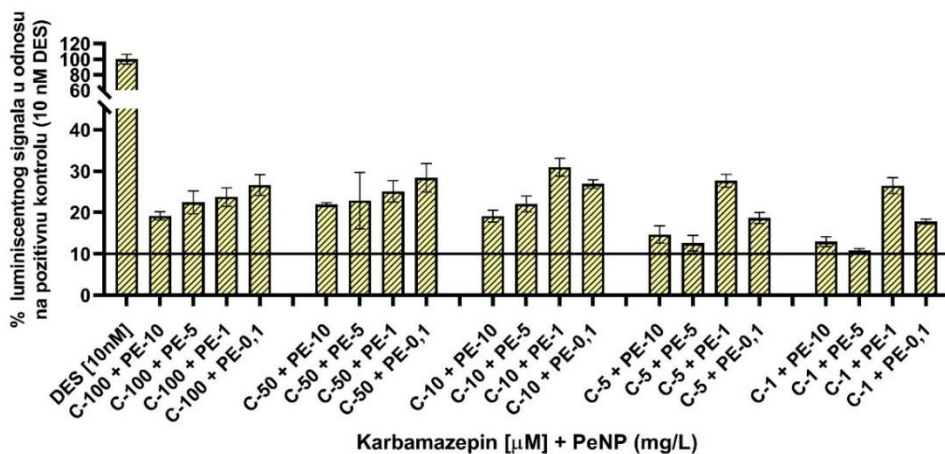


a)

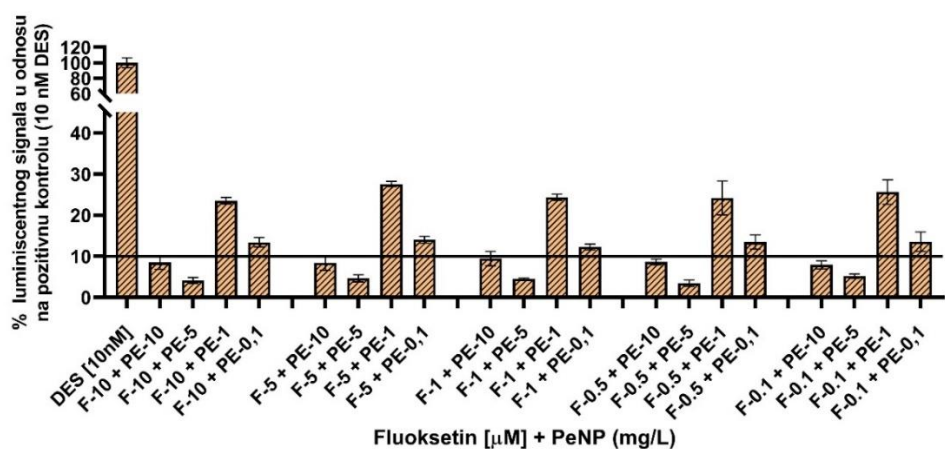


b)





c)



d)

**Slika 17.** Aktivnost ER uzrokovana tretmanom smjesama PeNP s a) paracetamolom, b) ibuprofenom, c) karbamazepinom i d) fluoksetinom. Rezultati su prikazani kao % luminescentnog signala pozitivne kontrole (10 nM) DES. Ukoliko je odaziv ispitivane kemikalije >10 % luminescentnog signala pozitivne kontrole (označeno punom linijom na grafu), kemikalija se smatra endokrino disruptivnom s obzirom na djelovanje na ER. Prikazani rezultati dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

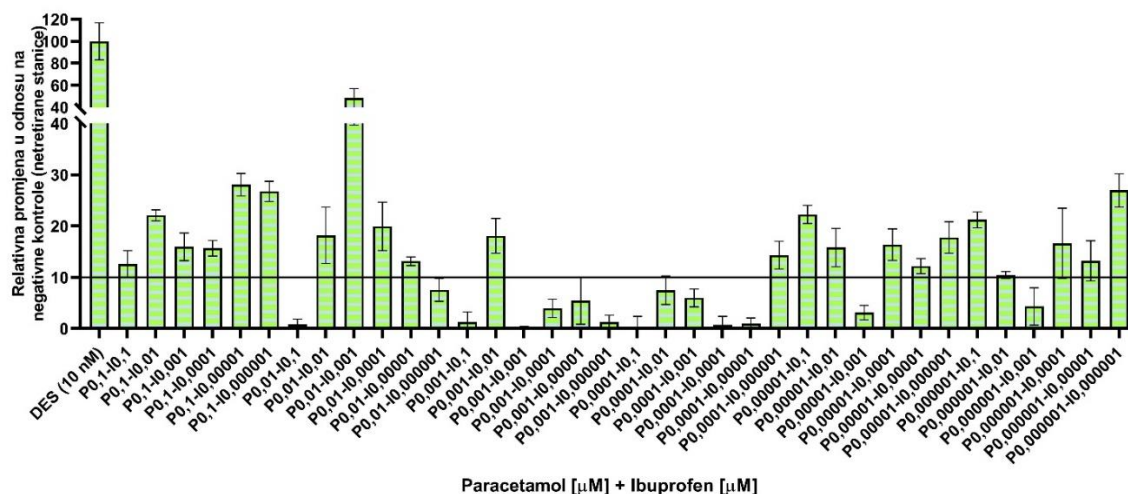
Zajednički učinci smjesa PNP i lijekova, analizirani su modelima adicije koncentracije i nezavisne akcije te su dobiveni koeficijenti i zaključak o sinergističkom ili antagonističkom uzorku prikazani u Tablicama 6 do 8 u poglavlju Prilozi. Očekivano s obzirom na rezultate, u većini smjesa dolazi do sinergističkog učinka komponenata u smjesi.

Rezultati ispitivanja binarnih i tercijarnih smjesa lijekova pokazuju znatno složenije interakcije lijekova koje iznimno ovise o kvalitativnom i kvantitativnom sastavu smjesa. Sastavi

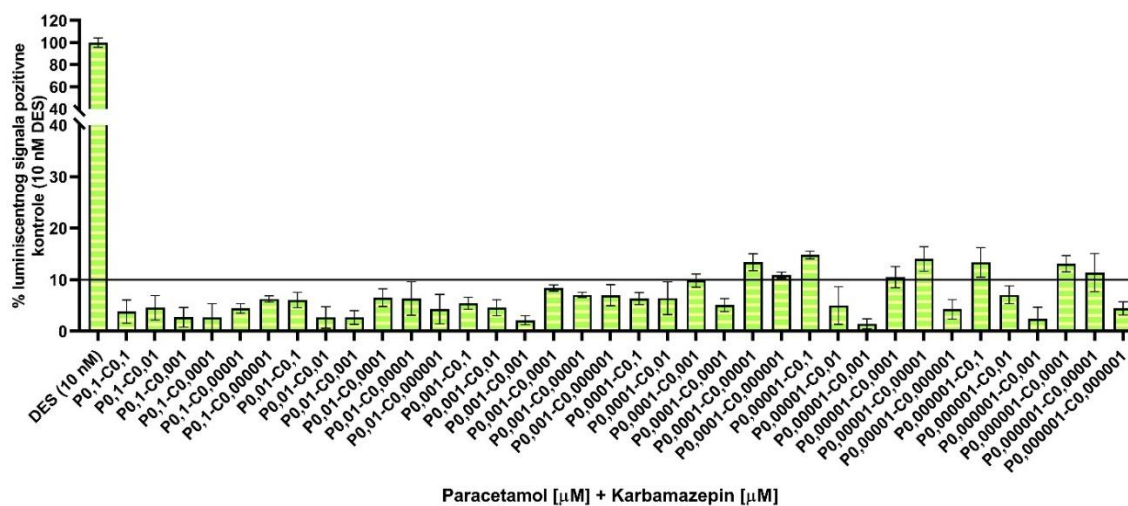
binarnih smjesa lijekova, kao i rezultati analize koncentracije adicije te nezavisne akcije prikazani su poglavljju Prilozi (Tablice 9-14). Pokušaj određivanja BMD za ove lijekove isproban u softveru PROAST, no sustav nije uspio generirati krivulje te izračunati adekvatne parametre, što potvrđuje kako se u ovom slučaju ne radi o aditivnim, već sinergističkim ili agonističkim učincima (Slike 42-47). Smjesa paracetamola i ibuprofena pokazala je sinergističke učinke pri vrlo najvišim ispitivanim koncentracijama paracetamola te pri najnižim koncentracijama paracetamola u smjesi (Slika 18), što producira svojevrsnu krivulju u obliku slova U kakva je opisana kod endokrinih disruptora, ali nije često opisana kod smjesa.

Efekti su također u pravilu bili izraženiji u slučajevima kada se omjer lijekova u smjesi znatno razlikuje (bilo u korist paracetamola ili ibuprofena). Smjesa paracetamola i karbamazepina u većini slučajeva, osim pri niskim koncentracijama i jednog i drugog lijeka, pokazala je antagonističke učinke (Slika 19). Rezultati iz kojih je vidljivo kako je antagonistički efekt izraženiji kod viših doza lijekova, mogli bi upućivati na kompetitivni antagonizam ovih dvaju lijekova. Kod vrlo niskih koncentracija, takav efekt izostaje te se javlja sinergistički učinak.

Interakcije paracetamola i fluoksetina primarno su antagonističke, osim u smjesama koje sadrže vrlo slične koncentracije oba lijeka pri sredini raspona koncentracija (Slika 20). Ovakve efekte teško je objasniti čak i uz pregled literature, jer nisu ranije opisivane. Moguće je da se opet radi o efektu endokrinih disruptora koji su karakterizirani nelinearnim krivuljama, ali takve bi efekte trebalo potvrditi korištenjem složenijih matematičkih funkcija i modela i generiranjem 3D ploha odgovora.

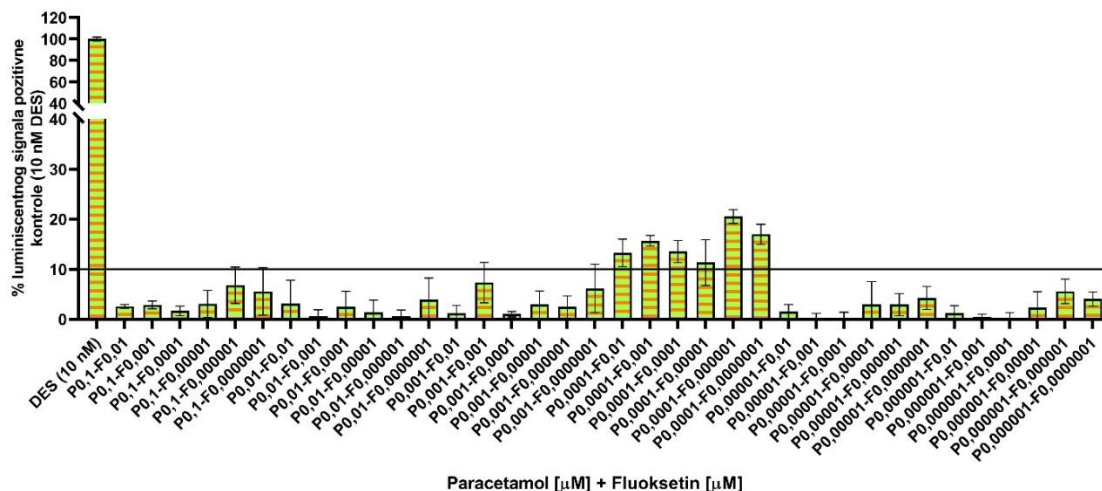


**Slika 18.** Aktivnost ER uzrokovana tretmanom smjesama paracetamola i ibuprofena u koncentracijama od  $1 \times 10^{-5}$  -  $0,1 \mu\text{M}$ . Rezultati su prikazani kao % luminiscentnog signala pozitivne kontrole (10 nM) DES. Ukoliko je odaziv ispitivane kemikalije >10 % luminiscentnog signala pozitivne kontrole (označeno punom linijom na grafu), kemikalija se smatra endokrino disruptivnom s obzirom na djelovanje na ER. Prikazani rezultati dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.



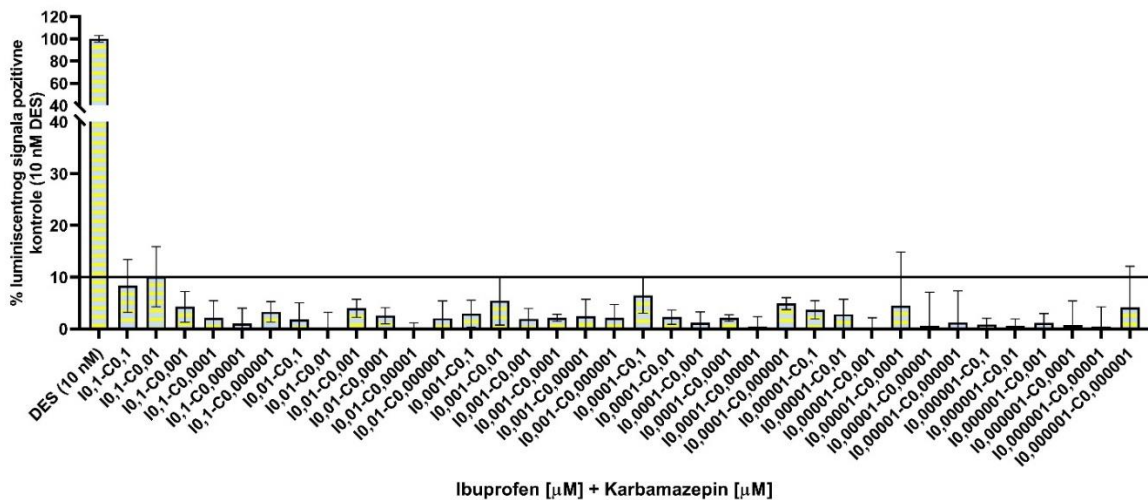
**Slika 19.** Aktivnost ER uzrokovana tretmanom smjesama paracetamola i karbamazepine u koncentracijama od  $1 \times 10^{-5}$  -  $0,1 \mu\text{M}$ . Rezultati su prikazani kao % luminiscentnog signala pozitivne kontrole (10 nM) DES. Ukoliko je odaziv ispitivane kemikalije >10 % luminiscentnog signala pozitivne kontrole (označeno punom linijom na grafu), kemikalija se smatra endokrino

disruptivnom s obzirom na djelovanje na ER. Prikazani rezultati dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

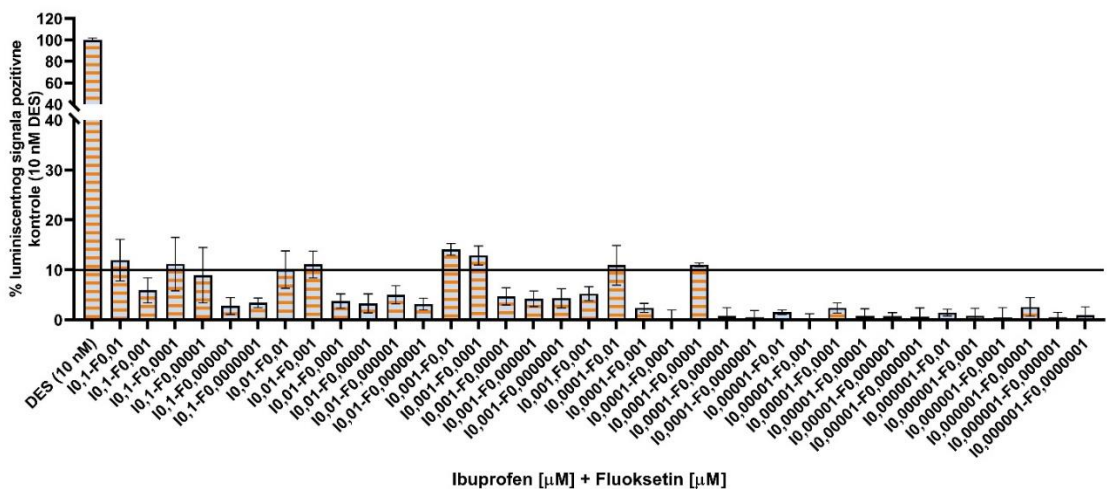


**Slika 20.** Aktivnost ER uzrokovana tretmanom smjesama paracetamola koncentracijama od  $1 \times 10^{-5}$  - 0,1  $\mu\text{M}$  i fluoksetina u koncentracijama od  $1 \times 10^{-6}$  - 0,01  $\mu\text{M}$ . Rezultati su prikazani kao % luminescentnog signala pozitivne kontrole (10 nM) DES. Ukoliko je odaziv ispitivane kemikalije >10 % luminescentnog signala pozitivne kontrole (označeno punom linijom na grafu), kemikalija se smatra endokrino disruptivnom s obzirom na djelovanje na ER. Prikazani rezultati dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

Učinci smjesa ibuprofena i karbamazepina (Slika 21) u skoro su svim slučajevima antagonistički, a smjese ibuprofena i fluoksetina (Slika 22) pokazuju synergističke učinke pri višim dozama ibuprofena, dok se prema nižim dozama javlja antagonistički učinak. U prvom slučaju nema nikakvih signifikantosti koje bi ukazivale na trend ponašanja smjesa, dok se kod smjese ibuprofena i fluoksetina vidi ovisnost aktivacije ER i o koncentraciji fluoksetina (s padom koncentracije pada i odziv na receptoru za istu koncentraciju ibuprofena) i o koncentraciji ibuprofena (pri nižim koncentracijama je odziv manji od 10 % i učinak antagonistički). Slična je situacija i kod smjese karbamazepina i fluoksetina (Slika 23), no u tom slučaju je prisutno znatno više smjesa synergističkog učinka. Agonistički učinak na ER i u ovom je slučaju ovisan o dozi fluoksetina. Ovakve interakcije mogle bi upućivati na odnos parcijalnih agonista između karbamazepina i ibuprofena i fluoksetina.



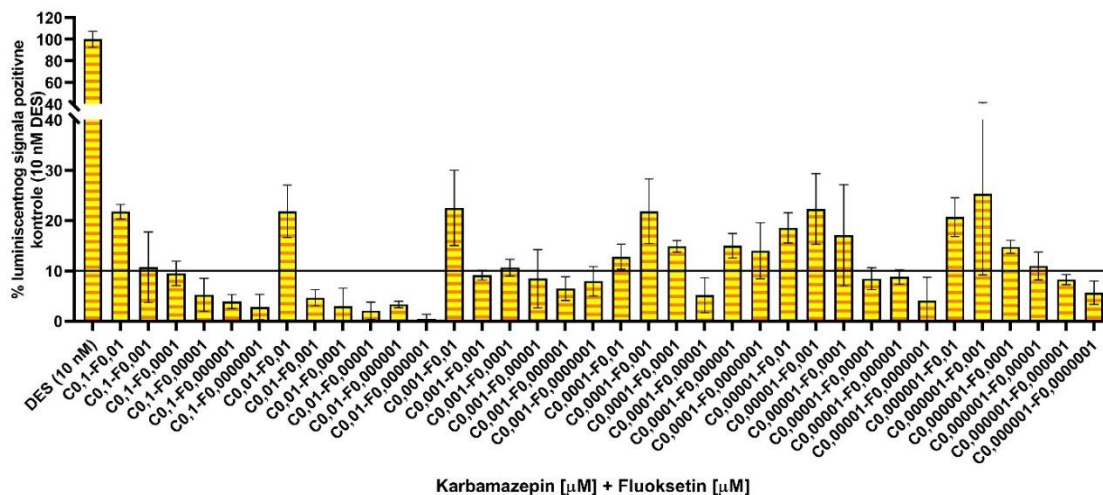
**Slika 21.** Aktivnost ER uzrokovana tretmanom smjesama ibuprofena i karbamazepina u koncentracijama od  $1 \times 10^{-5}$  - 0,1  $\mu\text{M}$ . Rezultati su prikazani kao % luminiscentnog signala pozitivne kontrole (10 nM) DES. Ukoliko je odaziv ispitivane kemikalije >10 % luminiscentnog signala pozitivne kontrole (označeno punom linijom na grafu), kemikalija se smatra endokrino disruptivnom s obzirom na djelovanje na ER. Prikazani rezultati dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.



**Slika 22.** Aktivnost ER uzrokovana tretmanom smjesama paracetamola koncentracijama od  $1 \times 10^{-5}$  - 0,1  $\mu\text{M}$  i fluoksetina u koncentracijama od  $1 \times 10^{-6}$  - 0,01  $\mu\text{M}$ . Rezultati su prikazani kao % luminiscentnog signala pozitivne kontrole (10 nM) DES. Ukoliko je odaziv ispitivane kemikalije >10 % luminiscentnog signala pozitivne kontrole (označeno punom linijom na grafu), kemikalija



se smatra endokrino disruptivnom s obzirom na djelovanje na ER. Prikazani rezultati dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

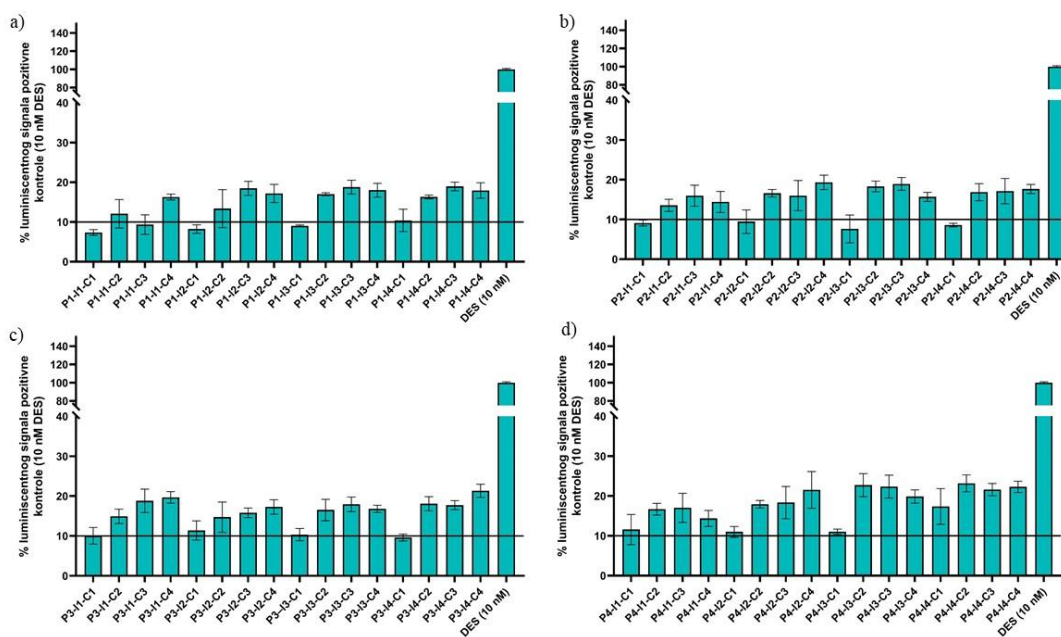


**Slika 23.** Aktivnost ER uzrokovana tretmanom smjesama karbamazepina koncentracijama od  $1 \times 10^{-5}$  - 0,1 μM i fluoksetina u koncentracijama od  $1 \times 10^{-6}$  - 0,01 μM. Rezultati su prikazani kao % luminiscentnog signala pozitivne kontrole (10 nM) DES. Ukoliko je odaziv ispitivane kemikalije >10 % luminiscentnog signala pozitivne kontrole (označeno punom linijom na grafu), kemikalija se smatra endokrino disruptivnom s obzirom na djelovanje na ER. Prikazani rezultati dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

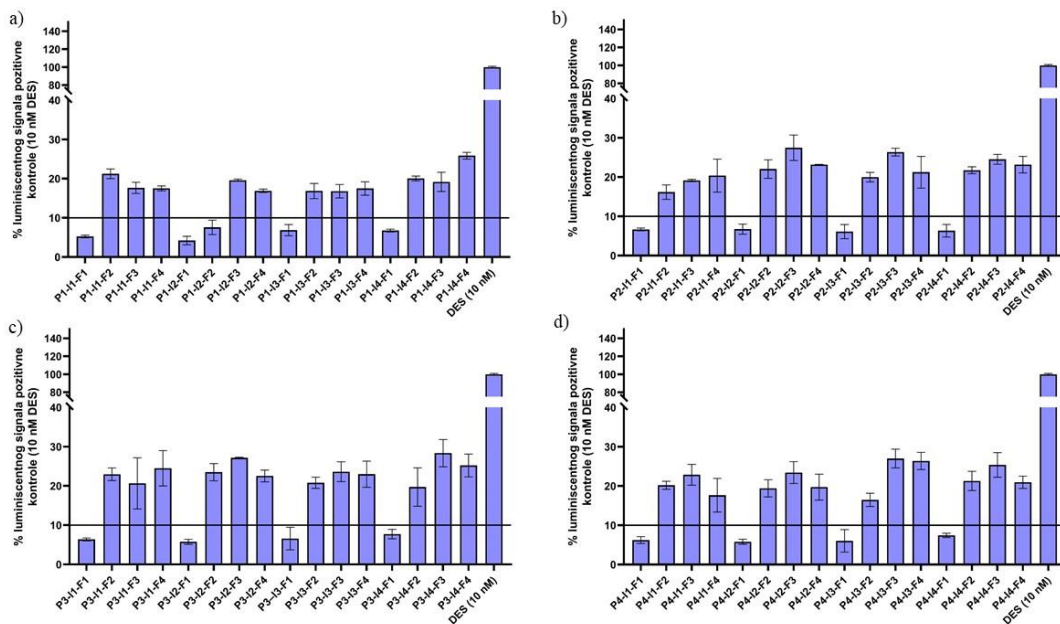
Za ispitivanje učinaka tercijarnih smjesa lijekova na aktivnost receptora, stanice su tretirane koncentracijama kako je navedeno u Tablicama 15 do 18 u poglavlju Prilozi. S obzirom na to kako je prethodno korišteni model adicije koncentracije, kao i nezavisne akcije prilagođen isključivo za binarne smjese, a modeli za analizu učinaka tercijarnih smjesa zahtijevaju visoku razinu poznavanja matematičkih i statističkih funkcija, kao i pripreme 3D krivulja i ploha odgovora iz kojih se može procijeniti je li djelovanje sinergističko ili antagonističko, u ovoj disertaciji takva analiza nije odrađena, već su smjese ispitane u punom faktorijalnom dizajnu kako bi se pokrile sve moguće kombinacije, a rezultati su prikazani grafički te opisno.

Kod smjesa koje sadrže paracetamol i ibuprofen u kombinaciji sa karbamazepinom i fluoksetinom, uočljiv je trend prema kojem je agonistički učinak na aktivnost ER znatno slabiji pri višim koncentracijama karbamazepina ili fluoksetina (Slike 24 i 25). Ovakvi rezultati ukazuju na

određene kompetitivne interakcije karbamazepina i fluoksetina sa druga dva navedena lijeka u tercijskim smjesama.



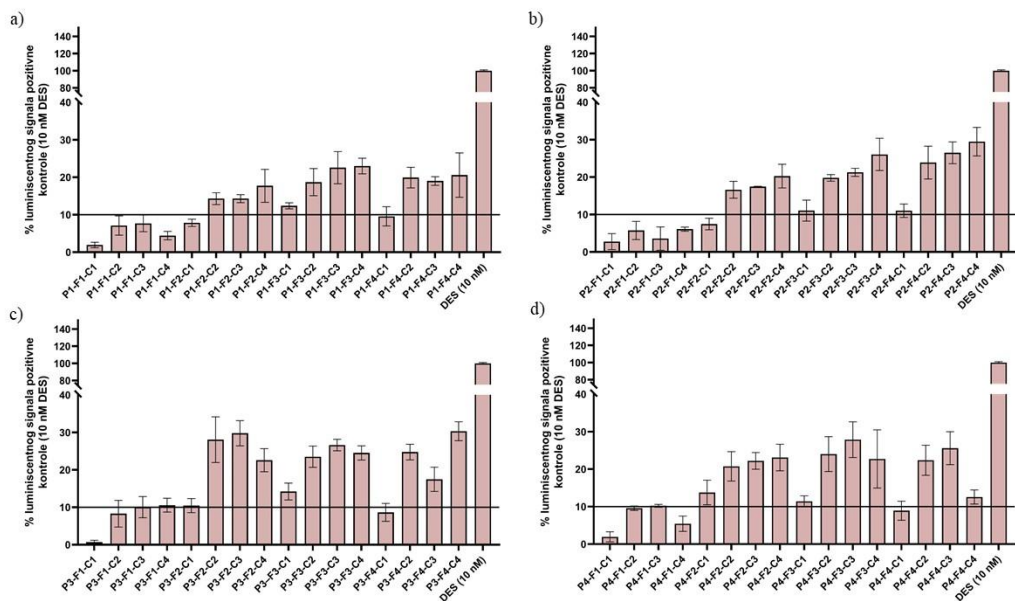
**Slika 24.** Aktivnost ER uzrokovana tretmanom smjesama paracetamola, ibuprofena i karbamazepina. Rezultati su prikazani kao % luminescentnog signala pozitivne kontrole (10 nM) DES. Ukoliko je odaziv ispitivane kemikalije >10 % luminescentnog signala pozitivne kontrole (označeno punom linijom na grafu), kemikalija se smatra endokrino disruptivnom s obzirom na djelovanje na ER. Prikazani rezultati dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.



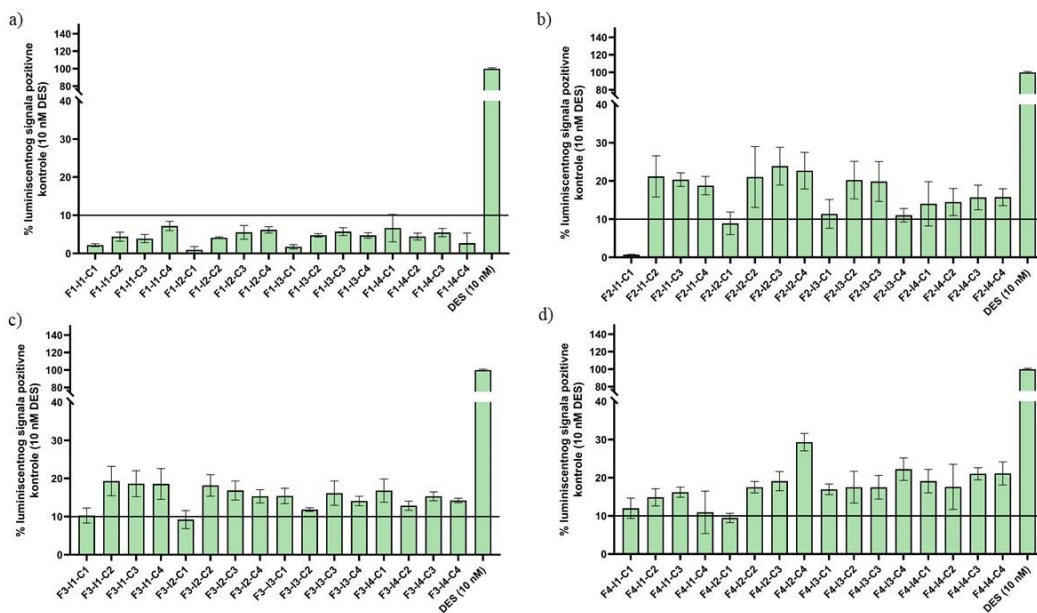
**Slika 25.** Aktivnost ER uzrokovana tretmanom smjesama paracetamola, ibuprofena i fluoksetina. Rezultati su prikazani kao % luminiscentnog signala pozitivne kontrole (10 nM DES). Ukoliko je odaziv ispitivane kemikalije >10 % luminiscentnog signala pozitivne kontrole (označeno punom linijom na grafu), kemikalija se smatra endokrino disruptivnom s obzirom na djelovanje na ER. Prikazani rezultati dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

Kod tercijarnih smjesa paracetamola i ibuprofena sa uključenima i karbamazepinom i fluoksetinom, trend se značajno mijenja u odnosu na prve dvije situacije (Slika 26 i 27). Sve smjese koje sadrže najveće koncentracije fluoksetina u ovom slučaju uzrokuju odgovor smjese koji je manji od 10 % odgovora pozitivne kontrole. S druge strane, s padom koncentracija fluoksetina, počinje se uočavati kako s padom koncentracije karbamazepina odgovor također raste. S obzirom na sve rezultate dobivene aktivacijom ER tercijarnim smjesama odabranih lijekova, moguće je zaključiti kako su učinci takvih smjesa znatno izraženiji u odnosu na individualne komponente, ali i binarne smjese. Dodatno, fluoksetin i karbamazepin pokazuju kompetitivne interakcije sa paracetamolom i ibuprofenom.





**Slika 26.** Aktivnost ER uzrokovana tretmanom smjesama paracetamola, karbamazepina i fluoksetina. Rezultati su prikazani kao % luminiscentnog signala pozitivne kontrole (10 nM) DES. Ukoliko je odaziv ispitivane kemikalije >10 % luminiscentnog signala pozitivne kontrole (označeno punom linijom na grafu), kemikalija se smatra endokrino disruptivnom s obzirom na djelovanje na ER. Prikazani rezultati dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.



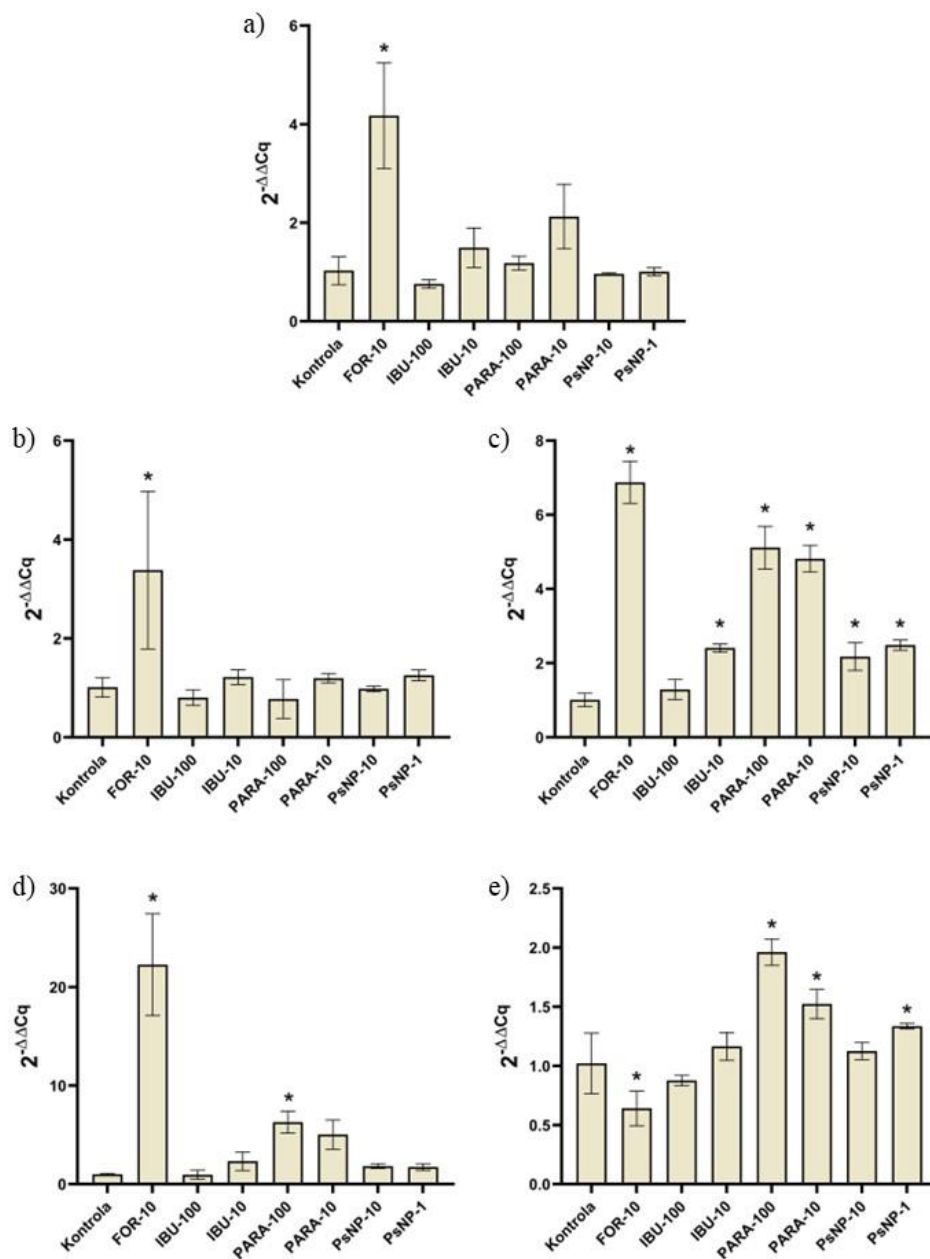
**Slika 27.** Aktivnost ER uzrokovana tretmanom smjesama fluoksetina, ibuprofena, i karbamazepina. Rezultati su prikazani kao % luminescentnog signala pozitivne kontrole (10 nM) DES. Ukoliko je odaziv ispitivane kemikalije >10 % luminescentnog signala pozitivne kontrole (označeno punom linijom na grafu), kemikalija se smatra endokrino disruptivnom s obzirom na djelovanje na ER. Prikazani rezultati dobiveni su iz triplikata dvaju ponovljenih eksperimenata.

## 4.5. Učinak na proces steroidogeneze

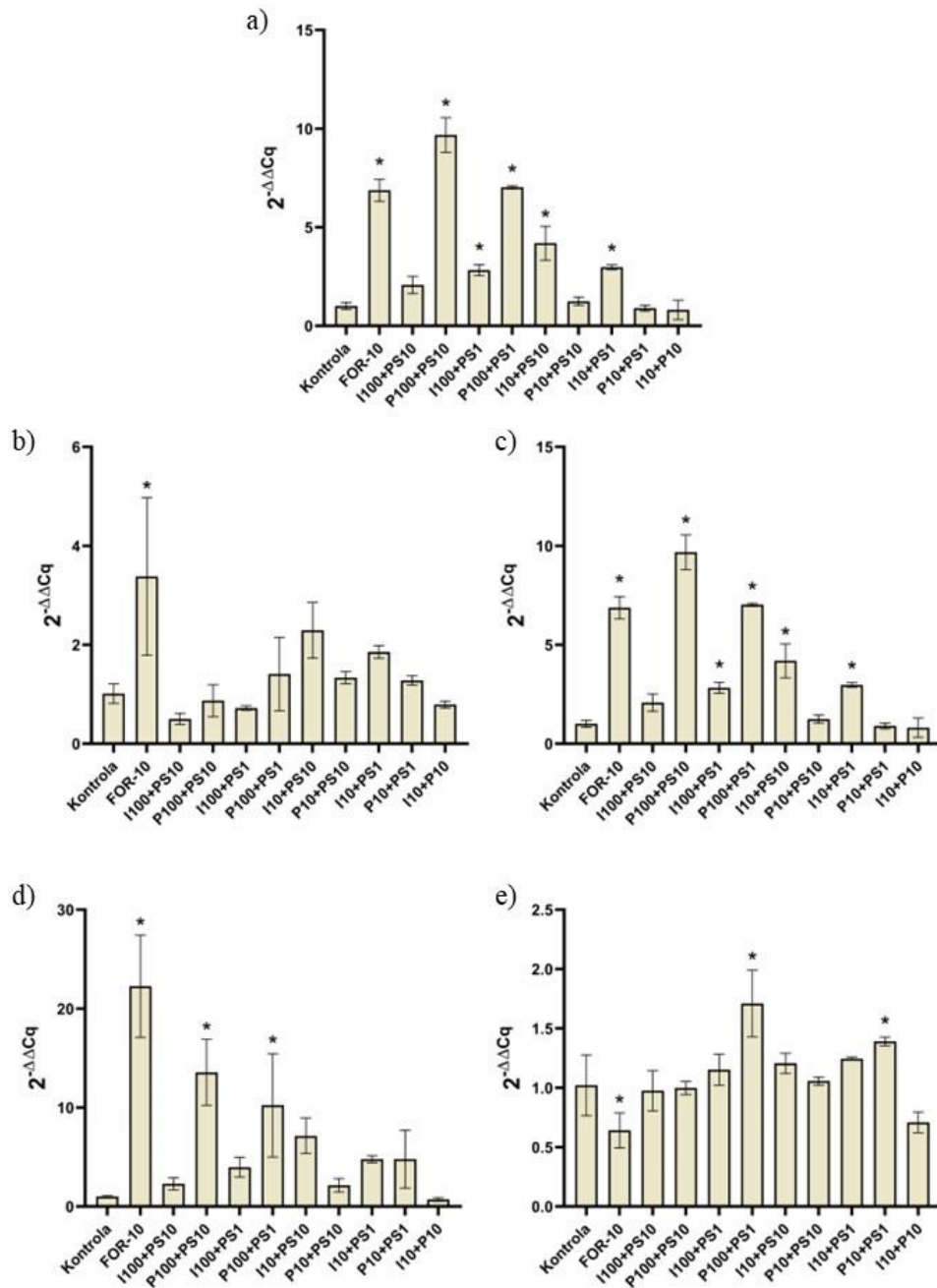
### 4.5.1. Utjecaj na ekspresiju gena

Promjene u ekspresiji gena steroidogeneze utvrđene su metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu nakon 48 satnog tretmana paracetamolom, ibuprofenom te PsNP i njihovim smjesama. Smjese su pokazale značajnije promjene u ekspresiji gena u procesu steroidogeneze nego individualne komponente (Slike 28 i 29).

Kod tretmana pojedinačnim sastavnicama, najveće promjene u ekspresiji gena uočene su za  $3\beta$ -HSD i  $17\beta$ -HSD, dok je kod smjesa učinak na promjenu ekspresije bio najizraženiji za  $3\beta$ -HSD i *CYP11*. Paracetamol i PsNP pojačavaju ekspresiju spomenutih enzima, a njihove smjese dodatno naglašavaju takav učinak. Zanimljivo je kako ibuprofen uglavnom uzrokuje porast ekspresije enzima u nižoj koncentraciji, dok pri višoj koncentraciji takav efekt izostaje. Kod smjesa, dodatno je moguće uočiti povišenu ekspresiju *CYP19* kod tretmana smjesama paracetamola i PsNP.



**Slika 28.** Promjene u ekspresiji gena a) *CYP11*, b) *CYP17*, c) *3β-HSD*, d) *CYP19* i e) *17β-HSD* uslijed tretmana paracetamolom, ibuprofenom te PsNP. Promjene u ekspresiji gena izračunate su metodom  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ , a dobivene su iz tehničkih triplikata iz dvaju eksperimenata. Statistički značajne razlike u odnosu na negativne kontrole ( $p < 0,05$ ) označene su zvjezdicom (\*).



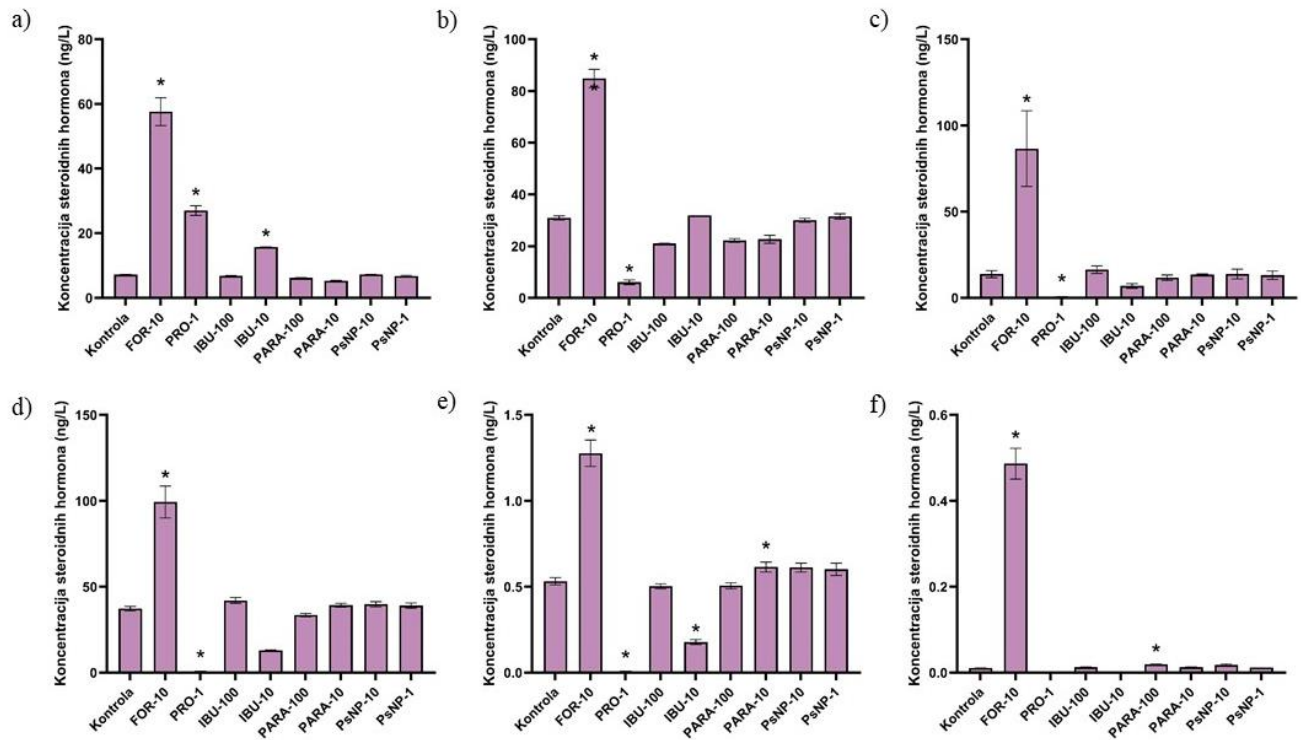
**Slika 29.** Promjene u ekspresiji gena a) *CYP11*, b) *CYP17*, c) *3β-HSD*, d) *CYP19* i e) *17β-HSD* uslijed tretmana smjesama paracetamola, ibuprofena te PsNP. Promjene u ekspresiji gena izračunate su metodom  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ , a dobivene su iz tehničkih triplikata iz dvaju eksperimenata. Statistički značajne razlike u odnosu na negativne kontrole ( $p < 0,05$ ) označene su zvjezdicom (\*).

#### 4.5.2. Utjecaj na produkciju steroidnih hormona

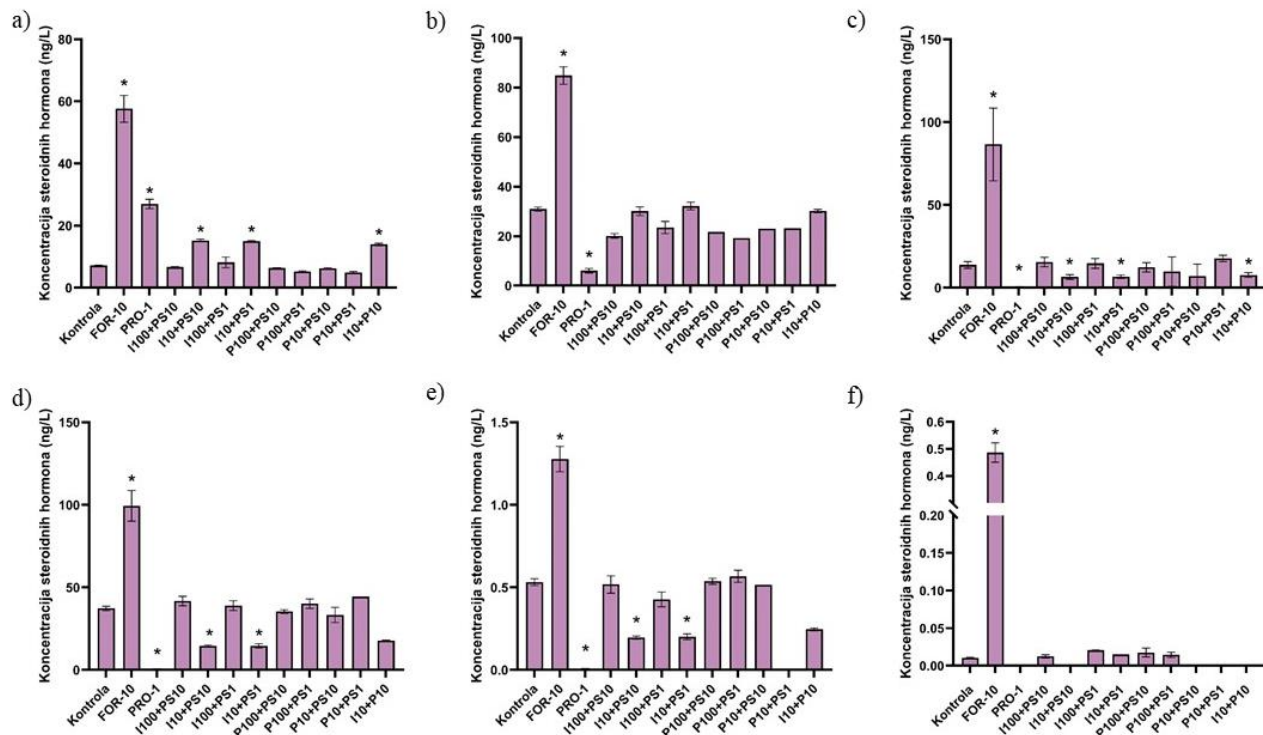
Produkcija steroidnih hormona ispitana je vezanim sustavom tekućinske kromatografije i tandem masene spektrometrije. Tretmani su bili identični kao kod utvrđivanja promjene ekspresije gena, a rezultati su dobiveni iz bioloških duplikata iz 2 eksperimenta.

Ibuprofen u nižoj dozi od 10  $\mu\text{M}$  statistički značajno povećava produkciju progesterona, jednog od prvih hormona u steroidogenezi. Iako razlika nije statistički značajna u oba slučaja, kod te doze ibuprofena javlja se i porast ekspresije  $3\beta\text{-HSD}$  i  $CYP17$  gena. Enzim  $3\beta\text{-HSD}$  prevodi pregnenolon u progesteron, a  $CYP17$  prevodi progesteron u 17-OH progesteron. Produkcija 17-OH progesterona također je pojačana, dok je produkcija svih daljnjih hormona u kaskadi kod tretmana sa 10  $\mu\text{M}$  ibuprofena snižena. Iz toga se da zaključiti kako ibuprofen uzrokuje nakupljanje navedenih produkata i ima inhibitorni učinak na sintezu steroidnih hormona nakon tog koraka. Takav rezultat u skladu je s prethodno utvrđenim činjenicama u literaturnim navodima (113,116,117). Identičan učinak, ali nešto izraženiji, uzrokuje i smjesa 10  $\mu\text{M}$  ibuprofena i 10 mg/L PsNP. Paracetamol uzrokuje statistički značajan porast koncentracija testosterona i estradiola (Slika 30). Što se ekspresije gena tiče, paracetamol je potaknuo ekspresiju  $17\beta\text{-HSD}$  i  $CYP19$ , gena za enzime koji prevode androstendion u testosteron i estron te kataliziraju njihovo prevođenje u estradiol. Može se stoga zaključiti kako paracetamol potiče proces steroidogeneze kroz cijeli njegov tijek.

Učinci smjesa ibuprofena i paracetamola sa ili bez PsNP na proces steroidogeneze, prikazani su na slici 31. Smjese ibuprofena i PsNP učinke su ostvarile pri nižim koncentracijama ibuprofena, ali bez ovisnosti o koncentraciji PsNP u smjesi. Učinci su isti kao i kod individualne komponente, ali ponešto jači, iako ne statistički značajno kao što je bio slučaj kod utjecaja smjesa PNP i lijekova na aktivnost ER. Izraženije učinke smjesa u odnosu na individualne komponente moguće je uočiti i kod analize ekspresije gena uključenih u steroidogenezu, posebice kod smjesa paracetamola i PsNP. Smjese paracetamola i PsNP također ostvaruju učinke vrlo slične učincima samog paracetamola, no u ovom slučaju one nisu izražene kao kod smjesa s ibuprofenom. Zanimljiva je i činjenica kako je smjesa koja sadrži jednake koncentracije ibuprofena i paracetamola u NCI-H295R stanicama i kod ekspresije enzima i kod sinteze steroidnih hormona pokazale učinke slične ibuprofeno, iz čega se može zaključiti kako je njegov utjecaj na navedene procese izraženiji od utjecaja paracetamola kada su ti lijekovi pomiješani.



**Slika 30.** Promjene u koncentraciji hormona a) progesterona, b) 17-OH-progesterona, c) dehidroepiandrosterona, d) androstendiona, e) testosterona i f) estradiola uslijed tretmana uslijed tretmana paracetamolom, ibuprofenom te PsNP. Rezultati su prikazani kao koncentracija hormona (ng/L), a dobiveni su iz bioloških duplikata dvaju ponovljenih eksperimenata. Statistički značajne razlike u odnosu na negativne kontrole ( $p < 0,05$ ) označene su zvjezdicom (\*).



**Slika 31.** Promjene u koncentraciji hormona a) progesterona, b) 17-OH-progesterona, c) dehidroepiandrosterona, d) androstendiona, e) testosterona i f) estradiola uslijed tretmana uslijed tretmana smjesama paracetamola, ibuprofena te PsNP. Rezultati su prikazani kao koncentracija hormona (ng/L), a dobiveni su iz bioloških duplikata dvaju ponovljenih eksperimenata. Statistički značajne razlike u odnosu na negativne kontrole ( $p < 0,05$ ) označene su zvjezdicom (\*).



## 5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenog istraživanja i dobivenih rezultata, moguće je zaključiti slijedeće:

- PsNP, PpNP i PeNP sferičnog su oblika, njihove primarne veličine odgovaraju navedenima od strane proizvođača te su sve karakterizirane negativnim vrijednostima  $\zeta$  potencijala;
- koncentracije lijekova i PNP odabrane za ispitivanje endokrino disruptivnih učinaka ne uzrokuju značajno smanjenje preživljenja stanica ili pokretanje procesa programirane stanične smrti;
- PeNP su ostvarile statistički značajno agonističko djelovanje prema ER, dok druga dva tipa nanočestica nisu;
- smjesa PNP (1 mg/L svake PNP) ostvarila je značajno agonističko djelovanje prema ER te aditivne učinke u odnosu na individualne komponente smjese;
- niti jedan od 4 lijeka kao zasebna komponenta ne ostvaruje agonističku aktivnost prema estrogenskom receptoru;
- binarne smjese različitih kombinacija lijekova pokazale su sinergističke i antagonističke učinke koji su ovisni o kvalitativnom i kvantitativnom sastavu smjese;
- binarne smjese lijekova s PNP pokazuju uglavnom sinergističko djelovanje pri čemu je biološki odgovor kod smjesa sa PsNP ovisan primarno o koncentraciji lijeka u smjesi, dok kod smjesa PpNP i PeNP s lijekovima ovisi i o koncentracijama nanočestica u smjesi;
- tercijarne smjese lijekova u znatno više slučajeva izazvale su efekt pojačanja učinka prilikom ispitivanja nego efekt smanjenja učinka;
- analizom utjecaja binarnih i tercijarnih smjesa lijekova na aktivnost ER, uočava se kako postoje određene antagonističke interakcije između fluoksetina i karbamazepina i sa paracetamolom i sa ibuprofenom, ali ih nije moguće detaljno opisati postojećim statističkim modelima;
- kod ispitivanja utjecaja na steroidogenezu ibuprofen je uzrokovao povišenje koncentracija progesterona i 17-OH progesterona te enzima kojima su ti hormoni supstrati i produkti;
- paracetamol je uzrokovao pojačanu produkciju testosterona i 17 $\beta$ -estradiola te povišenje ekspresije gotovo svih enzima uključenih u proces steroidogeneze;
- same PsNP nemaju primjetne učinke na proces steroidogeneze, ali kada su prisutne u smjesama, pojačavaju učinke lijekova.

## 6. POPIS LITERATURE

1. Rios Mendoza LM, Karapanagioti H, Álvarez NR. Micro(nanoplastics) in the marine environment: Current knowledge and gaps. *Curr Opin Environ Sci Heal* 2018;1:47–51.
2. Zhang Q, Zhao Y, Du F, Cai H, Wang G, Shi H. Microplastic Fallout in Different Indoor Environments. *Environ Sci Technol* 2020;54:6530–9.
3. Prata JC, da Costa JP, Lopes I, Duarte AC, Rocha-Santos T. Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *Sci Total Environ* 2020;702:134455.
4. Lehner R, Weder C, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B. Emergence of Nanoplastic in the Environment and Possible Impact on Human Health. *Environ Sci Technol* 2019;53:1748–65.
5. Ng EL, Huerta Lwanga E, Eldridge SM, Johnston P, Hu HW, Geissen V, i ostali. An overview of microplastic and nanoplastic pollution in agroecosystems. *Sci Total Environ* 2018;627:1377–88.
6. Cole M, Lindeque P, Halsband C, Galloway TS. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. *Mar Pollut Bull* 2011;62:2588–97.
7. Sharma VK, Ma X, Lichtfouse E, Robert D. Nanoplastics are potentially more dangerous than microplastics. *Environ Chem Lett* 2022:2–5.
8. Capriotti M, Cocci P, Bracchetti L, Cottone E, Scandiffio R, Caprioli G, i ostali. Microplastics and their associated organic pollutants from the coastal waters of the central Adriatic Sea (Italy): Investigation of adipogenic effects in vitro. *Chemosphere* 2021;263.
9. Qian N, Gao X, Lang X, Deng H, Bratu TM, Chen Q, i ostali. Rapid single-particle chemical imaging of nanoplastics by SRS microscopy. *Proc Natl Acad Sci* 2024;121.
10. Rubio L, Marcos R, Hernández A. Potential adverse health effects of ingested micro- and nanoplastics on humans. Lessons learned from in vivo and in vitro mammalian models. *J Toxicol Environ Heal - Part B Crit Rev* 2020;23:51–68.
11. Smith M, Love DC, Rochman CM, Neff RA. Microplastics in Seafood and the Implications for Human Health. *Curr Environ Heal reports* 2018;5:375–86.
12. Prata JC, Alves JR, da Costa JP, Duarte AC, Rocha-Santos T. Major factors influencing the quantification of Nile Red stained microplastics and improved automatic quantification (MP-VAT 2.0). *Sci Total Environ* 2020;719.

13. Leslie HA, van Velzen MJM, Brandsma SH, Vethaak AD, Garcia-Vallejo JJ, Lamoree MH. Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environ Int* 2022;163:107199.
14. Schirinzi GF, Pérez-Pomeda I, Sanchís J, Rossini C, Farré M, Barceló D. Cytotoxic effects of commonly used nanomaterials and microplastics on cerebral and epithelial human cells. *Environ Res* 2017;159:579–87.
15. Ragusa A, Notarstefano V, Svelato A, Belloni A, Gioacchini G, Blondeel C, i ostali. Raman Microspectroscopy Detection and Characterisation of Microplastics in Human Breastmilk. *Polymers (Basel)* 2022;14:2700.
16. Zhu L, Zhu J, Zuo R, Xu Q, Qian Y, AN L. Identification of microplastics in human placenta using laser direct infrared spectroscopy. *Sci Total Environ* 2023;856:159060.
17. Braun T, Ehrlich L, Henrich W, Koeppel S, Lomako I, Schwabl P, i ostali. Detection of Microplastic in Human Placenta and Meconium in a Clinical Setting. *Pharmaceutics* 2021;13:921.
18. Amato-Lourenço LF, Carvalho-Oliveira R, Júnior GR, dos Santos Galvão L, Ando RA, Mauad T. Presence of airborne microplastics in human lung tissue. *J Hazard Mater* 2021;416:126124.
19. Jenner LC, Rotchell JM, Bennett RT, Cowen M, Tentzeris V, Sadofsky LR. Detection of microplastics in human lung tissue using  $\mu$ FTIR spectroscopy. *Sci Total Environ* 2022;831:154907.
20. Abbasi S, Turner A. Human exposure to microplastics: A study in Iran. *J Hazard Mater* 2021;403:123799.
21. Wang L, Wu WM, Bolan NS, Tsang DCW, Li Y, Qin M, i ostali. Environmental fate, toxicity and risk management strategies of nanoplastics in the environment: Current status and future perspectives. *J Hazard Mater* 2021;401:123415.
22. Barceló D, Picó Y, Alfarhan AH. Microplastics: Detection in human samples, cell line studies, and health impacts. *Environ Toxicol Pharmacol* 2023;101.
23. Monteiro SC, Boxall ABA. Occurrence and Fate of Human Pharmaceuticals in the Environment, 2010, str. 53–154.
24. aus der Beek T, Weber F, Bergmann A, Hickmann S, Ebert I, Hein A, i ostali. Pharmaceuticals in the environment—Global occurrences and perspectives. *Environ*

- Toxicol Chem 2016;35:823–35.
25. Mezzelani M, Gorbi S, Regoli F. Pharmaceuticals in the aquatic environments: Evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. *Mar Environ Res* 2018;140:41–60.
  26. Mezzelani M, Peruzza L, D’Errico G, Milan M, Gorbi S, Regoli F. Mixtures of environmental pharmaceuticals in marine organisms: Mechanistic evidence of carbamazepine and valsartan effects on *Mytilus galloprovincialis*. *Sci Total Environ* 2023;860:160465.
  27. Alygizakis NA, Gago-Ferrero P, Borova VL, Pavlidou A, Hatzianestis I, Thomaidis NS. Occurrence and spatial distribution of 158 pharmaceuticals, drugs of abuse and related metabolites in offshore seawater. *Sci Total Environ* 2016;541:1097–105.
  28. Phong Vo HN, Le GK, Hong Nguyen TM, Bui XT, Nguyen KH, Rene ER, i ostali. Acetaminophen micropollutant: Historical and current occurrences, toxicity, removal strategies and transformation pathways in different environments. *Chemosphere* 2019;236:124391.
  29. Mitchell RA, Rathi S, Dahiya M, Zhu J, Hussaini T, Yoshida EM. Public awareness of acetaminophen and risks of drug induced liver injury: Results of a large outpatient clinic survey. *PLoS One* 2020;15:e0229070.
  30. Diener HC, Schneider R, Aicher B. Per-capita consumption of analgesics: A nine-country survey over 20 years. *J Headache Pain* 2008;9:225–31.
  31. Nunes B, Antunes SC, Santos J, Martins L, Castro BB. Toxic potential of paracetamol to freshwater organisms: A headache to environmental regulators? *Ecotoxicol Environ Saf* 2014;107:178–85.
  32. Hudec R, Božeková L, Tisoňová J. Consumption of three most widely used analgesics in six European countries. *J Clin Pharm Ther* 2012;37:78–80.
  33. Nunes B. Ecotoxicological Effects of the Drug Paracetamol: A Critical Review of Past Ecotoxicity Assessments and Future Perspectives. *Handb Environ Chem* 2020;96:131–45.
  34. Chen Y, Vymazal J, Březinová T, Koželuh M, Kule L, Huang J, i ostali. Occurrence, removal and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in rural wastewater treatment wetlands. *Sci Total Environ* 2016;566–567:1660–9.
  35. Wu J, Liu Z, Ma Q, Dai L, Dang Z. Occurrence, removal and risk evaluation of ibuprofen

- and acetaminophen in municipal wastewater treatment plants: A critical review. *Sci Total Environ* 2023;891:164600.
36. Bound JP, Voulvoulis N. Pharmaceuticals in the aquatic environment - A comparison of risk assessment strategies. *Chemosphere* 2004;56:1143–55.
  37. J. Zur, A. Pinski, A. Marchlewicz, K. Hupert-Kocurek, D. Wojcieszynska UG. Organic micropollutants paracetamol and ibuprofen—toxicity, biodegradation, and genetic background of their utilization by bacteria 2011;2284:1–4.
  38. Wu S, Zhang L, Chen J. Paracetamol in the environment and its degradation by microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;96:875–84.
  39. Khan S, Naushad M, Govarathanan M, Iqbal J, Alfadul SM. Emerging contaminants of high concern for the environment: Current trends and future research. *Environ Res* 2022;207:112609.
  40. Parida VK, Saidulu D, Majumder A, Srivastava A, Gupta B, Gupta AK. Emerging contaminants in wastewater: A critical review on occurrence, existing legislations, risk assessment, and sustainable treatment alternatives. *J Environ Chem Eng* 2021;9:105966.
  41. Luo Y, Guo W, Ngo HH, Nghiem LD, Hai FI, Zhang J, i ostali. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Sci Total Environ* 2014;473–474:619–41.
  42. Petrie B, Camacho-Muñoz D. Analysis, fate and toxicity of chiral non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewaters and the environment: a review. vol. 19. Springer International Publishing; 2021.
  43. Jan-Roblero J, Cruz-Maya JA. Ibuprofen: Toxicology and Biodegradation of an Emerging Contaminant. *Molecules* 2023;28:2097.
  44. Ferrer I, Thurman EM. Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2012;1259:148–57.
  45. Muñoz-González AB. Ibuprofen as an emerging pollutant on non-target aquatic invertebrates: Effects on *Chironomus riparius*. *Environ Toxicol Pharmacol* 2021;81.
  46. Jia Y, Khanal SK, Yin L, Sun L, Lu H. Influence of ibuprofen and its biotransformation products on different biological sludge systems and ecosystem. *Environ Int* 2021;146:106265.

47. Marchlewicz A, Guzik U, Wojcieszynska D. Over-the-Counter Monocyclic Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Environment—Sources, Risks, Biodegradation. *Water, Air, Soil Pollut* 2015;226:355.
48. Austin T, Bregoli F, Höhne D, Hendriks AJ, Ragas AMJ. Ibuprofen exposure in Europe; ePiE as an alternative to costly environmental monitoring. *Environ Res* 2022;209.
49. Stuer-Lauridsen F, Birkved M, Hansen LP, Holten Lützhøft HC, Halling-Sørensen B. Environmental risk assessment of human pharmaceuticals in Denmark after normal therapeutic use. *Chemosphere* 2000;40:783–93.
50. Chopra S, Kumar D. Ibuprofen as an emerging organic contaminant in environment, distribution and remediation. *Heliyon* 2020;6:e04087.
51. Ács A, Liang X, Bock I, Griffiths J, Ivánovics B, Vásárhelyi E, i ostali. Chronic Effects of Carbamazepine, Progesterone and Their Mixtures at Environmentally Relevant Concentrations on Biochemical Markers of Zebrafish (*Danio rerio*). *Antioxidants* 2022;11:1776.
52. Desbiolles F, Moreau X, de Jong L, Malleret L, Grandet-Marchant Q, Wong-Wah-Chung P, i ostali. Advances and limits of two model species for ecotoxicological assessment of carbamazepine, two by-products and their mixture at environmental level in freshwater. *Water Res* 2020;169:115267.
53. Cardoso-Vera JD, Elizalde-Velázquez GA, Islas-Flores H, Mejía-García A, Ortega-Olvera JM, Gómez-Oliván LM. A review of antiepileptic drugs: Part 1 occurrence, fate in aquatic environments and removal during different treatment technologies. *Sci Total Environ* 2021;768.
54. Wang Q, Liu W, Li X, Wang R, Zhai J. Carbamazepine toxicity and its co-metabolic removal by the cyanobacteria *Spirulina platensis*. *Sci Total Environ* 2020;706:135686.
55. Almeida Â, Soares AMVM, Esteves VI, Freitas R. Occurrence of the antiepileptic carbamazepine in water and bivalves from marine environments: A review. *Environ Toxicol Pharmacol* 2021;86:103661.
56. He Q, Liang JJ, Chen LX, Chen SL, Zheng HL, Liu HX, i ostali. Removal of the environmental pollutant carbamazepine using molecular imprinted adsorbents: Molecular simulation, adsorption properties, and mechanisms. *Water Res* 2020;168:115164.
57. Batucan NSP, Tremblay LA, Northcott GL, Matthaei CD. Medicating the environment? A

- critical review on the risks of carbamazepine, diclofenac and ibuprofen to aquatic organisms. *Environ Adv* 2022;7:100164.
58. ZIND H, MONDAMERT L, REMAURY QB, CLEON A, LEITNER NKV, LABANOWSKI J. Occurrence of carbamazepine, diclofenac, and their related metabolites and transformation products in a French aquatic environment and preliminary risk assessment. *Water Res* 2021;196:117052.
  59. Schapira M, Manor O, Golan N, Kalo D, Mordehay V, Kirshenbaum N, i ostali. Involuntary human exposure to carbamazepine: A cross-sectional study of correlates across the lifespan and dietary spectrum. *Environ Int* 2020;143:105951.
  60. Mezzelani M, Nardi A, Bernardini I, Milan M, Peruzza L, D'Errico G, i ostali. Environmental pharmaceuticals and climate change: The case study of carbamazepine in *M. galloprovincialis* under ocean acidification scenario. *Environ Int* 2021;146:106269.
  61. European Commission. European Union Strategic Approach to Pharmaceuticals in the Environment. EU Commision 2019;128:13.
  62. EU. The EU chemical strategy for sustainability towards a toxic-free environment. *Chim Oggi/Chemistry Today* 2021;39:40–1.
  63. Souza LP, Carneiro JGM, Lastre-Acosta AM, Ramos B, Teixeira ACSC. Environmental Persistence of the Antidepressant Fluoxetine and Its Pharmaceutical Alternative: Kinetics of Oxidation and Mathematical Simulations. *Water (Switzerland)* 2022;14.
  64. Bringolf RB, Heltsley RM, Newton TJ, Eads CB, Fraley SJ, Shea D, i ostali. Environmental occurrence and reproductive effects of the pharmaceutical fluoxetine in native freshwater mussels. *Environ Toxicol Chem* 2010;29:1311–8.
  65. Alboni S, Van DIjk RM, Poggini S, Milior G, Perrotta M, Drenth T, i ostali. Fluoxetine effects on molecular, cellular and behavioral endophenotypes of depression are driven by the living environment. *Mol Psychiatry* 2017;22:552–61.
  66. Correia D, Bellot M, Prats E, Gómez-Canela C, Moro H, Raldúa D, i ostali. Impact of environmentally relevant concentrations of fluoxetine on zebrafish larvae: From gene to behavior. *Chemosphere* 2023;345:140468.
  67. Brooks BW, Foran CM, Richards SM, Weston J, Turner PK, Stanley JK, i ostali. Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicol Lett* 2003;142:169–83.
  68. Correia D, Domingues I, Faria M, Oliveira M. Effects of fluoxetine on fish: What do we

- know and where should we focus our efforts in the future? *Sci Total Environ* 2023;857:159486.
69. Zindler F, Tisler S, Loerracher AK, Zwiener C, Braunbeck T. Norfluoxetine Is the only Metabolite of Fluoxetine in Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos That Accumulates at Environmentally Relevant Exposure Scenarios. *Environ Sci Technol* 2020;54:4200–9.
  70. European Medicines Agency (EMA). Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use. *Eur Med Agency* 2006;44:1–48.
  71. European Commission. EU General Risk Assessment Methodology (Action 5 of Multi-Annual Action Plan for the Surveillance of Products in the EU (COM(2013)76) 2015;2015:1–41.
  72. Oakes KD, Coors A, Escher BI, Fenner K, Garric J, Gust M, i ostali. Environmental risk assessment for the serotonin re uptake inhibitor fluoxetine: Case study using the european risk assessment framework. *Integr Environ Assess Manag* 2010;6:524–39.
  73. Pironti C, Ricciardi M, Proto A, Bianco PM, Montano L, Motta O. Endocrine-Disrupting Compounds: An Overview on Their Occurrence in the Aquatic Environment and Human Exposure. *Water* 2021;13:1347.
  74. Kassotis CD, Vandenberg LN, Demeneix BA, Porta M, Slama R, Trasande L. Endocrine-disrupting chemicals: economic, regulatory, and policy implications. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2020;8:719–30.
  75. Hecker M, Hollert H. Endocrine disruptor screening: regulatory perspectives and needs. *Environ Sci Eur* 2011;23:15.
  76. Harvey PW, Everett DJ. Regulation of endocrine-disrupting chemicals: Critical overview and deficiencies in toxicology and risk assessment for human health. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2006;20:145–65.
  77. Lagarde F, Beausoleil C, Belcher SM, Belzunces LP, Emond C, Guerbet M, i ostali. Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environ Heal* 2015;14:13.
  78. Patisaul H. Long-term effects of environmental endocrine disruptors on reproductive physiology and behavior. *Front Behav Neurosci* 2009;3.
  79. Vandenberg LN. Low-Dose Effects of Hormones and Endocrine Disruptors, 2014, str. 129–65.



80. Darbre PD. The history of endocrine-disrupting chemicals. *Curr Opin Endocr Metab Res* 2019;7:26–33.
81. Veurink M, Koster M, Berg LTW de J den. The History of DES, Lessons to be Learned. *Pharm World Sci* 2005;27:139–43.
82. Zamora-León P. Are the Effects of DES Over? A Tragic Lesson from the Past. *Int J Environ Res Public Health* 2021;18:10309.
83. La Merrill MA, Vandenberg LN, Smith MT, Goodson W, Browne P, Patisaul HB, i ostali. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nat Rev Endocrinol* 2020;16:45–57.
84. Kalofiri P, Biskanaki F, Kefala V, Tertipi N, Sfyri E, Rallis E. Endocrine Disruptors in Cosmetic Products and the Regulatory Framework: Public Health Implications. *Cosmetics* 2023;10:160.
85. Baker VA. Endocrine disrupters - Testing strategies to assess human hazard. *Toxicol Vitro* 2001;15:413–9.
86. Kürzinger L, Fassnacht M, Dischinger U. Endocrine Disrupting Chemicals. *Dtsch Medizinische Wochenschrift* 2022;147:1437–42.
87. Kumar M, Sarma DK, Shubham S, Kumawat M, Verma V, Prakash A, i ostali. Environmental Endocrine-Disrupting Chemical Exposure: Role in Non-Communicable Diseases. *Front Public Heal* 2020;8:1–28.
88. Duh-Leong C, Maffini M V., Kassotis CD, Vandenberg LN, Trasande L. The regulation of endocrine-disrupting chemicals to minimize their impact on health. *Nat Rev Endocrinol* 2023;19:600–14.
89. Ewence A, Brescia S, Johnson I, Rumsby PC. An approach to the identification and regulation of endocrine disrupting pesticides. *Food Chem Toxicol* 2015;78:214–20.
90. Vandenberg LN. Endocrine disrupting chemicals: strategies to protect present and future generations. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2021;16:135–46.
91. Day P, Green RM, Gross M, Weltje L, Wheeler JR. Endocrine Disruption: Current approaches for regulatory testing and assessment of plant protection products are fit for purpose. *Toxicol Lett* 2018;296:10–22.
92. Kassotis CD, Trasande L. Endocrine disruptor global policy, 2021, str. 1–34.
93. Maffini M V., Vandenberg LN. Failure to Launch: The Endocrine Disruptor Screening

- Program at the U.S. Environmental Protection Agency. *Front Toxicol* 2022;4.
94. Jacobs A, Brown P, Farrelly J, Fisher JE, Morse D. Endocrine disruption and the USFDA's Center for Drug Evaluation and Research. *Pure Appl Chem* 2003;75:2605–7.
  95. European Commission. Regulation (EC) 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006 - REACH. *Off J Eur Union* 2006:396–849.
  96. Natsch A. Scientific discrepancies in European regulatory proposals on endocrine disruptors—REACH regulation quo vadis? *Arch Toxicol* 2021;95:3601–9.
  97. Maack G, Arning J, Frische T, Kehrer-Berger A, Mordziol C. Assessment of endocrine disruptors under European regulations. *Neuroendocr. Regul. Anim. Vocalization*, Elsevier; 2021, str. 355–62.
  98. OECD. Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption. OECD; 2018.
  99. Browne P, Van Der Wal L, Gourmelon A. OECD approaches and considerations for regulatory evaluation of endocrine disruptors. *Mol Cell Endocrinol* 2020;504:110675.
  100. Pípal M, Wiklund L, Caccia S, Beronius A. Assessment of endocrine disruptive properties of PFOS: EFSA/ECHA guidance case study utilising AOP networks and alternative methods. *EFSA J* 2022;20.
  101. Hong H, Tong W, Fang H, Shi L, Xie Q, Wu J, i ostali. Prediction of estrogen receptor binding for 58,000 chemicals using an integrated system of a tree-based model with structural alerts. *Environ Health Perspect* 2002;110:29–36.
  102. Mazaud-Guittot S, Nicolaz CN, Desdoits-Lethimonier C, Coiffec I, Maamar M Ben, Balaguer P, i ostali. Paracetamol, Aspirin, and Indomethacin Induce Endocrine Disturbances in the Human Fetal Testis Capable of Interfering With Testicular Descent. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:E1757–67.
  103. Entezari B, Bozdog D, Gurer-Orhan H. Evaluation of Endocrine Related Adverse Effects of Non-Endocrine Targeted Pharmaceuticals in Cellular Systems. *Endocrine, Metab Immune Disord - Drug Targets* 2023;23:1740–9.
  104. Cohen I V., Cirulli ET, Mitchell MW, Jonsson TJ, Yu J, Shah N, i ostali. Acetaminophen (Paracetamol) Use Modifies the Sulfation of Sex Hormones. *EBioMedicine* 2018;28:316–23.
  105. Ezechiáš M, Janochová J, Filipová A, Křesinová Z, Cajthaml T. Widely used

- pharmaceuticals present in the environment revealed as *in vitro* antagonists for human estrogen and androgen receptors. *Chemosphere* 2016;152:284–91.
106. Abdi SAH, Ali A, Fatma Sayed S, Ali A, Shabee Hulhasan Abadi S, Tahir A, *et al.* Potential of paracetamol for reproductive disruption: molecular interaction, dynamics, and MM-PBSA based *in-silico* assessment. *Toxicol Mech Methods* 2023;33:349–63.
  107. Dowdy J. Acetaminophen Exhibits Weak Antiestrogenic Activity in Human Endometrial Adenocarcinoma (Ishikawa) Cells. *Toxicol Sci* 2003;72:57–65.
  108. Fent K, Escher C, Caminada D. Estrogenic activity of pharmaceuticals and pharmaceutical mixtures in a yeast reporter gene system. *Reprod Toxicol* 2006;22:175–85.
  109. Isidori M, Bellotta M, Cangiano M, Parrella A. Estrogenic activity of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Environ Int* 2009;35:826–9.
  110. Klopčič I, Markovič T, Mlinarič-Raščan I, Sollner Dolenc M. Endocrine disrupting activities and immunomodulatory effects in lymphoblastoid cell lines of diclofenac, 4-hydroxydiclofenac and paracetamol. *Toxicol Lett* 2018;294:95–104.
  111. Harnagea-Theophilus E, Miller MR. Acetaminophen Alters Estrogenic Responses *in Vitro* : Stimulation of DNA Synthesis in Estrogen-Responsive Human Breast Cancer Cells. *Toxicol Sci* 1998;46:38–44.
  112. Kristensen DM, Desdoits-Lethimonier C, Mackey AL, Dalgaard MD, De Masi F, Munkbøl CH, *et al.* Ibuprofen alters human testicular physiology to produce a state of compensated hypogonadism. *Proc Natl Acad Sci* 2018;115.
  113. Fox CW, Zhang L, Moeller BC, Garzo VG, Chang RJ, Duleba AJ. Ibuprofen inhibits key genes involved in androgen production in theca–interstitial cells. *F&S Sci* 2021;2:230–6.
  114. Ben Maamar M, Lesné L, Hennig K, Desdoits-Lethimonier C, Kilcoyne KR, Coiffec I, *et al.* Ibuprofen results in alterations of human fetal testis development. *Sci Rep* 2017;7:44184.
  115. Schmitz M, Beghin M, Mandiki SNM, Nott K, Gillet M, Ronkart S, *et al.* Environmentally-relevant mixture of pharmaceutical drugs stimulates sex-steroid hormone production and modulates the expression of candidate genes in the ovary of juvenile female rainbow trout. *Aquat Toxicol* 2018;205:89–99.
  116. Ji K, Liu X, Lee S, Kang S, Kho Y, Giesy JP, *et al.* Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on hormones and genes of the hypothalamic-pituitary-gonad axis, and

- reproduction of zebrafish. *J Hazard Mater* 2013;254–255:242–51.
117. Gracia T, Hilscherova K, Jones PD, Newsted JL, Higley EB, Zhang X, i ostali. Modulation of steroidogenic gene expression and hormone production of H295R cells by pharmaceuticals and other environmentally active compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;225:142–53.
  118. Pop A, Lupu DI, Cherfan J, Kiss B, Loghin F. Estrogenic/antiestrogenic activity of selected selective serotonin reuptake inhibitors. *Med Pharm Reports* 2015;88:381–5.
  119. Domingues RR, Wiltbank MC, Hernandez LL. The antidepressant fluoxetine (Prozac®) modulates estrogen signaling in the uterus and alters estrous cycles in mice. *Mol Cell Endocrinol* 2023;559:111783.
  120. Müller JC, Imazaki PH, Boareto AC, Lourenço ELB, Golin M, Vechi MF, i ostali. In vivo and in vitro estrogenic activity of the antidepressant fluoxetine. *Reprod Toxicol* 2012;34:80–5.
  121. Hansen CH, Larsen LW, Sørensen AM, Halling-Sørensen B, Styrishave B. The six most widely used selective serotonin reuptake inhibitors decrease androgens and increase estrogens in the H295R cell line. *Toxicol Vitro* 2017;41:1–11.
  122. Wölz J, Grosshans K, Streck G, Schulze T, Rastall A, Erdinger L, i ostali. Estrogen receptor mediated activity in bankside groundwater, with flood suspended particulate matter and floodplain soil – An approach combining tracer substance, bioassay and target analysis. *Chemosphere* 2011;85:717–23.
  123. Bulbul M, Nacar MC, Aydin Turk B, Karacor T, Onderci M, Parlar A, i ostali. The effect of carbamazepine, which increases oestrogen destruction, on the endometriotic implants; an experimental rat model. *J Obstet Gynaecol (Lahore)* 2022;42:1261–7.
  124. Killer N, Hock M, Gehlhaus M, Capetian P, Knoth R, Pantazis G, i ostali. Modulation of androgen and estrogen receptor expression by antiepileptic drugs and steroids in hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 2009;50:1875–90.
  125. Meng Q-W, Zhao C-H, Xi Y-H, Cai L, Sun L-C, Sui G-J. [Inhibitory effect of carbamazepine on proliferation of estrogen-dependent breast cancer cells]. *Ai Zheng* 2006;25:967–73.
  126. Yan S, Wang M, Zha J, Zhu L, Li W, Luo Q, i ostali. Environmentally Relevant Concentrations of Carbamazepine Caused Endocrine-Disrupting Effects on Nontarget

- Organisms, Chinese Rare Minnows ( *Gobiocypris rarus* ). *Environ Sci Technol* 2018;52:886–94.
127. Cavanagh J-AE, Trought K, Mitchell C, Northcott G, Tremblay LA. Assessment of endocrine disruption and oxidative potential of bisphenol-A, triclosan, nonylphenol, diethylhexyl phthalate, galaxolide, and carbamazepine, common contaminants of municipal biosolids. *Toxicol Vitr* 2018;48:342–9.
  128. Connell J, Rapeport W, Beastall G, Brodie M. Changes in circulating androgens during short term carbamazepine therapy. *Br J Clin Pharmacol* 1984;17:347–51.
  129. Serra M, Littera M, Pisu MG, Muggironi M, Purdy RH, Biggio G. Steroidogenesis in rat brain induced by short- and long-term administration of carbamazepine. *Neuropharmacology* 2000;39:2448–56.
  130. Gustavsen MW, von Krogh K, Taubøll E, Zimmer KE, Dahl E, Olsaker I, i ostali. Differential effects of antiepileptic drugs on steroidogenesis in a human in vitro cell model. *Acta Neurol Scand* 2009;120:14–21.
  131. Shen M, Zhang Y, Zhu Y, Song B, Zeng G, Hu D, i ostali. Recent advances in toxicological research of nanoplastics in the environment: A review. *Environ Pollut* 2019;252:511–21.
  132. da Costa JP, Santos PSM, Duarte AC, Rocha-Santos T. (Nano)plastics in the environment - Sources, fates and effects. *Sci Total Environ* 2016;566–567:15–26.
  133. Amereh F, Babaei M, Eslami A, Fazelipour S, Rafiee M. The emerging risk of exposure to nano(micro)plastics on endocrine disturbance and reproductive toxicity: From a hypothetical scenario to a global public health challenge. *Environ Pollut* 2020;261.
  134. Yang CZ, Yaniger SI, Jordan VC, Klein DJ, Bittner GD. Most Plastic Products Release Estrogenic Chemicals: A Potential Health Problem That Can Be Solved. *Environ Health Perspect* 2011;119:989–96.
  135. Ghisari M, Bonefeld-Jorgensen EC. Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions. *Toxicol Lett* 2009;189:67–77.
  136. Wagner M, Oehlmann J. Endocrine disruptors in bottled mineral water: Estrogenic activity in the E-Screen. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011;127:128–35.
  137. Yang CZ, Bittner GD, Yaniger SI, Klein DJ, Jordan VC. Estrogen Activity in Plastic Products: Yang et al. Respond. *Environ Health Perspect* 2011;119.

138. Krüger T, Long M, Bonefeld-Jørgensen EC. Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. *Toxicology* 2008;246:112–23.
139. Amereh F, Babaei M, Eslami A, Fazelipour S, Rafiee M. The emerging risk of exposure to nano(micro)plastics on endocrine disturbance and reproductive toxicity: From a hypothetical scenario to a global public health challenge. *Environ Pollut* 2020;261:114158.
140. Timms BG, Howdeshell KL, Barton L, Bradley S, Richter CA, vom Saal FS. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102:7014–9.
141. Deng Y, Yan Z, Shen R, Huang Y, Ren H, Zhang Y. Enhanced reproductive toxicities induced by phthalates contaminated microplastics in male mice (*Mus musculus*). *J Hazard Mater* 2021;406:124644.
142. OECD. Considerations for assessment of risk from the combined exposure to multiple chemicals. *Ser Test Assess No 296* 2018:119.
143. More SJ, Bampidis V, Benford D, Bennekou SH, Bragard C, Halldorsson TI, i ostali. Guidance on harmonised methodologies for human health, animal health and ecological risk assessment of combined exposure to multiple chemicals. *EFSA J* 2019;17.
144. European Chemicals Agency. Guidance on the Biocidal Products Regulation - Volume III: Human health Part A: Information Requirements. vol. III. 2018.
145. Bopp SK, Kienzler A, Richarz AN, van der Linden SC, Paini A, Parissis N, i ostali. Regulatory assessment and risk management of chemical mixtures: challenges and ways forward. *Crit Rev Toxicol* 2019;49:174–89.
146. Moretto A, Bachman A, Boobis A, Solomon KR, Pastoor TP, Wilks MF, i ostali. A framework for cumulative risk assessment in the 21st century. *Crit Rev Toxicol* 2017;47:85–97.
147. Rotter S, Beronius A, Boobis AR, Hanberg A, van Klaveren J, Luijten M, i ostali. Overview on legislation and scientific approaches for risk assessment of combined exposure to multiple chemicals: the potential EuroMix contribution. *Crit Rev Toxicol* 2018;48:796–814.
148. Lasch A, Lichtenstein D, Marx-Stoelting P, Braeuning A, Alarcan J. Mixture effects of chemicals: The difficulty to choose appropriate mathematical models for appropriate conclusions. *Environ Pollut* 2020;260:113953.

149. Scholze M, Silva E, Kortenkamp A. Extending the applicability of the dose addition model to the assessment of chemical mixtures of partial agonists by using a novel toxic unit extrapolation method. *PLoS One* 2014;9.
150. Rodea-Palomares I, Gonzalez-Pleiter M, Gonzalo S, Rosal R, Leganes F, Sabater S, i ostali. Hidden drivers of low-dose pharmaceutical pollutant mixtures revealed by the novel GSA-QHTS screening method. *Sci Adv* 2016;2:1–11.
151. Elcombe CS, Evans NP, Bellingham M. Critical review and analysis of literature on low dose exposure to chemical mixtures in mammalian in vivo systems. *Crit Rev Toxicol* 2022;52:221–38.
152. Hildebrandt J, Thünemann AF. Aqueous Dispersions of Polypropylene: Toward Reference Materials for Characterizing Nanoplastics. *Macromol Rapid Commun* 2023;44.
153. Jafari Eskandari M, Gostariani R, Asadi Asadabad M. Transmission Electron Microscopy of Nanomaterials. *Electron Crystallogr., IntechOpen*; 2020.
154. Smith DJ. Characterization of Nanomaterials Using Transmission Electron Microscopy. *Nanocharacterisation, The Royal Society of Chemistry*; 2015, str. 1–29.
155. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012;9:671–5.
156. Ramos AP. Dynamic Light Scattering Applied to Nanoparticle Characterization. *Nanocharacterization Tech., Elsevier*; 2017, str. 99–110.
157. Varenne F, Botton J, Merlet C, Vachon J-J, Geiger S, Infante IC, i ostali. Standardization and validation of a protocol of zeta potential measurements by electrophoretic light scattering for nanomaterial characterization. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2015;486:218–31.
158. Shao X, Wei X, Song X, Hao L, Cai X, Zhang Z, i ostali. Independent effect of polymeric nanoparticle zeta potential/surface charge, on their cytotoxicity and affinity to cells. *Cell Prolif* 2015;48:465–74.
159. Wilson VS. Development and Characterization of a Cell Line That Stably Expresses an Estrogen-Responsive Luciferase Reporter for the Detection of Estrogen Receptor Agonist and Antagonists. *Toxicol Sci* 2004;81:69–77.
160. Keydar I, Chen L, Karby S, Weiss FR, Delarea J, Radu M, i ostali. Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J Cancer*

- 1979;15:659–70.
161. Power KA, Thompson LU. Ligand-Induced Regulation of ER $\alpha$  and ER $\beta$  is Indicative of Human Breast Cancer Cell Proliferation. *Breast Cancer Res Treat* 2003;81:209–21.
  162. Legler J, van den Brink CE, Brouwer A, Murk AJ, van der Saag PT, Vethaak AD, i ostali. Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicol Sci* 1999;48:55–66.
  163. OECD. Test No. 456: H295R Steroidogenesis Assay. OECD; 2023.
  164. Hecker M, Newsted JL, Murphy MB, Higley EB, Jones PD, Wu R, i ostali. Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;217:114–24.
  165. Kurlbaum M, Sbiera S, Kendl S, Martin Fassnacht M, Kroiss M. Steroidogenesis in the NCI-H295 Cell Line Model is Strongly Affected By Culture Conditions and Substrain. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2020;128:672–80.
  166. Rainey WE, Bird IM, Sawetawan C, Hanley NA, McCarthy JL, McGee EA, i ostali. Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids. *J Clin Endocrinol Metab* 1993;77:731–7.
  167. Kempná P, Hofer G, Mullis PE, Flück CE. Pioglitazone Inhibits Androgen Production in NCI-H295R Cells by Regulating Gene Expression of CYP17 and HSD3B2. *Mol Pharmacol* 2007;71:787–98.
  168. Zhang X, Yu RMK, Jones PD, Lam GKW, Newsted JL, Gracia T, i ostali. Quantitative RT-PCR Methods for Evaluating Toxicant-Induced Effects on Steroidogenesis Using the H295R Cell Line. *Environ Sci Technol* 2005;39:2777–85.
  169. El Yamani N, Rundén-Pran E, Varet J, Beus M, Dusinska M, Fessard V, i ostali. Hazard assessment of nanomaterials using in vitro toxicity assays: Guidance on potential assay interferences and mitigating actions to avoid biased results. *Nano Today* 2024;55:102215.
  170. Malich G, Markovic B, Winder C. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology* 1997;124:179–92.
  171. OECD. Test No. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists. OECD; 2021.

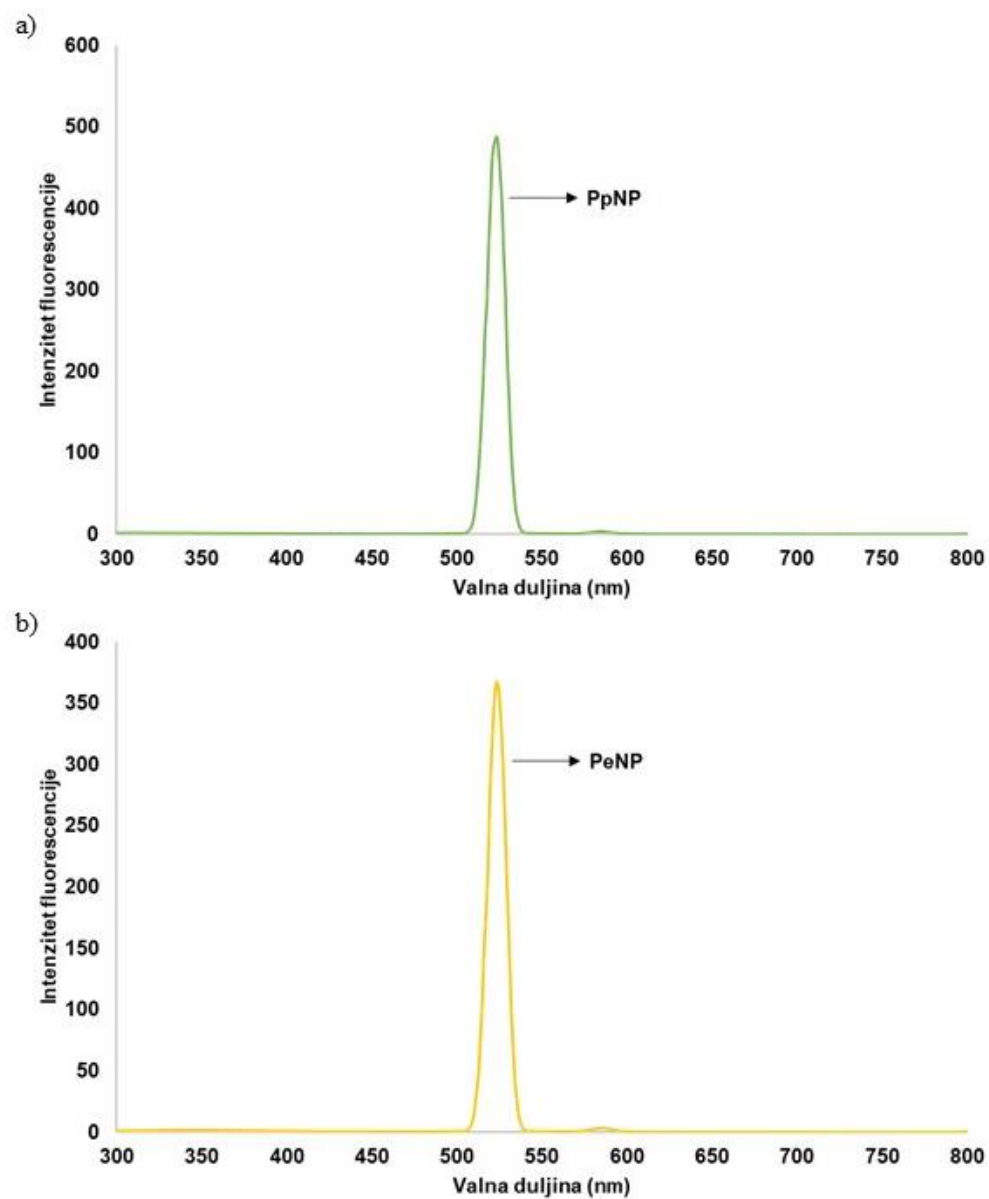


172. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, i ostali. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin Chem* 2009;55:611–22.
173. Taylor SC, Nadeau K, Abbasi M, Lachance C, Nguyen M, Fenrich J. The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends Biotechnol* 2019;37:761–74.
174. Hilscherova K. Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR. *Toxicol Sci* 2004;81:78–89.
175. Ji K, Choi K, Lee S, Park S, Khim JS, Jo E-H, i ostali. Effects of sulfathiazole, oxytetracycline and chlortetracycline on steroidogenesis in the human adrenocarcinoma (H295R) cell line and freshwater fish *Oryzias latipes*. *J Hazard Mater* 2010;182:494–502.
176. Ding L, Murphy MB, He Y, Xu Y, Yeung LWY, Wang J, i ostali. Effects of brominated flame retardants and brominated dioxins on steroidogenesis in H295R human adrenocortical carcinoma cell line. *Environ Toxicol Chem* 2007;26:764–72.
177. Weigand I, Schreiner J, Röhrig F, Sun N, Landwehr L-S, Urlaub H, i ostali. Active steroid hormone synthesis renders adrenocortical cells highly susceptible to type II ferroptosis induction. *Cell Death Dis* 2020;11:192.
178. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* 2001;25:402–8.
179. Ritz C, Streibig JC, Kniss A. How to use statistics to claim antagonism and synergism from binary mixture experiments. *Pest Manag Sci* 2021;77:3890–9.
180. EFSA. Use of BMDS and PROAST software packages by EFSA Scientific Panels and Units for applying the Benchmark Dose (BMD) approach in risk assessment. *EFSA Support Publ* 2011;8.
181. Wang J, Cong J, Wu J, Chen Y, Fan H, Wang X, i ostali. Nanoplastic-protein corona interactions and their biological effects: A review of recent advances and trends. *TrAC Trends Anal Chem* 2023;166:117206.
182. Li X, He E, Xia B, Liu Y, Zhang P, Cao X, i ostali. Protein corona-induced aggregation of differently sized nanoplastics: impacts of protein type and concentration. *Environ Sci Nano* 2021;8:1560–70.

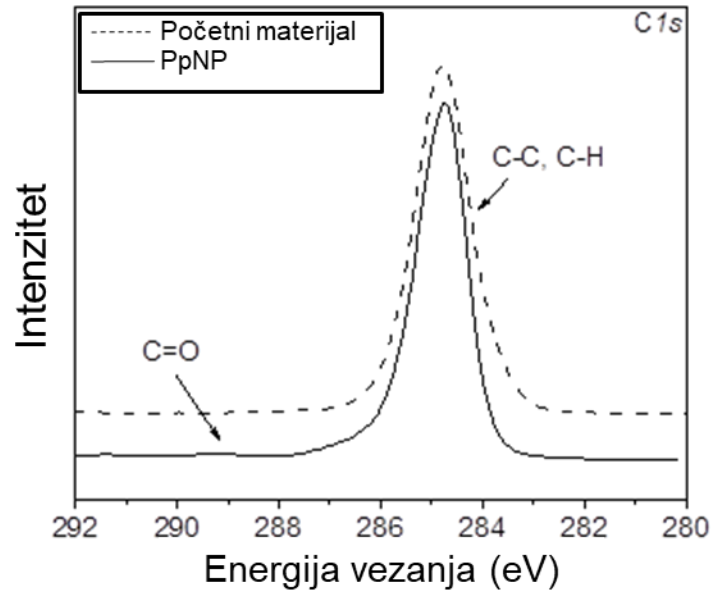
183. Sengottayan S, Mikolajczyk A, Jagiełło K, Swirog M, Puzyn T. Core, Coating, or Corona? The Importance of Considering Protein Coronas in nano-QSPR Modeling of Zeta Potential. *ACS Nano* 2023;17:1989–97.
184. Justus CR, Leffler N, Ruiz-Echevarria M, Yang L V. In vitro Cell Migration and Invasion Assays. *J Vis Exp* 2014.
185. Wang P, Henning SM, Heber D. Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols. *PLoS One* 2010;5:e10202.
186. Jia R, Han J, Liu X, Li K, Lai W, Bian L, i ostali. Exposure to Polypropylene Microplastics via Oral Ingestion Induces Colonic Apoptosis and Intestinal Barrier Damage through Oxidative Stress and Inflammation in Mice. *Toxics* 2023;11:127.
187. Woo J-H, Seo HJ, Lee J-Y, Lee I, Jeon K, Kim B, i ostali. Polypropylene nanoplastic exposure leads to lung inflammation through p38-mediated NF- $\kappa$ B pathway due to mitochondrial damage. *Part Fibre Toxicol* 2023;20:2.
188. Bobori DC, Feidantsis K, Dimitriadi A, Datsi N, Ripis P, Kalogiannis S, i ostali. Dose-Dependent Cytotoxicity of Polypropylene Microplastics (PP-MPs) in Two Freshwater Fishes. *Int J Mol Sci* 2022;23:13878.
189. Koner S, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Elucidating the effects of naturally weathered aged-polypropylene microplastics and newly procured polypropylene microplastics on raw 264.7 macrophages. *Environ Sci Nano* 2024;11:983–99.
190. Catelas I, Petit A, Zukor DJ, Marchand R, Yahia L, Huk OL. Induction of macrophage apoptosis by ceramic and polyethylene particles in vitro. *Biomaterials* 1999;20:625–30.
191. Cao J, Xu R, Wang F, Geng Y, Xu T, Zhu M, i ostali. Polyethylene microplastics trigger cell apoptosis and inflammation via inducing oxidative stress and activation of the NLRP3 inflammasome in carp gills. *Fish Shellfish Immunol* 2023;132:108470.
192. Zhu M, Wang H, Han F, Cai Z, Wang J, Guo M. Polyethylene microplastics cause apoptosis via the MiR-132/CAPN axis and inflammation in carp ovarian. *Aquat Toxicol* 2023;265:106780.
193. Xing S, Waddell JE, Boynton EL. Changes in macrophage morphology and prolonged cell viability following exposure to polyethylene particulate in vitro. *Microsc Res Tech* 2002;57:523–9.

194. Yasin NAE, El-Naggar ME, Ahmed ZSO, Galal MK, Rashad MM, Youssef AM, i ostali. Exposure to Polystyrene nanoparticles induces liver damage in rat via induction of oxidative stress and hepatocyte apoptosis. *Environ Toxicol Pharmacol* 2022;94:103911.
195. Hu Q, Wang H, He C, Jin Y, Fu Z. Polystyrene nanoparticles trigger the activation of p38 MAPK and apoptosis via inducing oxidative stress in zebrafish and macrophage cells. *Environ Pollut* 2021;269:116075.
196. Wan S, Wang X, Chen W, Wang M, Zhao J, Xu Z, i ostali. Exposure to high dose of polystyrene nanoplastics causes trophoblast cell apoptosis and induces miscarriage. *Part Fibre Toxicol* 2024;21:13.
197. O'Sullivan MP, Testa AC. Fluorescence of aliphatic ketones. *J Am Chem Soc* 1970;92:5842–4.
198. Johnston HJ, Semmler-Behnke M, Brown DM, Kreyling W, Tran L, Stone V. Evaluating the uptake and intracellular fate of polystyrene nanoparticles by primary and hepatocyte cell lines in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010;242:66–78.
199. Banerjee A, Billey LO, Shelver WL. Uptake and toxicity of polystyrene micro/nanoplastics in gastric cells: Effects of particle size and surface functionalization. *PLoS One* 2021;16:1–25.
200. Forte M, Iachetta G, Tussellino M, Carotenuto R, Prisco M, De Falco M, i ostali. Polystyrene nanoparticles internalization in human gastric adenocarcinoma cells. *Toxicol Vitro* 2016;31:126–36.
201. Xiao X, He E, Jiang X, Li X, Yang W, Ruan J, i ostali. Visualizing and assessing the size-dependent oral uptake, tissue distribution, and detrimental effect of polystyrene microplastics in *Eisenia fetida*. *Environ Pollut* 2022;306:119436.
202. Hao T, Gao Y, Li Z-C, Zhou X-X, Yan B. Size-Dependent Uptake and Depuration of Nanoplastics in *Tilapia (Oreochromis niloticus)* and Distinct Intestinal Impacts. *Environ Sci Technol* 2023;57:2804–12.
203. Stock V, Böhmert L, Coban G, Tyra G, Vollbrecht M-L, Voss L, i ostali. Microplastics and nanoplastics: Size, surface and dispersant – What causes the effect? *Toxicol Vitro* 2022;80:105314.

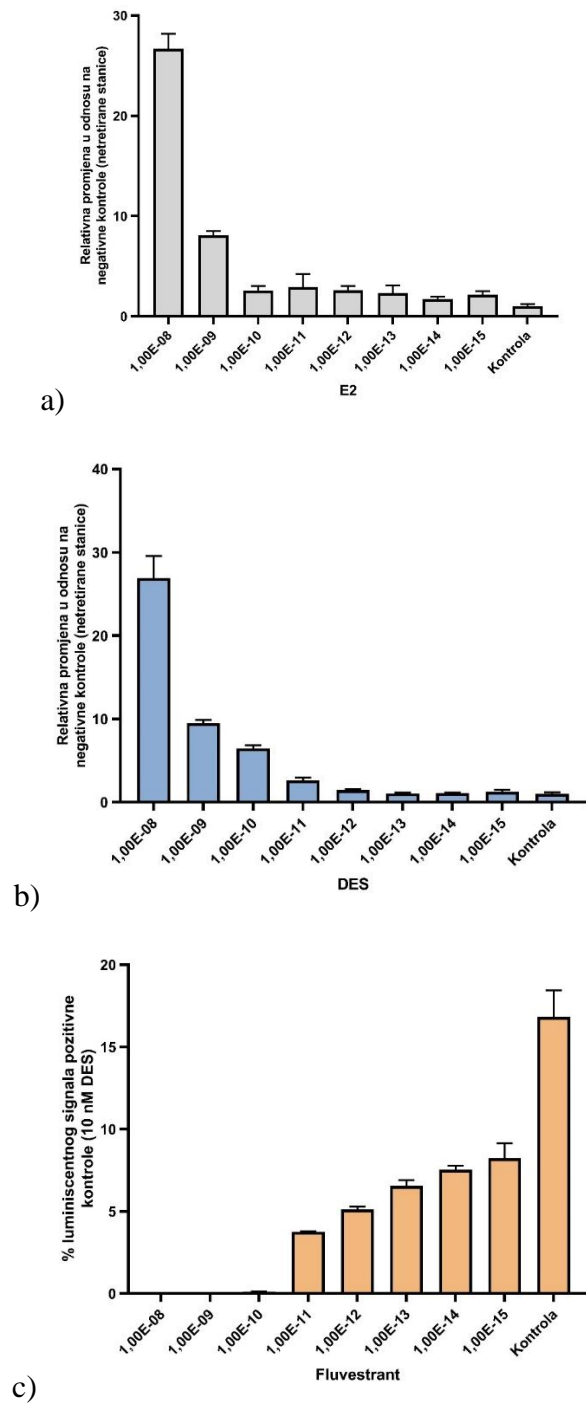
## 7. PRILOZI



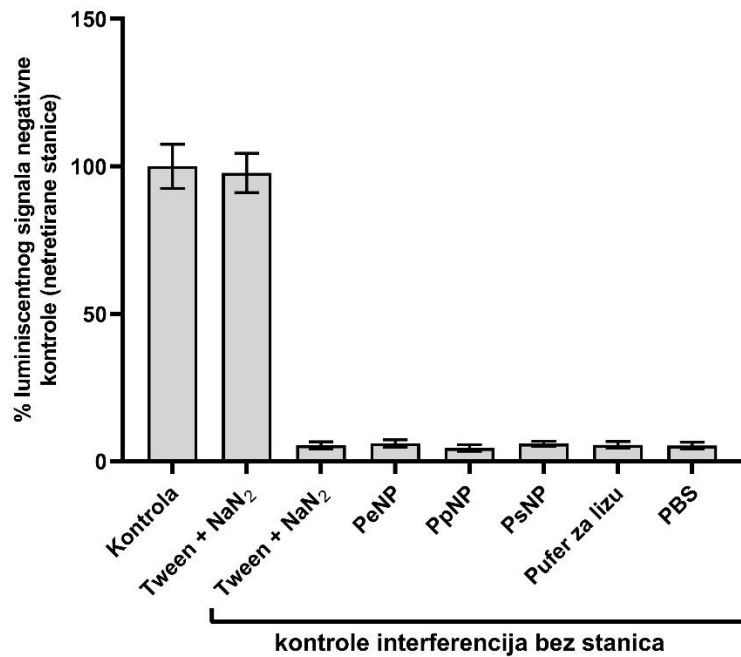
**Slika 32.** Emisijski spektri PpNP i PeNP snimljeni na fluorescencijskom spektrometru Cary Eclipse. Pik PpNP je na valnoj duljini od 523 nm, dok je pik PeNP na 524 nm.



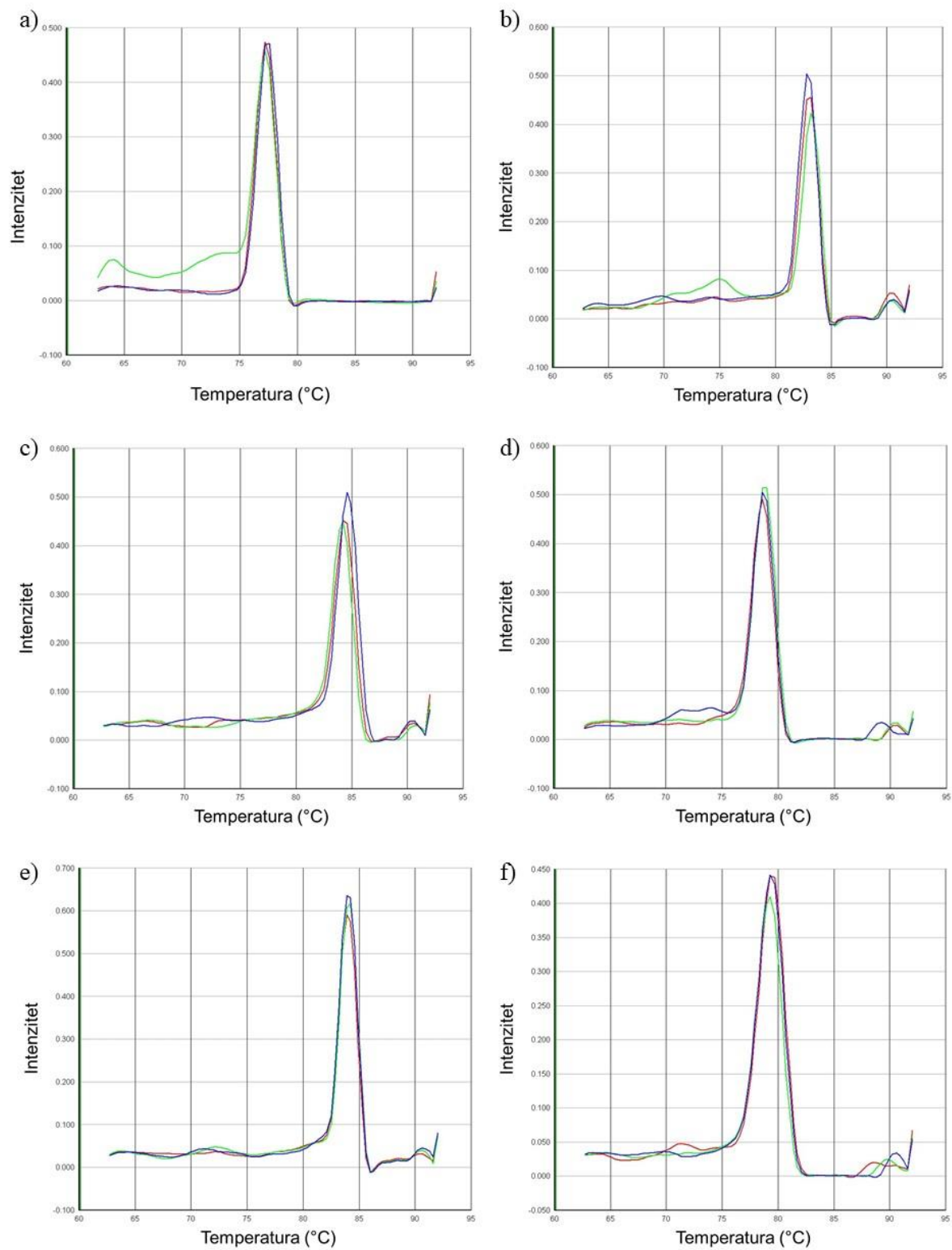
**Slika 33.** Spektri početnog materijala polipropilena te sintetiziranih PpNP dobiveni metodom fotoelektronske spektroskopije rendgenskih zraka. Ketonske skupine prisutne su samo na PpNP.



**Slika 34.** Rezultati provjere prikladnosti sustava za luciferazni esej pomoću 2 agonista 17 $\beta$ -estradiola (a), dietilstilbestrola (b) i antagonista fulvestranta (c).

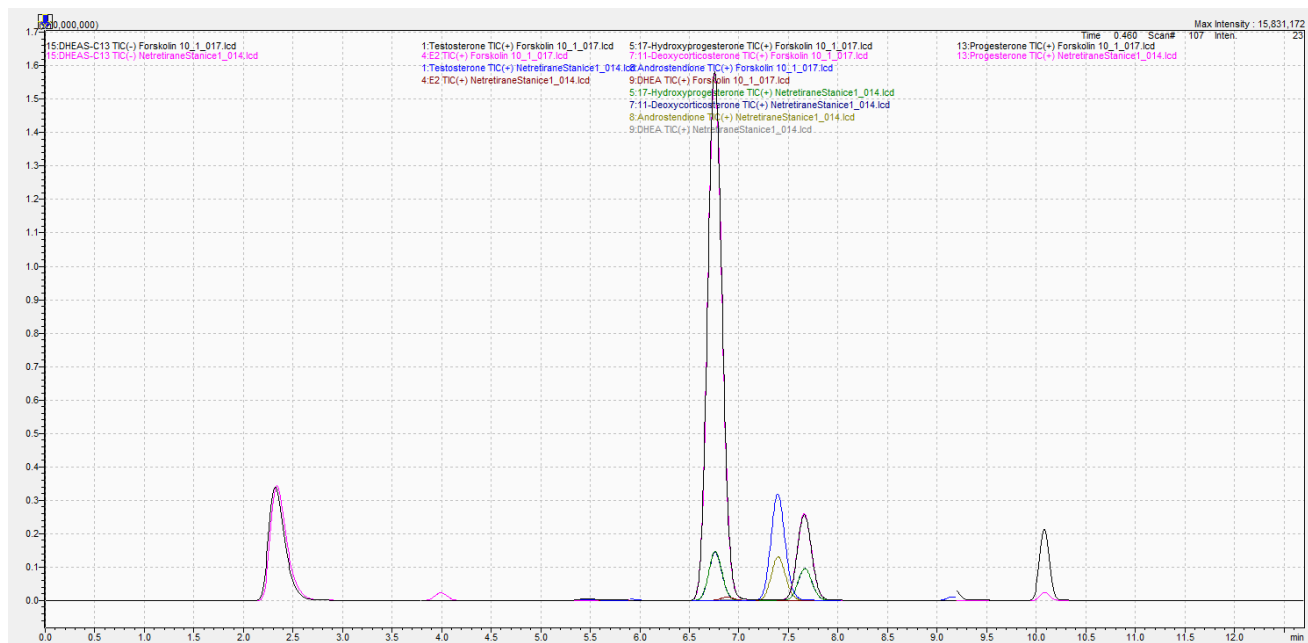


**Slika 35.** Kontrole interferencija u luciferaznom eseju za ispitivanje aktivnosti estrogenskog receptora. Ispitane su sve komponente koje su bile prisutne u jažici prilikom mjerenja uz lizirane stanice te PBS koji je korišten za pripremu uzoraka i Tween te natrijev azid prisutni u suspenziji PsNP.

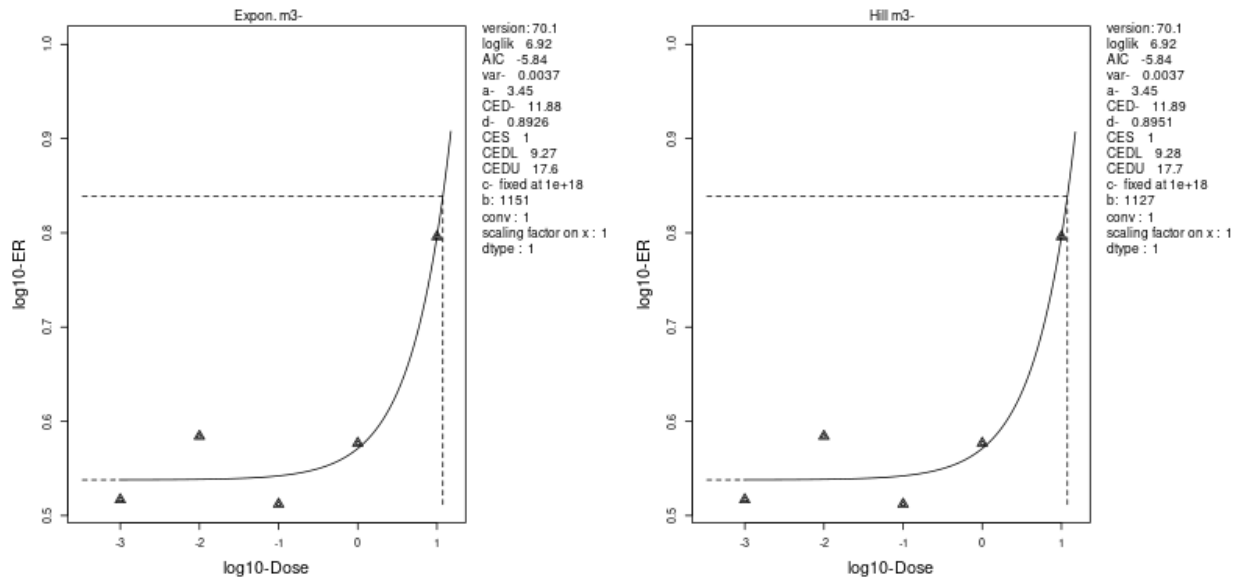


**Slika 36.** Disocijacijske krivulje početnica za a) *CYP19*; b) *CYP17*; c) *CYP11*; d)  $3\beta$ -HSD; e)  $17\beta$ -HSD i f)  $\beta$ -aktin.

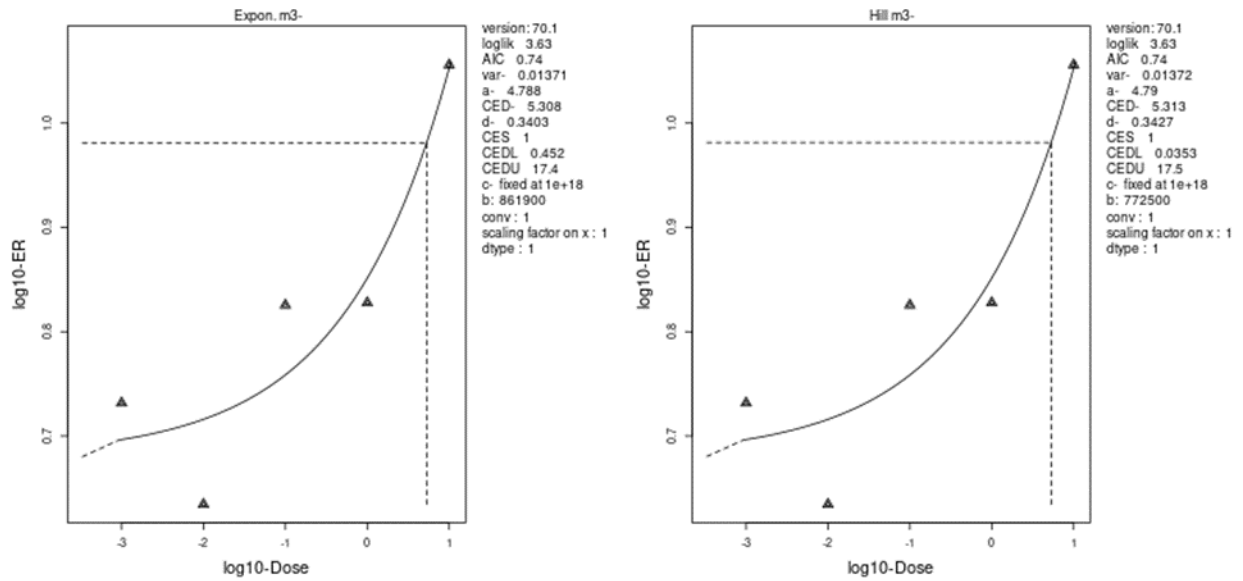




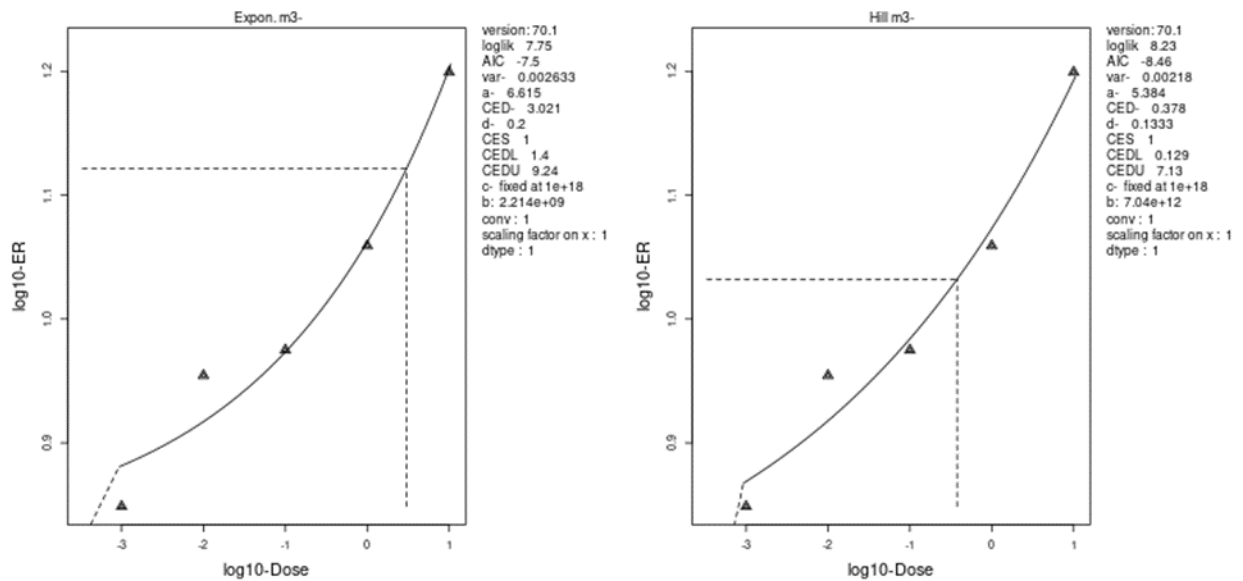
**Slika 37.** Kromatogram steroidnih hormona nakon tretmana pozitivnom kontrolom (forskolinom) određenih metodom LC-MS/MS.



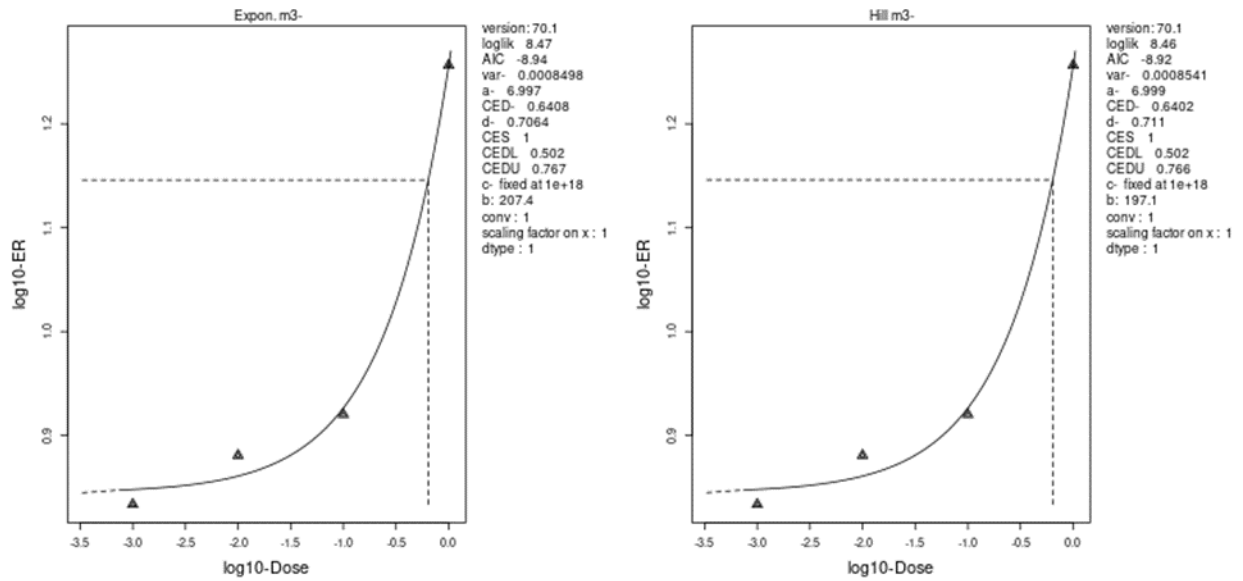
**Slika 38.** Krivulja odnosa doze i odgovora estrogenske aktivnosti PsNP generirana korištenjem besplatnog alata PROAST (<https://proastweb.rivm.nl/>). Krivulje omogućuju određivanje koncentracije odgovora na postavljenoj granici (BMD) potrebnog za izračun relativnog faktora potencije (RPF).



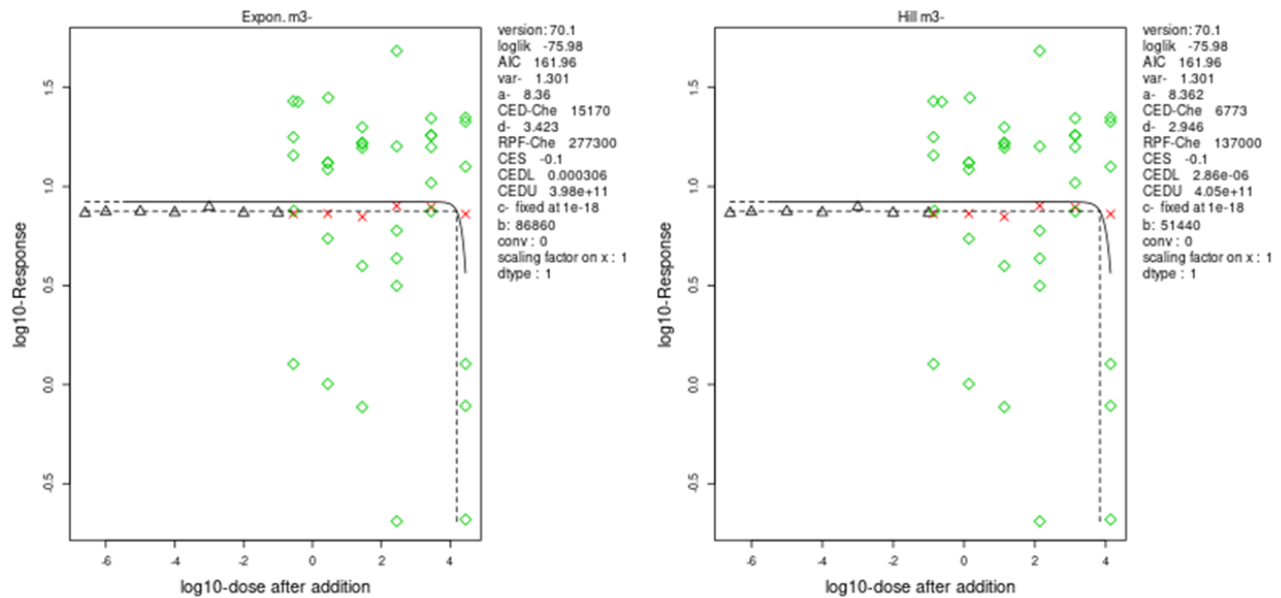
**Slika 39.** Krivulja odnosa doze i odgovora estrogenske aktivnosti PsNP generirana korištenjem besplatnog alata PROAST (<https://proastweb.rivm.nl/>). Krivulje omogućuju određivanje koncentracije odgovora na postavljenoj granici (BMD) potrebnog za izračun relativnog faktora potencije (RPF).



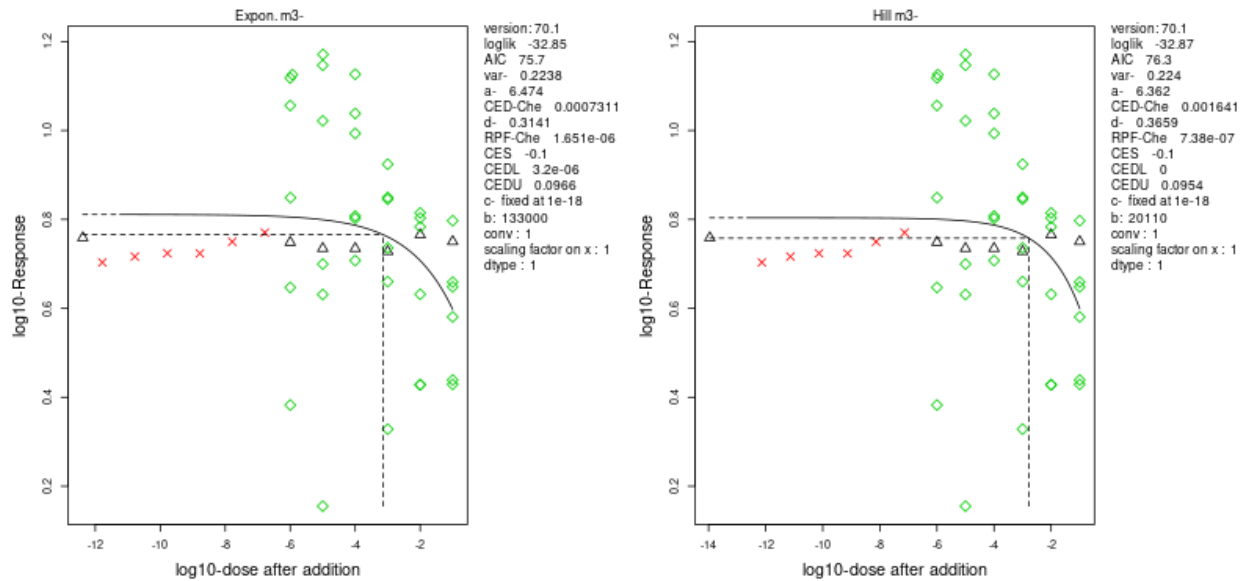
**Slika 40.** Krivulja odnosa doze i odgovora estrogenske aktivnosti PsNP generirana korištenjem besplatnog alata PROAST (<https://proastweb.rivm.nl/>). Krivulje omogućuju određivanje koncentracije odgovora na postavljenoj granici (BMD) potrebnog za izračun relativnog faktora potencije (RPF).



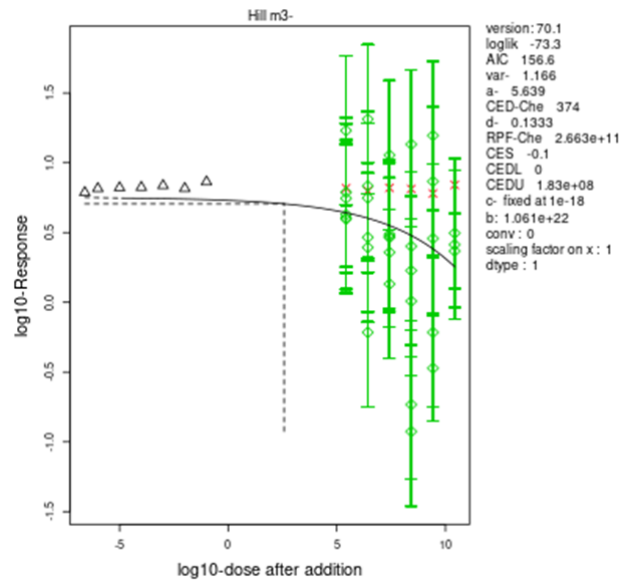
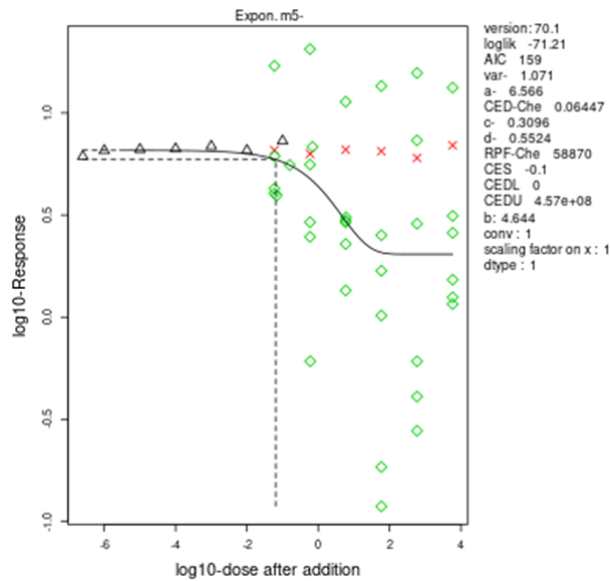
**Slika 41.** Krivulja odnosa doze i odgovora estrogenske aktivnosti smjesa PsNP, PpNP i PeNP generirana korištenjem besplatnog alata PROAST (<https://proastweb.rivm.nl/>). Krivulje omogućuju određivanje koncentracije odgovora na postavljenoj granici (BMD) potrebnog za izračun relativnog faktora potencije (RPF).



**Slika 42.** Krivulja odnosa doze i odgovora estrogenske aktivnosti smjesa paracetamola i ibuprofena generirana korištenjem besplatnog alata PROAST (<https://proastweb.rivm.nl/>). PROAST iz podataka za smjese lijekova nije uspio generirati odgovarajuću krivulju što potvrđuje kako se ne radi o aditivnim učincima.

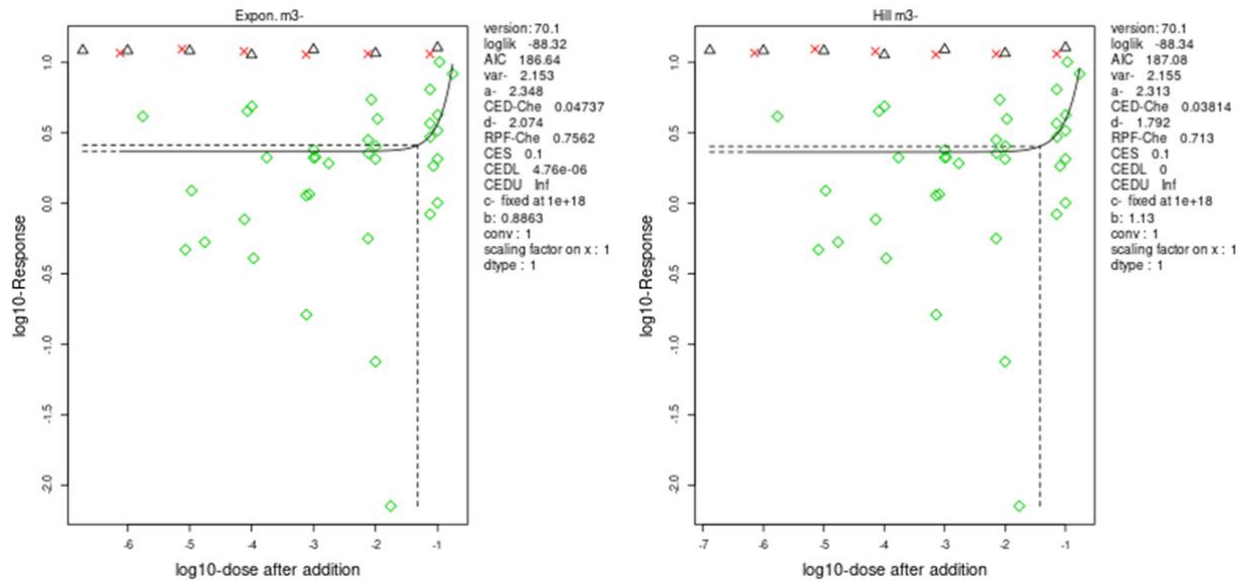


**Slika 43.** Krivulja odnosa doze i odgovora estrogenske aktivnosti smjese paracetamola i karbamazepina generirana korištenjem besplatnog alata PROAST (<https://proastweb.rivm.nl/>). PROAST iz podataka za smjese lijekova nije uspio generirati odgovarajuću krivulju što potvrđuje kako se ne radi o aditivnim učincima.

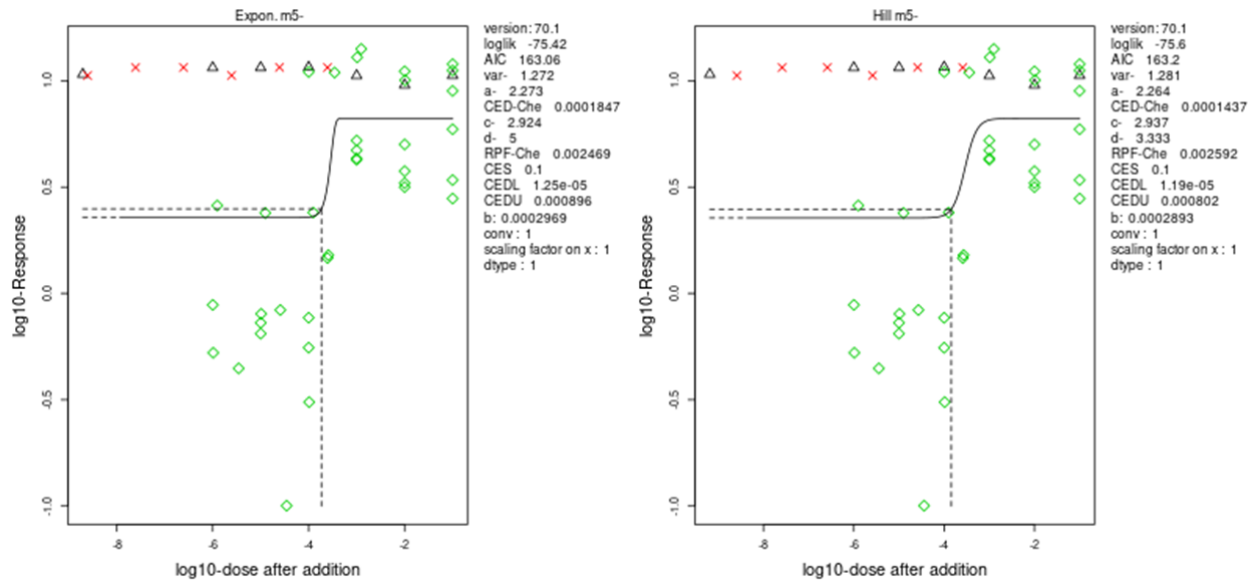


**Slika 44.** Krivulja odnosa doze i odgovora estrogenske aktivnosti smjese paracetamola i fluoksetina generirana korištenjem besplatnog alata PROAST (<https://proastweb.rivm.nl/>). PROAST iz podataka za smjese lijekova nije uspio generirati odgovarajuću krivulju što potvrđuje kako se ne radi o aditivnim učincima.

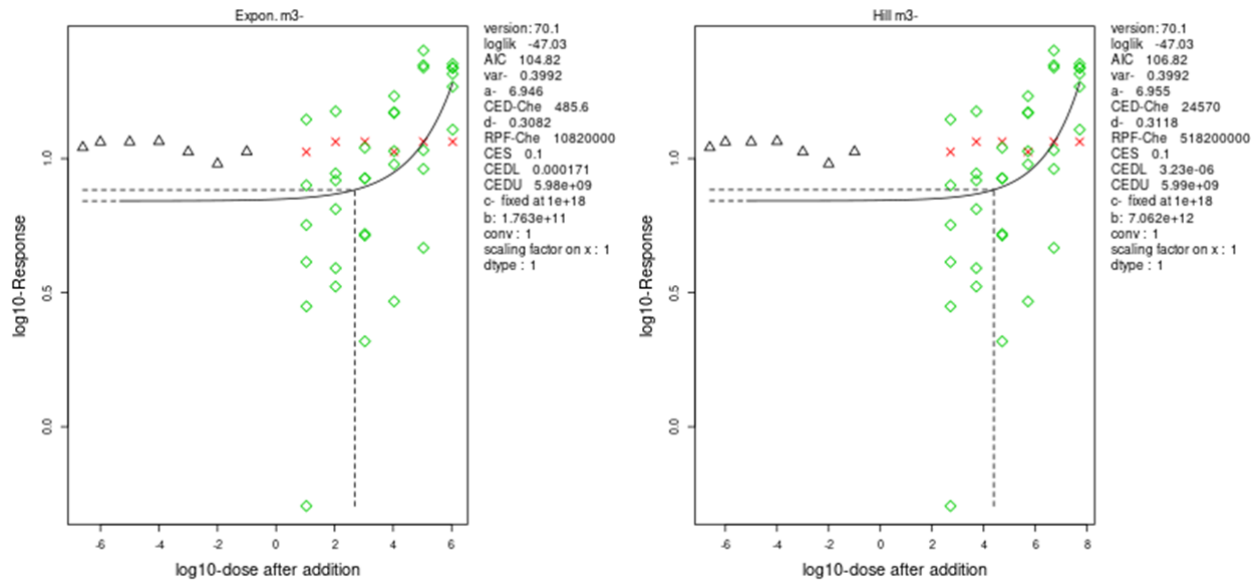




**Slika 45.** Krivulja odnosa doze i odgovora estrogenske aktivnosti smjese ibuprofena i karbamazepina generirana korištenjem besplatnog alata PROAST (<https://proastweb.rivm.nl/>). PROAST iz podataka za smjese lijekova nije uspio generirati odgovarajuću krivulju što potvrđuje kako se ne radi o aditivnim učincima.



**Slika 46.** Krivulja odnosa doze i odgovora estrogenske aktivnosti smjese ibuprofena i fluoksetina generirana korištenjem besplatnog alata PROAST (<https://proastweb.rivm.nl/>). PROAST iz podataka za smjese lijekova nije uspio generirati odgovarajuću krivulju što potvrđuje kako se ne radi o aditivnim učincima.



**Slika 47.** Krivulja odnosa doze i odgovora estrogenske aktivnosti smjese ibuprofena i fluoksetina generirana korištenjem besplatnog alata PROAST (<https://proastweb.rivm.nl/>). PROAST iz podataka za smjese lijekova nije uspio generirati odgovarajuću krivulju što potvrđuje kako se ne radi o aditivnim učincima.

**Tablica 5.** RPF smjesa PNP izračunati kao omjer  $BMD_{smjese}$  i  $BMD_{PsNP}$ .

PNP	$BMD_{PsNP}$	$RPF_{smjesa}$
PeNPs	4,6845	7,38
PpNPs	8,7677	13,82
PsNPs	13,4850	21,25

**Tablica 6.** Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i nezavisne akcije te definicija sinergističkog ili antagonističkog učinka za smjese lijekova i PsNP.

Smjesa	% DES	$D_{DA}$	Sin/Ant	$D_{IA}$	Sin/Ant
P-100 + PS-10	8,0932347	4,8349467	Sinergizam	1,68918837	Sinergizam
P-100 + PS-5	17,387905	14,129617	Sinergizam	10,9838591	Sinergizam
P-100 + PS-1	19,718773	16,460485	Sinergizam	13,3147271	Sinergizam
P-100 + PS-0,1	20,217657	16,959369	Sinergizam	13,813611	Sinergizam
P-50 + PS-10	9,7729821	6,5146941	Sinergizam	3,36893573	Sinergizam
P-50 + PS-5	14,668216	11,409928	Sinergizam	8,26417011	Sinergizam
P-50 + PS-1	24,453542	21,195254	Sinergizam	18,0494957	Sinergizam
P-50 + PS-0,1	25,006943	21,748655	Sinergizam	18,6028969	Sinergizam
P-10 + PS-10	13,31763	10,059342	Sinergizam	6,91358328	Sinergizam
P-10 + PS-5	22,905459	19,647171	Sinergizam	16,5014126	Sinergizam
P-10 + PS-1	25,281587	22,023299	Sinergizam	18,8775402	Sinergizam
P-10 + PS-0,1	28,989786	25,731498	Sinergizam	22,5857394	Sinergizam
P-5 + PS-10	13,753767	10,495479	Sinergizam	7,34972099	Sinergizam
P-5 + PS-5	25,257928	21,99964	Sinergizam	18,8538818	Sinergizam
P-5 + PS-1	29,396093	26,137805	Sinergizam	22,9920469	Sinergizam
P-5 + PS-0,1	30,076016	26,817728	Sinergizam	23,6719692	Sinergizam
P-1 + PS-10	14,294825	11,036537	Sinergizam	7,89077862	Sinergizam
P-1 + PS-5	21,438637	18,180349	Sinergizam	15,0345909	Sinergizam
P-1 + PS-1	28,985671	25,727383	Sinergizam	22,5816249	Sinergizam
P-1 + PS-0,1	29,820916	26,562628	Sinergizam	23,4168697	Sinergizam
I-100 + PS-10	7,9883148	4,7300268	Sinergizam	1,58426844	Sinergizam
I-100 + PS-5	16,634951	13,376663	Sinergizam	10,2309043	Sinergizam
I-100 + PS-1	19,743461	16,485173	Sinergizam	13,3394141	Sinergizam
I-100 + PS-0,1	18,868099	15,609811	Sinergizam	12,4640528	Sinergizam
I-50 + PS-10	9,3862185	6,1279305	Sinergizam	2,9821721	Sinergizam
I-50 + PS-5	18,573912	15,315624	Sinergizam	12,1698656	Sinergizam
I-50 + PS-1	25,442052	22,183764	Sinergizam	19,038006	Sinergizam
I-50 + PS-0,1	22,465207	19,206919	Sinergizam	16,0611603	Sinergizam
I-10 + PS-10	10,16386	6,9055722	Sinergizam	3,75981387	Sinergizam
I-10 + PS-5	17,326188	14,0679	Sinergizam	10,9221414	Sinergizam
I-10 + PS-1	21,959122	18,700834	Sinergizam	15,555076	Sinergizam

I-10 + PS-0,1	26,752523	23,494235	Sinergizam	20,3484764	Sinergizam
I-5 + PS-10	6,2540502	2,9957622	Sinergizam	-0,14999614	Antagonizam
I-5 + PS-5	9,3203864	6,0620984	Sinergizam	2,91634	Sinergizam
I-5 + PS-1	20,570476	17,312188	Sinergizam	14,16643	Sinergizam
I-5 + PS-0,1	28,127797	24,869509	Sinergizam	21,7237502	Sinergizam
I-1 + PS-10	6,0174661	2,7591781	Sinergizam	-0,38658028	Antagonizam
I-1 + PS-5	6,7405906	3,4823026	Sinergizam	0,33654428	Antagonizam
I-1 + PS-1	30,388718	27,13043	Sinergizam	23,9846717	Sinergizam
I-1 + PS-0,1	29,124536	25,866248	Sinergizam	22,7204895	Sinergizam
C-100 + PS-10	34,263911	31,005623	Sinergizam	27,8598647	Sinergizam
C-100 + PS-5	35,484291	32,226003	Sinergizam	29,0802451	Sinergizam
C-100 + PS-1	39,768158	36,50987	Sinergizam	33,3641114	Sinergizam
C-100 + PS-0,1	39,052175	35,793887	Sinergizam	32,6481282	Sinergizam
C-50 + PS-10	28,037664	24,779376	Sinergizam	21,633618	Sinergizam
C-50 + PS-5	22,98567	19,727382	Sinergizam	16,581624	Sinergizam
C-50 + PS-1	28,052706	24,794418	Sinergizam	21,6486596	Sinergizam
C-50 + PS-0,1	25,349217	22,090929	Sinergizam	18,945171	Sinergizam
C-10 + PS-10	13,21661	9,958322	Sinergizam	6,81256365	Sinergizam
C-10 + PS-5	16,07954	12,821252	Sinergizam	9,67549397	Sinergizam
C-10 + PS-1	8,3421076	5,0838196	Sinergizam	1,93806128	Sinergizam
C-10 + PS-0,1	8,0001604	4,7418724	Sinergizam	1,59611409	Sinergizam
C-5 + PS-10	12,235893	8,9776054	Sinergizam	5,83184707	Sinergizam
C-5 + PS-5	2,9601998	-0,2980882	Antagonizam	-3,4438466	Antagonizam
C-5 + PS-1	1,3336943	-1,9245937	Antagonizam	-5,07035202	Antagonizam
C-5 + PS-0,1	0,6036722	-2,6546158	Antagonizam	-5,80037418	Antagonizam
C-1 + PS-10	9,4742437	6,2159557	Sinergizam	3,0701973	Sinergizam
C-1 + PS-5	1,9453887	-1,3128993	Antagonizam	-4,45865763	Antagonizam
C-1 + PS-1	2,2141331	-1,0441549	Antagonizam	-4,18991321	Antagonizam
C-1 + PS-0,1	-0,258717	-3,5170046	Antagonizam	-6,662763	Antagonizam
F-10 + PS-10	44,78706	41,528772	Sinergizam	38,3830138	Sinergizam
F-10 + PS-5	48,545471	45,287183	Sinergizam	42,1414246	Sinergizam
F-10 + PS-1	46,658243	43,399955	Sinergizam	40,254197	Sinergizam
F-10 + PS-0,1	38,048394	34,790106	Sinergizam	31,6443477	Sinergizam
F-5 + PS-10	48,809201	45,550913	Sinergizam	42,4051551	Sinergizam
F-5 + PS-5	47,484532	44,226244	Sinergizam	41,0804858	Sinergizam
F-5 + PS-1	39,985761	36,727473	Sinergizam	33,5817142	Sinergizam
F-5 + PS-0,1	42,48368	39,225392	Sinergizam	36,0796334	Sinergizam
F-1 + PS-10	23,708673	20,450385	Sinergizam	17,3046267	Sinergizam
F-1 + PS-5	15,509963	12,251675	Sinergizam	9,10591624	Sinergizam
F-1 + PS-1	19,156062	15,897774	Sinergizam	12,7520159	Sinergizam
F-1 + PS-0,1	23,254415	19,996127	Sinergizam	16,8503684	Sinergizam
F-0,5 + PS-10	8,0332521	4,7749641	Sinergizam	1,62920575	Sinergizam
F-0,5 + PS-5	10,428888	7,1706	Sinergizam	4,02484166	Sinergizam

F-0,5 + PS-1	8,3140299	5,0557419	Sinergizam	1,90998351	Sinergizam
F-0,5 + PS-0,1	6,9261855	3,6678975	Sinergizam	0,52213918	Antagonizam
F-0,1 + PS-10	11,14086	7,8825722	Sinergizam	4,73681383	Sinergizam
F-0,1 + PS-5	4,4152302	1,1569422	Sinergizam	-1,98881617	Antagonizam
F-0,1 + PS-1	5,8050801	2,5467921	Sinergizam	-0,59896628	Antagonizam
F-0,1 + PS-0,1	4,9276496	1,6693616	Sinergizam	-1,47639677	Antagonizam

**Tablica 7.** Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i nezavisne akcije te definicija sinergističkog ili antagonističkog učinka za smjese lijekova i PpNP.

Smjesa	% DES	D <sub>DA</sub>	Sin/Ant	D <sub>IA</sub>	Sin/Ant
P-100 + PP-10	8,0932347	4,8349467	Sinergizam	1,68918837	Sinergizam
P-100 + PP-5	17,387905	14,129617	Sinergizam	10,9838591	Sinergizam
P-100 + PP-1	19,718773	16,460485	Sinergizam	13,3147271	Sinergizam
P-100 + PP-0,1	20,217657	16,959369	Sinergizam	13,813611	Sinergizam
P-50 + PP-10	9,7729821	6,5146941	Sinergizam	3,36893573	Sinergizam
P-50 + PP-5	14,668216	11,409928	Sinergizam	8,26417011	Sinergizam
P-50 + PP-1	24,453542	21,195254	Sinergizam	18,0494957	Sinergizam
P-50 + PP-0,1	25,006943	21,748655	Sinergizam	18,6028969	Sinergizam
P-10 + PP-10	13,31763	10,059342	Sinergizam	6,91358328	Sinergizam
P-10 + PP-5	22,905459	19,647171	Sinergizam	16,5014126	Sinergizam
P-10 + PP-1	25,281587	22,023299	Sinergizam	18,8775402	Sinergizam
P-10 + PP-0,1	28,989786	25,731498	Sinergizam	22,5857394	Sinergizam
P-5 + PP-10	13,753767	10,495479	Sinergizam	7,34972099	Sinergizam
P-5 + PP-5	25,257928	21,99964	Sinergizam	18,8538818	Sinergizam
P-5 + PP-1	29,396093	26,137805	Sinergizam	22,9920469	Sinergizam
P-5 + PP-0,1	30,076016	26,817728	Sinergizam	23,6719692	Sinergizam
P-1 + PP-10	14,294825	11,036537	Sinergizam	7,89077862	Sinergizam
P-1 + PP-5	21,438637	18,180349	Sinergizam	15,0345909	Sinergizam
P-1 + PP-1	28,985671	25,727383	Sinergizam	22,5816249	Sinergizam
P-1 + PP-0,1	29,820916	26,562628	Sinergizam	23,4168697	Sinergizam
I-100 + PP-10	7,9883148	4,7300268	Sinergizam	1,58426844	Sinergizam
I-100 + PP-5	16,634951	13,376663	Sinergizam	10,2309043	Sinergizam
I-100 + PP-1	19,743461	16,485173	Sinergizam	13,3394141	Sinergizam
I-100 + PP-0,1	18,868099	15,609811	Sinergizam	12,4640528	Sinergizam
I-50 + PP-10	9,3862185	6,1279305	Sinergizam	2,9821721	Sinergizam
I-50 + PP-5	18,573912	15,315624	Sinergizam	12,1698656	Sinergizam
I-50 + PP-1	25,442052	22,183764	Sinergizam	19,038006	Sinergizam
I-50 + PP-0,1	22,465207	19,206919	Sinergizam	16,0611603	Sinergizam
I-10 + PP-10	10,16386	6,9055722	Sinergizam	3,75981387	Sinergizam
I-10 + PP-5	17,326188	14,0679	Sinergizam	10,9221414	Sinergizam
I-10 + PP-1	21,959122	18,700834	Sinergizam	15,555076	Sinergizam
I-10 + PP-0,1	26,752523	23,494235	Sinergizam	20,3484764	Sinergizam

I-5 + PP-10	6,2540502	2,9957622	Sinergizam	-0,14999614	Antagonizam
I-5 + PP-5	9,3203864	6,0620984	Sinergizam	2,91634	Sinergizam
I-5 + PP-1	20,570476	17,312188	Sinergizam	14,16643	Sinergizam
I-5 + PP-0,1	28,127797	24,869509	Sinergizam	21,7237502	Sinergizam
I-1 + PP-10	6,0174661	2,7591781	Sinergizam	-0,38658028	Antagonizam
I-1 + PP-5	6,7405906	3,4823026	Sinergizam	0,33654428	Antagonizam
I-1 + PP-1	30,388718	27,13043	Sinergizam	23,9846717	Sinergizam
I-1 + PP-0,1	29,124536	25,866248	Sinergizam	22,7204895	Sinergizam
C-100 + PP-10	19,549227	16,290939	Sinergizam	13,1451806	Sinergizam
C-100 + PP-5	28,618033	25,359745	Sinergizam	22,2139866	Sinergizam
C-100 + PP-1	31,75108	28,492792	Sinergizam	25,3470334	Sinergizam
C-100 + PP-0,1	33,288878	30,03059	Sinergizam	26,884832	Sinergizam
C-50 + PP-10	19,00038	15,742092	Sinergizam	12,5963332	Sinergizam
C-50 + PP-5	28,174852	24,916564	Sinergizam	21,7708051	Sinergizam
C-50 + PP-1	37,880731	34,622443	Sinergizam	31,4766845	Sinergizam
C-50 + PP-0,1	35,745868	32,48758	Sinergizam	29,3418219	Sinergizam
C-10 + PP-10	15,907342	12,649054	Sinergizam	9,50329589	Sinergizam
C-10 + PP-5	24,371903	21,113615	Sinergizam	17,9678568	Sinergizam
C-10 + PP-1	33,321707	30,063419	Sinergizam	26,9176603	Sinergizam
C-10 + PP-0,1	24,72891	21,470622	Sinergizam	18,3248641	Sinergizam
C-5 + PP-10	9,1139448	5,8556568	Sinergizam	2,70989847	Sinergizam
C-5 + PP-5	13,398032	10,139744	Sinergizam	6,993986	Sinergizam
C-5 + PP-1	30,392811	27,134523	Sinergizam	23,9887643	Sinergizam
C-5 + PP-0,1	21,553802	18,295514	Sinergizam	15,1497561	Sinergizam
C-1 + PP-10	9,884383	6,626095	Sinergizam	3,48033663	Sinergizam
C-1 + PP-5	12,811227	9,5529393	Sinergizam	6,40718091	Sinergizam
C-1 + PP-1	31,930609	28,672321	Sinergizam	25,5265629	Sinergizam
C-1 + PP-0,1	19,245566	15,987278	Sinergizam	12,8415193	Sinergizam
F-10 + PP-10	18,846497	15,588209	Sinergizam	12,4424508	Sinergizam
F-10 + PP-5	26,255424	22,997136	Sinergizam	19,851378	Sinergizam
F-10 + PP-1	29,878843	26,620555	Sinergizam	23,4747969	Sinergizam
F-10 + PP-0,1	29,159699	25,901411	Sinergizam	22,7556529	Sinergizam
F-5 + PP-10	17,187644	13,929356	Sinergizam	10,7835979	Sinergizam
F-5 + PP-5	27,34286	24,084572	Sinergizam	20,938814	Sinergizam
F-5 + PP-1	31,117084	27,858796	Sinergizam	24,7130377	Sinergizam
F-5 + PP-0,1	28,322579	25,064291	Sinergizam	21,9185323	Sinergizam
F-1 + PP-10	10,624045	7,3657566	Sinergizam	4,21999829	Sinergizam
F-1 + PP-5	19,319429	16,061141	Sinergizam	12,9153828	Sinergizam
F-1 + PP-1	29,344358	26,08607	Sinergizam	22,9403118	Sinergizam
F-1 + PP-0,1	25,548591	22,290303	Sinergizam	19,1445446	Sinergizam
F-0,5 + PP-10	7,9977841	4,7394961	Sinergizam	1,59373774	Sinergizam
F-0,5 + PP-5	13,629882	10,371594	Sinergizam	7,22583556	Sinergizam
F-0,5 + PP-1	27,824	24,565712	Sinergizam	21,4199532	Sinergizam

F-0,5 + PP-0,1	21,513793	18,255505	Sinergizam	15,1097466	Sinergizam
F-0,1 + PP-10	7,3463484	4,0880604	Sinergizam	0,94230201	Antagonizam
F-0,1 + PP-5	9,147799	5,889511	Sinergizam	2,74375261	Sinergizam
F-0,1 + PP-1	28,517496	25,259208	Sinergizam	22,1134501	Sinergizam
F-0,1 + PP-0,1	16,860388	13,6021	Sinergizam	10,4563412	Sinergizam

**Tablica 8.** Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i nezavisne akcije te definicija sinergističkog ili antagonističkog učinka za smjese lijekova i PeNP.

Smjesa	% DES	D <sub>DA</sub>	Sin/Ant	D <sub>IA</sub>	Sin/Ant
P-100 + PE-10	11,640968	8,3826801	Sinergizam	5,23692179	Sinergizam
P-100 + PE-5	14,612671	11,354383	Sinergizam	8,20862427	Sinergizam
P-100 + PE-1	18,46282	15,204532	Sinergizam	12,0587739	Sinergizam
P-100 + PE-0,1	17,888847	14,630559	Sinergizam	11,4848002	Sinergizam
P-50 + PE-10	11,416728	8,1584395	Sinergizam	5,01268117	Sinergizam
P-50 + PE-5	16,699754	13,441466	Sinergizam	10,2957078	Sinergizam
P-50 + PE-1	21,355319	18,097031	Sinergizam	14,9512722	Sinergizam
P-50 + PE-0,1	19,467789	16,209501	Sinergizam	13,0637422	Sinergizam
P-10 + PE-10	17,302529	14,044241	Sinergizam	10,898483	Sinergizam
P-10 + PE-5	24,060607	20,802319	Sinergizam	17,6565603	Sinergizam
P-10 + PE-1	25,967681	22,709393	Sinergizam	19,5636342	Sinergizam
P-10 + PE-0,1	29,447525	26,189237	Sinergizam	23,0434783	Sinergizam
P-5 + PE-10	16,974397	13,716109	Sinergizam	10,5703511	Sinergizam
P-5 + PE-5	20,643509	17,385221	Sinergizam	14,2394625	Sinergizam
P-5 + PE-1	24,669554	21,411266	Sinergizam	18,2655073	Sinergizam
P-5 + PE-0,1	28,089737	24,831449	Sinergizam	21,685691	Sinergizam
P-1 + PE-10	18,444305	15,186017	Sinergizam	12,0402587	Sinergizam
P-1 + PE-5	20,7474	17,489112	Sinergizam	14,3433538	Sinergizam
P-1 + PE-1	24,142897	20,884609	Sinergizam	17,7388505	Sinergizam
P-1 + PE-0,1	28,455928	25,19764	Sinergizam	22,0518821	Sinergizam
I-100 + PE-10	16,35825	13,099962	Sinergizam	9,95420374	Sinergizam
I-100 + PE-5	21,693737	18,435449	Sinergizam	15,2896903	Sinergizam
I-100 + PE-1	24,531718	21,27343	Sinergizam	18,1276713	Sinergizam
I-100 + PE-0,1	25,108777	21,850489	Sinergizam	18,7047309	Sinergizam
I-50 + PE-10	16,367508	13,10922	Sinergizam	9,96346138	Sinergizam
I-50 + PE-5	22,13296	18,874672	Sinergizam	15,7289139	Sinergizam
I-50 + PE-1	25,708467	22,450179	Sinergizam	19,3044203	Sinergizam
I-50 + PE-0,1	26,897559	23,639271	Sinergizam	20,4935127	Sinergizam
I-10 + PE-10	15,004577	11,746289	Sinergizam	8,60053103	Sinergizam
I-10 + PE-5	20,594135	17,335847	Sinergizam	14,1900884	Sinergizam
I-10 + PE-1	27,454046	24,195758	Sinergizam	21,0499997	Sinergizam
I-10 + PE-0,1	27,15163	23,893342	Sinergizam	20,7475835	Sinergizam
I-5 + PE-10	5,5710421	2,3127541	Sinergizam	-0,83300426	Antagonizam



I-5 + PE-5	12,623307	9,3650186	Sinergizam	6,21926027	Sinergizam
I-5 + PE-1	24,49983	21,241542	Sinergizam	18,0957839	Sinergizam
I-5 + PE-0,1	20,989127	17,730839	Sinergizam	14,5850811	Sinergizam
I-1 + PE-10	7,0656367	3,8073487	Sinergizam	0,66159031	Antagonizam
I-1 + PE-5	17,790098	14,53181	Sinergizam	11,3860521	Sinergizam
I-1 + PE-1	17,130749	13,872461	Sinergizam	10,7267024	Sinergizam
I-1 + PE-0,1	21,292572	18,034284	Sinergizam	14,8885259	Sinergizam
C-100 + PE-10	19,138874	15,880586	Sinergizam	12,7348274	Sinergizam
C-100 + PE-5	22,461709	19,203421	Sinergizam	16,0576626	Sinergizam
C-100 + PE-1	23,743037	20,484749	Sinergizam	17,3389905	Sinergizam
C-100 + PE-0,1	26,591914	23,333626	Sinergizam	20,1878676	Sinergizam
C-50 + PE-10	21,913887	18,655599	Sinergizam	15,509841	Sinergizam
C-50 + PE-5	22,864881	19,606593	Sinergizam	16,4608346	Sinergizam
C-50 + PE-1	25,097202	21,838914	Sinergizam	18,6931561	Sinergizam
C-50 + PE-0,1	28,396442	25,138154	Sinergizam	21,9923959	Sinergizam
C-10 + PE-10	19,127589	15,869301	Sinergizam	12,7235427	Sinergizam
C-10 + PE-5	22,048278	18,78999	Sinergizam	15,6442317	Sinergizam
C-10 + PE-1	30,945762	27,687474	Sinergizam	24,5417152	Sinergizam
C-10 + PE-0,1	26,881213	23,622925	Sinergizam	20,4771666	Sinergizam
C-5 + PE-10	14,663972	11,405684	Sinergizam	8,25992566	Sinergizam
C-5 + PE-5	12,557834	9,2995462	Sinergizam	6,1537878	Sinergizam
C-5 + PE-1	27,668065	24,409777	Sinergizam	21,2640189	Sinergizam
C-5 + PE-0,1	18,66389	15,405602	Sinergizam	12,2598436	Sinergizam
C-1 + PE-10	12,956903	9,6986147	Sinergizam	6,5528563	Sinergizam
C-1 + PE-5	10,755358	7,4970697	Sinergizam	4,35131132	Sinergizam
C-1 + PE-1	26,515999	23,257711	Sinergizam	20,1119523	Sinergizam
C-1 + PE-0,1	17,76932	14,511032	Sinergizam	11,3652736	Sinergizam
F-10 + PE-10	8,498415	5,240127	Sinergizam	2,09436865	Sinergizam
F-10 + PE-5	4,131231	0,872943	Antagonizam	-2,2728154	Antagonizam
F-10 + PE-1	23,521446	20,263158	Sinergizam	17,1173997	Sinergizam
F-10 + PE-0,1	13,391877	10,133589	Sinergizam	6,9878307	Sinergizam
F-5 + PE-10	8,3783867	5,1200987	Sinergizam	1,97434034	Sinergizam
F-5 + PE-5	4,6277583	1,3694703	Sinergizam	-1,77628801	Antagonizam
F-5 + PE-1	27,575736	24,317448	Sinergizam	21,1716895	Sinergizam
F-5 + PE-0,1	14,032028	10,77374	Sinergizam	7,62798171	Sinergizam
F-1 + PE-10	9,4186321	6,1603441	Sinergizam	3,01458573	Sinergizam
F-1 + PE-5	4,5549206	1,2966326	Sinergizam	-1,84912571	Antagonizam
F-1 + PE-1	24,389343	21,131055	Sinergizam	17,9852968	Sinergizam
F-1 + PE-0,1	12,260328	9,0020401	Sinergizam	5,85628172	Sinergizam
F-0,5 + PE-10	8,6235727	5,3652847	Sinergizam	2,21952638	Sinergizam
F-0,5 + PE-5	3,4582517	0,1999637	Antagonizam	-2,94579467	Antagonizam
F-0,5 + PE-1	24,193399	20,935111	Sinergizam	17,7893531	Sinergizam
F-0,5 + PE-0,1	13,447275	10,188987	Sinergizam	7,04322839	Sinergizam

F-0,1 + PE-10	7,8992993	4,6410113	Sinergizam	1,49525297	Sinergizam
F-0,1 + PE-5	5,1807093	1,9224213	Sinergizam	-1,22333706	Antagonizam
F-0,1 + PE-1	25,633739	22,375451	Sinergizam	19,2296929	Sinergizam
F-0,1 + PE-0,1	13,519087	10,260799	Sinergizam	7,1150402	Sinergizam

**Tablica 9.** Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i nezavisne akcije te definicija sinergističkog ili antagonističkog učinka za smjese paracetamola i ibuprofena.

PARA	IBU	% DES	D <sub>DA</sub>	Sin/Ant	D <sub>IA</sub>	Sin/Ant
0,1	0,1	12,595	5,322	Sinergizam	5,322	Sinergizam
0,1	0,01	22,104	14,236	Sinergizam	14,236	Sinergizam
0,1	0,001	15,956	7,957	Sinergizam	7,957	Sinergizam
0,1	0,0001	15,689	8,644	Sinergizam	8,644	Sinergizam
0,1	0,00001	28,077	20,771	Sinergizam	20,771	Sinergizam
0,1	0,000001	26,768	19,461	Sinergizam	19,461	Sinergizam
0,01	0,1	0,782	-6,491	Antagonizam	-6,491	Antagonizam
0,01	0,01	18,193	10,325	Sinergizam	10,325	Sinergizam
0,01	0,001	48,383	40,383	Sinergizam	40,383	Sinergizam
0,01	0,0001	19,939	12,894	Sinergizam	12,894	Sinergizam
0,01	0,00001	13,165	5,859	Sinergizam	5,859	Sinergizam
0,01	0,000001	7,553	0,246	Antagonizam	0,246	Antagonizam
0,001	0,1	1,272	-6,532	Antagonizam	-6,532	Antagonizam
0,001	0,01	18,103	9,704	Sinergizam	9,704	Sinergizam
0,001	0,001	0,204	-8,326	Antagonizam	-8,326	Antagonizam
0,001	0,0001	3,972	-3,604	Antagonizam	-3,604	Antagonizam
0,001	0,00001	5,462	-2,375	Antagonizam	-2,375	Antagonizam
0,001	0,000001	1,271	-6,567	Antagonizam	-6,567	Antagonizam
0,0001	0,1	0,209	-7,094	Antagonizam	-7,094	Antagonizam
0,0001	0,01	7,489	-0,409	Antagonizam	-0,409	Antagonizam
0,0001	0,001	5,992	-2,038	Antagonizam	-2,038	Antagonizam
0,0001	0,0001	0,770	-6,305	Antagonizam	-6,305	Antagonizam

0,0001	0,00001	1,008	-6,327	Antagonizam	-6,327	Antagonizam
0,0001	0,000001	14,360	7,023	Sinergizam	7,023	Sinergizam
0,00001	0,1	22,272	14,876	Sinergizam	14,876	Sinergizam
0,00001	0,01	15,817	7,826	Sinergizam	7,826	Sinergizam
0,00001	0,001	3,151	-4,972	Antagonizam	-4,972	Antagonizam
0,00001	0,0001	16,366	9,198	Sinergizam	9,198	Sinergizam
0,00001	0,00001	12,207	4,778	Sinergizam	4,778	Sinergizam
0,00001	0,000001	17,765	10,335	Sinergizam	10,335	Sinergizam
0,000001	0,1	21,234	13,862	Sinergizam	13,862	Sinergizam
0,000001	0,01	10,443	2,476	Sinergizam	2,476	Sinergizam
0,000001	0,001	4,333	-3,765	Antagonizam	-3,765	Antagonizam
0,000001	0,0001	16,663	9,519	Sinergizam	9,519	Sinergizam
0,000001	0,00001	13,217	5,812	Sinergizam	5,812	Sinergizam
0,000001	0,000001	26,970	19,564	Sinergizam	19,564	Sinergizam

**Tablica 10.** Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i nezavisne akcije te definicija sinergističkog ili antagonističkog učinka za smjese paracetamola i karbamazepina.

PARA	CBZ	% DES	D <sub>DA</sub>	Sin/Ant	D <sub>IA</sub>	Sin/Ant
0,1	0,1	3,808	-1,974	Antagonizam	-1,974	Antagonizam
0,1	0,01	4,559	-0,951	Antagonizam	-0,951	Antagonizam
0,1	0,001	2,748	-2,434	Antagonizam	-2,434	Antagonizam
0,1	0,0001	2,686	-2,500	Antagonizam	-2,500	Antagonizam
0,1	0,00001	4,448	-0,647	Antagonizam	-0,647	Antagonizam
0,1	0,000001	6,266	1,327	Sinergizam	1,327	Sinergizam
0,01	0,1	6,071	0,088	Antagonizam	0,088	Antagonizam
0,01	0,01	2,679	-3,033	Antagonizam	-3,033	Antagonizam
0,01	0,001	2,680	-2,702	Antagonizam	-2,702	Antagonizam
0,01	0,0001	6,525	1,139	Sinergizam	1,139	Sinergizam
0,01	0,00001	6,356	1,059	Sinergizam	1,059	Sinergizam
0,01	0,000001	4,281	-0,859	Antagonizam	-0,859	Antagonizam
0,001	0,1	5,445	-0,056	Antagonizam	-0,056	Antagonizam
0,001	0,01	4,572	-0,657	Antagonizam	-0,657	Antagonizam
0,001	0,001	2,130	-2,769	Antagonizam	-2,769	Antagonizam
0,001	0,0001	8,397	3,494	Sinergizam	3,494	Sinergizam

0,001	0,00001	7,070	2,258	Sinergizam	2,258	Sinergizam
0,001	0,000001	7,005	2,348	Sinergizam	2,348	Sinergizam
0,0001	0,1	6,341	0,758	Antagonizam	0,758	Antagonizam
0,0001	0,01	6,422	1,110	Sinergizam	1,110	Sinergizam
0,0001	0,001	9,849	4,866	Sinergizam	4,866	Sinergizam
0,0001	0,0001	5,099	0,113	Antagonizam	0,113	Antagonizam
0,0001	0,00001	13,383	8,486	Sinergizam	8,486	Sinergizam
0,0001	0,000001	10,920	6,180	Sinergizam	6,180	Sinergizam
0,00001	0,1	14,825	9,240	Sinergizam	9,240	Sinergizam
0,00001	0,01	5,008	-0,305	Antagonizam	-0,305	Antagonizam
0,00001	0,001	1,429	-3,554	Antagonizam	-3,554	Antagonizam
0,00001	0,0001	10,513	5,526	Sinergizam	5,526	Sinergizam
0,00001	0,00001	14,016	9,118	Sinergizam	9,118	Sinergizam
0,00001	0,000001	4,275	-0,466	Antagonizam	-0,466	Antagonizam
0,000001	0,1	13,354	7,595	Sinergizam	7,595	Sinergizam
0,000001	0,01	7,062	1,575	Sinergizam	1,575	Sinergizam
0,000001	0,001	2,413	-2,745	Antagonizam	-2,745	Antagonizam
0,000001	0,0001	13,123	7,962	Sinergizam	7,962	Sinergizam
0,000001	0,00001	11,381	6,310	Sinergizam	6,310	Sinergizam
0,000001	0,000001	4,437	-0,479	Antagonistic	-0,479	Antagonistic

**Tablica 11.** Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i nezavisne akcije te definicija sinergističkog ili antagonističkog učinka za smjese paracetamola i fluoksetina.

PARA	FLX	% DES	D <sub>DA</sub>	Sin/Ant	D <sub>IA</sub>	Sin/Ant
0,1	0,1	21,754	10,604	Sinergizam	10,604	Sinergizam
0,1	0,01	10,738	-0,430	Antagonizam	-0,430	Antagonizam
0,1	0,001	9,515	-0,684	Antagonizam	-0,684	Antagonizam
0,1	0,0001	5,235	-5,922	Antagonizam	-5,922	Antagonizam
0,1	0,00001	3,901	-7,250	Antagonizam	-7,250	Antagonizam
0,1	0,000001	2,810	-7,377	Antagonizam	-7,377	Antagonizam
0,01	0,1	21,852	11,743	Sinergizam	11,743	Sinergizam
0,01	0,01	4,645	-5,483	Antagonizam	-5,483	Antagonizam
0,01	0,001	2,933	-6,227	Antagonizam	-6,227	Antagonizam
0,01	0,0001	2,081	-8,035	Antagonizam	-8,035	Antagonizam

0,01	0,00001	3,332	-6,779	Antagonizam	-6,779	Antagonizam
0,01	0,000001	-0,506	-9,654	Antagonizam	-9,654	Antagonizam
0,001	0,1	22,515	11,385	Sinergizam	11,385	Sinergizam
0,001	0,01	9,148	-2,001	Antagonizam	-2,001	Antagonizam
0,001	0,001	10,659	0,479	Antagonizam	0,479	Antagonizam
0,001	0,0001	8,446	-2,692	Antagonizam	-2,692	Antagonizam
0,001	0,00001	6,483	-4,648	Antagonizam	-4,648	Antagonizam
0,001	0,000001	7,951	-2,218	Antagonizam	-2,218	Antagonizam
0,0001	0,1	12,817	0,677	Antagonizam	0,677	Antagonizam
0,0001	0,01	21,839	9,680	Sinergizam	9,680	Sinergizam
0,0001	0,001	14,894	3,704	Sinergizam	3,704	Sinergizam
0,0001	0,0001	5,162	-6,985	Antagonizam	-6,985	Antagonizam
0,0001	0,00001	15,000	2,858	Sinergizam	2,858	Sinergizam
0,0001	0,000001	13,984	2,805	Sinergizam	2,805	Sinergizam
0,00001	0,1	18,540	6,451	Sinergizam	6,451	Sinergizam
0,00001	0,01	22,291	10,182	Sinergizam	10,182	Sinergizam
0,00001	0,001	17,095	5,956	Sinergizam	5,956	Sinergizam
0,00001	0,0001	8,432	-3,664	Antagonizam	-3,664	Antagonizam
0,00001	0,00001	8,799	-3,292	Antagonizam	-3,292	Antagonizam
0,00001	0,000001	4,115	-7,013	Antagonizam	-7,013	Antagonizam
0,000001	0,1	20,681	8,601	Sinergizam	8,601	Sinergizam
0,000001	0,01	25,291	13,192	Sinergizam	13,192	Sinergizam
0,000001	0,001	14,780	3,649	Sinergizam	3,649	Sinergizam
0,000001	0,0001	10,976	-1,111	Antagonizam	-1,111	Antagonizam
0,000001	0,00001	8,288	-3,794	Antagonizam	-3,794	Antagonizam
0,000001	0,000001	5,655	-5,464	Antagonizam	-5,464	Antagonizam

**Tablica 12.** Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i nezavisne akcije te definicija sinergističkog ili antagonističkog učinka za smjese ibuprofena i karbamazepina.

<b>IBU</b>	<b>CBZ</b>	<b>% DES</b>	<b>D<sub>DA</sub></b>	<b>Sin/Ant</b>	<b>D<sub>IA</sub></b>	<b>Sin/Ant</b>
0,1	0,1	8,313	-3,703	Antagonizam	-3,703	Antagonizam
0,1	0,01	10,100	-1,927	Antagonizam	-1,927	Antagonizam
0,1	0,001	4,251	-7,671	Antagonizam	-7,671	Antagonizam
0,1	0,0001	2,071	-10,478	Antagonizam	-10,478	Antagonizam
0,1	0,00001	1,011	-12,007	Antagonizam	-12,007	Antagonizam
0,1	0,000001	3,290	-8,916	Antagonizam	-8,916	Antagonizam
0,01	0,1	1,843	-9,107	Antagonizam	-9,107	Antagonizam
0,01	0,01	0,007	-10,943	Antagonizam	-10,943	Antagonizam
0,01	0,001	3,976	-6,975	Antagonizam	-6,975	Antagonizam
0,01	0,0001	2,553	-8,398	Antagonizam	-8,398	Antagonizam
0,01	0,00001	0,075	-10,875	Antagonizam	-10,875	Antagonizam
0,01	0,000001	2,065	-8,885	Antagonizam	-8,885	Antagonizam
0,001	0,1	2,963	-8,689	Antagonizam	-8,689	Antagonizam
0,001	0,01	5,454	-6,198	Antagonizam	-6,198	Antagonizam
0,001	0,001	1,925	-9,727	Antagonizam	-9,727	Antagonizam
0,001	0,0001	-2,137	-13,789	Antagonizam	-13,789	Antagonizam
0,001	0,00001	2,396	-9,256	Antagonizam	-9,256	Antagonizam
0,001	0,000001	2,111	-9,542	Antagonizam	-9,542	Antagonizam
0,0001	0,1	6,442	-4,230	Antagonizam	-4,230	Antagonizam
0,0001	0,01	2,269	-8,403	Antagonizam	-8,403	Antagonizam
0,0001	0,001	1,162	-9,511	Antagonizam	-9,511	Antagonizam
0,0001	0,0001	2,116	-8,556	Antagonizam	-8,556	Antagonizam
0,0001	0,00001	0,408	-10,264	Antagonizam	-10,264	Antagonizam
0,0001	0,000001	4,891	-5,782	Antagonizam	-5,782	Antagonizam
0,00001	0,1	3,698	-7,738	Antagonizam	-7,738	Antagonizam
0,00001	0,01	2,828	-8,608	Antagonizam	-8,608	Antagonizam

0,00001	0,001	0,162	-11,274	Antagonizam	-11,274	Antagonizam
0,00001	0,0001	4,511	-6,925	Antagonizam	-6,925	Antagonizam
0,00001	0,00001	0,532	-10,904	Antagonizam	-10,904	Antagonizam
0,00001	0,000001	1,233	-10,203	Antagonizam	-10,203	Antagonizam
0,000001	0,1	0,839	-10,611	Antagonizam	-10,611	Antagonizam
0,000001	0,01	0,564	-10,886	Antagonizam	-10,886	Antagonizam
0,000001	0,001	1,138	-10,312	Antagonizam	-10,312	Antagonizam
0,000001	0,0001	0,770	-10,680	Antagonizam	-10,680	Antagonizam
0,000001	0,00001	0,470	-10,980	Antagonizam	-10,980	Antagonizam
0,000001	0,000001	4,148	-7,302	Antagonizam	-7,302	Antagonizam

**Tablica 13.** Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i nezavisne akcije te definicija sinergističkog ili antagonističkog učinka za smjese ibuprofena i fluoksetina.

<b>IBU</b>	<b>FLX</b>	<b>% DES</b>	<b>D<sub>DA</sub></b>	<b>Sin/Ant</b>	<b>D<sub>IA</sub></b>	<b>Sin/Ant</b>
0,1	0,1	11,976	0,567	Antagonizam	0,567	Antagonizam
0,1	0,01	5,921	-5,507	Antagonizam	-5,507	Antagonizam
0,1	0,001	11,176	0,717	Antagonizam	0,717	Antagonizam
0,1	0,0001	8,965	-2,450	Antagonizam	-2,450	Antagonizam
0,1	0,00001	2,795	-8,615	Antagonizam	-8,615	Antagonizam
0,1	0,000001	3,414	-7,033	Antagonizam	-7,033	Antagonizam
0,01	0,1	10,062	-0,306	Antagonizam	-0,306	Antagonizam
0,01	0,01	11,085	0,697	Antagonizam	0,697	Antagonizam
0,01	0,001	3,760	-5,659	Antagonizam	-5,659	Antagonizam
0,01	0,0001	3,300	-7,075	Antagonizam	-7,075	Antagonizam
0,01	0,00001	5,022	-5,348	Antagonizam	-5,348	Antagonizam
0,01	0,000001	3,164	-6,243	Antagonizam	-6,243	Antagonizam
0,001	0,1	14,122	2,732	Sinergizam	2,732	Sinergizam
0,001	0,01	12,892	1,483	Sinergizam	1,483	Sinergizam

0,001	0,001	4,713	-5,727	Antagonizam	-5,727	Antagonizam
0,001	0,0001	4,255	-7,142	Antagonizam	-7,142	Antagonizam
0,001	0,00001	4,314	-7,077	Antagonizam	-7,077	Antagonizam
0,001	0,000001	5,238	-5,190	Antagonizam	-5,190	Antagonizam
0,0001	0,1	10,932	-1,467	Antagonizam	-1,467	Antagonizam
0,0001	0,01	2,399	-10,019	Antagonizam	-10,019	Antagonizam
0,0001	0,001	0,308	-11,142	Antagonizam	-11,142	Antagonizam
0,0001	0,0001	10,998	-1,408	Antagonizam	-1,408	Antagonizam
0,0001	0,00001	0,769	-11,632	Antagonizam	-11,632	Antagonizam
0,0001	0,000001	-0,556	-11,993	Antagonizam	-11,993	Antagonizam
0,00001	0,1	1,515	-10,834	Antagonizam	-10,834	Antagonizam
0,00001	0,01	-0,100	-12,468	Antagonizam	-12,468	Antagonizam
0,00001	0,001	2,390	-9,010	Antagonizam	-9,010	Antagonizam
0,00001	0,0001	0,802	-11,554	Antagonizam	-11,554	Antagonizam
0,00001	0,00001	-0,728	-13,078	Antagonizam	-13,078	Antagonizam
0,00001	0,000001	0,647	-10,740	Antagonizam	-10,740	Antagonizam
0,000001	0,1	1,467	-10,873	Antagonizam	-10,873	Antagonizam
0,000001	0,01	0,835	-11,524	Antagonizam	-11,524	Antagonizam
0,000001	0,001	0,444	-10,946	Antagonizam	-10,946	Antagonizam
0,000001	0,0001	-2,591	-14,938	Antagonizam	-14,938	Antagonizam
0,000001	0,00001	0,526	-11,815	Antagonizam	-11,815	Antagonizam
0,000001	0,000001	-0,883	-12,262	Antagonizam	-12,262	Antagonizam

**Tablica 14.** Izračunati koeficijenti adicije koncentracije i nezavisne akcije te definicija sinergističkog ili antagonističkog učinka za smjese karbamazepine i fluoksetina.

<b>CBZ</b>	<b>FLX</b>	<b>% DES</b>	<b>D<sub>DA</sub></b>	<b>Sin/Ant</b>	<b>D<sub>IA</sub></b>	<b>Sin/Ant</b>
0,1	0,1	21,754	10,604	Sinergizam	10,604	Sinergizam
0,1	0,01	10,738	-0,430	Antagonizam	-0,430	Antagonizam



0,1	0,001	9,515	-0,684	Antagonizam	-0,684	Antagonizam
0,1	0,0001	5,235	-5,922	Antagonizam	-5,922	Antagonizam
0,1	0,00001	3,901	-7,250	Antagonizam	-7,250	Antagonizam
0,1	0,000001	2,810	-7,377	Antagonizam	-7,377	Antagonizam
0,01	0,1	21,852	11,743	Sinergizam	11,743	Sinergizam
0,01	0,01	4,645	-5,483	Antagonizam	-5,483	Antagonizam
0,01	0,001	2,933	-6,227	Antagonizam	-6,227	Antagonizam
0,01	0,0001	2,081	-8,035	Antagonizam	-8,035	Antagonizam
0,01	0,00001	3,332	-6,779	Antagonizam	-6,779	Antagonizam
0,01	0,000001	-0,506	-9,654	Antagonizam	-9,654	Antagonizam
0,001	0,1	22,515	11,385	Sinergizam	11,385	Sinergizam
0,001	0,01	9,148	-2,001	Antagonizam	-2,001	Antagonizam
0,001	0,001	10,659	0,479	Antagonizam	0,479	Antagonizam
0,001	0,0001	8,446	-2,692	Antagonizam	-2,692	Antagonizam
0,001	0,00001	6,483	-4,648	Antagonizam	-4,648	Antagonizam
0,001	0,000001	7,951	-2,218	Antagonizam	-2,218	Antagonizam
0,0001	0,1	12,817	0,677	Antagonizam	0,677	Antagonizam
0,0001	0,01	21,839	9,680	Sinergizam	9,680	Sinergizam
0,0001	0,001	14,894	3,704	Sinergizam	3,704	Sinergizam
0,0001	0,0001	5,162	-6,985	Antagonizam	-6,985	Antagonizam
0,0001	0,00001	15,000	2,858	Sinergizam	2,858	Sinergizam
0,0001	0,000001	13,984	2,805	Sinergizam	2,805	Sinergizam
0,00001	0,1	18,540	6,451	Sinergizam	6,451	Sinergizam
0,00001	0,01	22,291	10,182	Sinergizam	10,182	Sinergizam
0,00001	0,001	17,095	5,956	Sinergizam	5,956	Sinergizam
0,00001	0,0001	8,432	-3,664	Antagonizam	-3,664	Antagonizam
0,00001	0,00001	8,799	-3,292	Antagonizam	-3,292	Antagonizam
0,00001	0,000001	4,115	-7,013	Antagonizam	-7,013	Antagonizam
0,000001	0,1	20,681	8,601	Sinergizam	8,601	Sinergizam

0,000001	0,01	25,291	13,192	Sinergizam	13,192	Sinergizam
0,000001	0,001	14,780	3,649	Sinergizam	3,649	Sinergizam
0,000001	0,0001	10,976	-1,111	Antagonizam	-1,111	Antagonizam
0,000001	0,00001	8,288	-3,794	Antagonizam	-3,794	Antagonizam
0,000001	0,000001	5,655	-5,464	Antagonizam	-5,464	Antagonizam

**Tablica 15.** Sastav trokomponentnih smjesa paracetamola, ibuprofena i karbamazepina.

Smjesa	PARA ( $\mu\text{M}$ )	IBU ( $\mu\text{M}$ )	CBZ ( $\mu\text{M}$ )	Smjesa	PARA ( $\mu\text{M}$ )	IBU ( $\mu\text{M}$ )	CBZ ( $\mu\text{M}$ )
P1-I1-C1	0,1	0,1	0,1	P3-I1-C1	0,00001	0,1	0,1
P1-I1-C2	0,1	0,1	0,01	P3-I1-C2	0,00001	0,1	0,01
P1-I1-C3	0,1	0,1	0,00001	P3-I1-C3	0,00001	0,1	0,00001
P1-I1-C4	0,1	0,1	0,000001	P3-I1-C4	0,00001	0,1	0,000001
P1-I2-C1	0,1	0,01	0,1	P3-I2-C1	0,00001	0,01	0,1
P1-I2-C2	0,1	0,01	0,01	P3-I2-C2	0,00001	0,01	0,01
P1-I2-C3	0,1	0,01	0,00001	P3-I2-C3	0,00001	0,01	0,00001
P1-I2-C4	0,1	0,01	0,000001	P3-I2-C4	0,00001	0,01	0,000001
P1-I3-C1	0,1	0,00001	0,1	P3-I3-C1	0,00001	0,00001	0,1
P1-I3-C2	0,1	0,00001	0,01	P3-I3-C2	0,00001	0,00001	0,01
P1-I3-C3	0,1	0,00001	0,00001	P3-I3-C3	0,00001	0,00001	0,00001
P1-I3-C4	0,1	0,00001	0,000001	P3-I3-C4	0,00001	0,00001	0,000001
P1-I4-C1	0,1	0,000001	0,1	P3-I4-C1	0,00001	0,000001	0,1
P1-I4-C2	0,1	0,000001	0,01	P3-I4-C2	0,00001	0,000001	0,01
P1-I4-C3	0,1	0,000001	0,00001	P3-I4-C3	0,00001	0,000001	0,00001
P1-I4-C4	0,1	0,000001	0,000001	P3-I4-C4	0,00001	0,000001	0,000001
P2-I1-C1	0,01	0,1	0,1	P4-I1-C1	0,000001	0,1	0,1
P2-I1-C2	0,01	0,1	0,01	P4-I1-C2	0,000001	0,1	0,01
P2-I1-C3	0,01	0,1	0,00001	P4-I1-C3	0,000001	0,1	0,00001
P2-I1-C4	0,01	0,1	0,000001	P4-I1-C4	0,000001	0,1	0,000001
P2-I2-C1	0,01	0,01	0,1	P4-I2-C1	0,000001	0,01	0,1
P2-I2-C2	0,01	0,01	0,01	P4-I2-C2	0,000001	0,01	0,01
P2-I2-C3	0,01	0,01	0,00001	P4-I2-C3	0,000001	0,01	0,00001
P2-I2-C4	0,01	0,01	0,000001	P4-I2-C4	0,000001	0,01	0,000001
P2-I3-C1	0,01	0,00001	0,1	P4-I3-C1	0,000001	0,00001	0,1
P2-I3-C2	0,01	0,00001	0,01	P4-I3-C2	0,000001	0,00001	0,01
P2-I3-C3	0,01	0,00001	0,00001	P4-I3-C3	0,000001	0,00001	0,00001
P2-I3-C4	0,01	0,00001	0,000001	P4-I3-C4	0,000001	0,00001	0,000001
P2-I4-C1	0,01	0,000001	0,1	P4-I4-C1	0,000001	0,000001	0,1
P2-I4-C2	0,01	0,000001	0,01	P4-I4-C2	0,000001	0,000001	0,01

P2-I4-C3	0,01	0,000001	0,00001	P4-I4-C3	0,000001	0,000001	0,00001
P2-I4-C4	0,01	0,000001	0,000001	P4-I4-C4	0,000001	0,000001	0,000001

**Tablica 16.** Sastav trokomponentnih smjesa paracetamola, ibuprofena i fluoksetina.

Smjesa	PARA ( $\mu\text{M}$ )	IBU ( $\mu\text{M}$ )	FLX ( $\mu\text{M}$ )	Smjesa	PARA ( $\mu\text{M}$ )	IBU ( $\mu\text{M}$ )	FLX ( $\mu\text{M}$ )
P1-I1-F1	0,1	0,1	0,01	P3-I1-F1	0,00001	0,1	0,01
P1-I1-F2	0,1	0,1	0,001	P3-I1-F2	0,00001	0,1	0,001
P1-I1-F3	0,1	0,1	0,000001	P3-I1-F3	0,00001	0,1	0,000001
P1-I1-F4	0,1	0,1	0,0000001	P3-I1-F4	0,00001	0,1	0,0000001
P1-I2-F1	0,1	0,01	0,01	P3-I2-F1	0,00001	0,01	0,01
P1-I2-F2	0,1	0,01	0,001	P3-I2-F2	0,00001	0,01	0,001
P1-I2-F3	0,1	0,01	0,000001	P3-I2-F3	0,00001	0,01	0,000001
P1-I2-F4	0,1	0,01	0,0000001	P3-I2-F4	0,00001	0,01	0,0000001
P1-I3-F1	0,1	0,00001	0,01	P3-I3-F1	0,00001	0,00001	0,01
P1-I3-F2	0,1	0,00001	0,001	P3-I3-F2	0,00001	0,00001	0,001
P1-I3-F3	0,1	0,00001	0,000001	P3-I3-F3	0,00001	0,00001	0,000001
P1-I3-F4	0,1	0,00001	0,0000001	P3-I3-F4	0,00001	0,00001	0,0000001
P1-I4-F1	0,1	0,000001	0,01	P3-I4-F1	0,00001	0,000001	0,01
P1-I4-F2	0,1	0,000001	0,001	P3-I4-F2	0,00001	0,000001	0,001
P1-I4-F3	0,1	0,000001	0,000001	P3-I4-F3	0,00001	0,000001	0,000001
P1-I4-F4	0,1	0,000001	0,0000001	P3-I4-F4	0,00001	0,000001	0,0000001
P2-I1-F1	0,01	0,1	0,01	P4-I1-F1	0,000001	0,1	0,01
P2-I1-F2	0,01	0,1	0,001	P4-I1-F2	0,000001	0,1	0,001
P2-I1-F3	0,01	0,1	0,000001	P4-I1-F3	0,000001	0,1	0,000001
P2-I1-F4	0,01	0,1	0,0000001	P4-I1-F4	0,000001	0,1	0,0000001
P2-I2-F1	0,01	0,01	0,01	P4-I2-F1	0,000001	0,01	0,01
P2-I2-F2	0,01	0,01	0,001	P4-I2-F2	0,000001	0,01	0,001
P2-I2-F3	0,01	0,01	0,000001	P4-I2-F3	0,000001	0,01	0,000001
P2-I2-F4	0,01	0,01	0,0000001	P4-I2-F4	0,000001	0,01	0,0000001
P2-I3-F1	0,01	0,00001	0,01	P4-I3-F1	0,000001	0,00001	0,01
P2-I3-F2	0,01	0,00001	0,001	P4-I3-F2	0,000001	0,00001	0,001
P2-I3-F3	0,01	0,00001	0,000001	P4-I3-F3	0,000001	0,00001	0,000001
P2-I3-F4	0,01	0,00001	0,0000001	P4-I3-F4	0,000001	0,00001	0,0000001
P2-I4-F1	0,01	0,000001	0,01	P4-I4-F1	0,000001	0,000001	0,01
P2-I4-F2	0,01	0,000001	0,001	P4-I4-F2	0,000001	0,000001	0,001
P2-I4-F3	0,01	0,000001	0,000001	P4-I4-F3	0,000001	0,000001	0,000001
P2-I4-F4	0,01	0,000001	0,0000001	P4-I4-F4	0,000001	0,000001	0,0000001

**Tablica 17.** Sastav trokomponentnih smjesa paracetamola, fluoksetina i karbamazepina.

Smjesa	PARA ( $\mu\text{M}$ )	FLX ( $\mu\text{M}$ )	CBZ ( $\mu\text{M}$ )	Smjesa	PARA ( $\mu\text{M}$ )	FLX ( $\mu\text{M}$ )	CBZ ( $\mu\text{M}$ )
P1-F1-C1	0,1	0,01	0,1	P3-F1-C1	0,00001	0,01	0,1
P1-F1-C2	0,1	0,01	0,01	P3-F1-C2	0,00001	0,01	0,01
P1-F1-C3	0,1	0,01	0,00001	P3-F1-C3	0,00001	0,01	0,00001
P1-F1-C4	0,1	0,01	0,000001	P3-F1-C4	0,00001	0,01	0,000001
P1-F2-C1	0,1	0,001	0,1	P3-F2-C1	0,00001	0,001	0,1
P1-F2-C2	0,1	0,001	0,01	P3-F2-C2	0,00001	0,001	0,01
P1-F2-C3	0,1	0,001	0,00001	P3-F2-C3	0,00001	0,001	0,00001
P1-F2-C4	0,1	0,001	0,000001	P3-F2-C4	0,00001	0,001	0,000001
P1-F3-C1	0,1	0,000001	0,1	P3-F3-C1	0,00001	0,000001	0,1
P1-F3-C2	0,1	0,000001	0,01	P3-F3-C2	0,00001	0,000001	0,01
P1-F3-C3	0,1	0,000001	0,00001	P3-F3-C3	0,00001	0,000001	0,00001
P1-F3-C4	0,1	0,000001	0,000001	P3-F3-C4	0,00001	0,000001	0,000001
P1-F4-C1	0,1	0,0000001	0,1	P3-F4-C1	0,00001	0,0000001	0,1
P1-F4-C2	0,1	0,0000001	0,01	P3-F4-C2	0,00001	0,0000001	0,01
P1-F4-C3	0,1	0,0000001	0,00001	P3-F4-C3	0,00001	0,0000001	0,00001
P1-F4-C4	0,1	0,0000001	0,000001	P3-F4-C4	0,00001	0,0000001	0,000001
P2-F1-C1	0,01	0,01	0,1	P4-F1-C1	0,000001	0,01	0,1
P2-F1-C2	0,01	0,01	0,01	P4-F1-C2	0,000001	0,01	0,01
P2-F1-C3	0,01	0,01	0,00001	P4-F1-C3	0,000001	0,01	0,00001
P2-F1-C4	0,01	0,01	0,000001	P4-F1-C4	0,000001	0,01	0,000001
P2-F2-C1	0,01	0,001	0,1	P4-F2-C1	0,000001	0,001	0,1
P2-F2-C2	0,01	0,001	0,01	P4-F2-C2	0,000001	0,001	0,01
P2-F2-C3	0,01	0,001	0,00001	P4-F2-C3	0,000001	0,001	0,00001
P2-F2-C4	0,01	0,001	0,000001	P4-F2-C4	0,000001	0,001	0,000001
P2-F3-C1	0,01	0,000001	0,1	P4-F3-C1	0,000001	0,000001	0,1
P2-F3-C2	0,01	0,000001	0,01	P4-F3-C2	0,000001	0,000001	0,01
P2-F3-C3	0,01	0,000001	0,00001	P4-F3-C3	0,000001	0,000001	0,00001
P2-F3-C4	0,01	0,000001	0,000001	P4-F3-C4	0,000001	0,000001	0,000001
P2-F4-C1	0,01	0,0000001	0,1	P4-F4-C1	0,000001	0,0000001	0,1
P2-F4-C2	0,01	0,0000001	0,01	P4-F4-C2	0,000001	0,0000001	0,01
P2-F4-C3	0,01	0,0000001	0,00001	P4-F4-C3	0,000001	0,0000001	0,00001
P2-F4-C4	0,01	0,0000001	0,000001	P4-F4-C4	0,000001	0,0000001	0,000001

**Tablica 18.** Sastav trokomponentnih smjesa ibuprofena, fluoksetina i karbamazepina.

Smjesa	FLX ( $\mu\text{M}$ )	IBU ( $\mu\text{M}$ )	CBZ ( $\mu\text{M}$ )	Smjesa	FLX ( $\mu\text{M}$ )	IBU ( $\mu\text{M}$ )	CBZ ( $\mu\text{M}$ )
F1-I1-C1	0,01	0,1	0,1	F3-I1-C1	0,000001	0,1	0,1
F1-I1-C2	0,01	0,1	0,01	F3-I1-C2	0,000001	0,1	0,01

F1-I1-C3	0,01	0,1	0,00001	F3-I1-C3	0,000001	0,1	0,00001
F1-I1-C4	0,01	0,1	0,000001	F3-I1-C4	0,000001	0,1	0,000001
F1-I2-C1	0,01	0,01	0,1	F3-I2-C1	0,000001	0,01	0,1
F1-I2-C2	0,01	0,01	0,01	F3-I2-C2	0,000001	0,01	0,01
F1-I2-C3	0,01	0,01	0,00001	F3-I2-C3	0,000001	0,01	0,00001
F1-I2-C4	0,01	0,01	0,000001	F3-I2-C4	0,000001	0,01	0,000001
F1-I3-C1	0,01	0,00001	0,1	F3-I3-C1	0,000001	0,00001	0,1
F1-I3-C2	0,01	0,00001	0,01	F3-I3-C2	0,000001	0,00001	0,01
F1-I3-C3	0,01	0,00001	0,00001	F3-I3-C3	0,000001	0,00001	0,00001
F1-I3-C4	0,01	0,00001	0,000001	F3-I3-C4	0,000001	0,00001	0,000001
F1-I4-C1	0,01	0,000001	0,1	F3-I4-C1	0,000001	0,000001	0,1
F1-I4-C2	0,01	0,000001	0,01	F3-I4-C2	0,000001	0,000001	0,01
F1-I4-C3	0,01	0,000001	0,00001	F3-I4-C3	0,000001	0,000001	0,00001
F1-I4-C4	0,01	0,000001	0,000001	F3-I4-C4	0,000001	0,000001	0,000001
F2-I1-C1	0,001	0,1	0,1	F4-I1-C1	0,0000001	0,1	0,1
F2-I1-C2	0,001	0,1	0,01	F4-I1-C2	0,0000001	0,1	0,01
F2-I1-C3	0,001	0,1	0,00001	F4-I1-C3	0,0000001	0,1	0,00001
F2-I1-C4	0,001	0,1	0,000001	F4-I1-C4	0,0000001	0,1	0,000001
F2-I2-C1	0,001	0,01	0,1	F4-I2-C1	0,0000001	0,01	0,1
F2-I2-C2	0,001	0,01	0,01	F4-I2-C2	0,0000001	0,01	0,01
F2-I2-C3	0,001	0,01	0,00001	F4-I2-C3	0,0000001	0,01	0,00001
F2-I2-C4	0,001	0,01	0,000001	F4-I2-C4	0,0000001	0,01	0,000001
F2-I3-C1	0,001	0,00001	0,1	F4-I3-C1	0,0000001	0,00001	0,1
F2-I3-C2	0,001	0,00001	0,01	F4-I3-C2	0,0000001	0,00001	0,01
F2-I3-C3	0,001	0,00001	0,00001	F4-I3-C3	0,0000001	0,00001	0,00001
F2-I3-C4	0,001	0,00001	0,000001	F4-I3-C4	0,0000001	0,00001	0,000001
F2-I4-C1	0,001	0,000001	0,1	F4-I4-C1	0,0000001	0,000001	0,1
F2-I4-C2	0,001	0,000001	0,01	F4-I4-C2	0,0000001	0,000001	0,01
F2-I4-C3	0,001	0,000001	0,00001	F4-I4-C3	0,0000001	0,000001	0,00001
F2-I4-C4	0,001	0,000001	0,000001	F4-I4-C4	0,0000001	0,000001	0,000001

## 8. POPIS KRATICA

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

AOP – put štetnog ishoda (od engl. *Adverse Outcome Pathway*)

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*)

BMD – doza pri kojoj se postiže željeni odgovor (od engl. *benchmark dose*)

CA – celulozni acetat

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

DDD – definirana dnevna doza

DES – dietilstilbestrol

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

DMSO – dimetilsulfoksid

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

E2 - 17 $\beta$ -estradiol

ECHA – European Chemicals Agency

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

EDSP – Endocrine disruptor screening programme

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina

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

EMA – European Medicines Agency

ER – estrogenski receptor

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

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

FDA – Food and Drug Administration

FITC – fluorescein izotiocijanat

IC50 – koncentracija lijeka koja ubija 50 % stanica

LC/MS-MS – vezani sustav tekućinska kromatografija – tandemaska spektrometrija masa

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

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

NCI-H295R – humana stanična linija za ispitivanje učinaka na proces steroidogeneze

NSAIDs/NSAIL – nesteroidni protuupalni lijekovi (od engl. *non-steroidal antiinflammatory drugs*)

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development

OTC – bezreceptni režim izdavanja lijekova (od engl. *over-the-counter*)

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

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

PE – polietilen

PeNP – nanočestice polietilena

PET – polietilen tereftalat

PI – propidij jodid

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

PMS – fenazin metosulfat

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

PP – polipropilen

PpNP – nanočestice polipropilena

PS – polistiren

PsNP – nanočestice polistirena

PTFE – politetrafluoretilen

REACH – Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals

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

RPF – relativni faktor potencije (od engl. *relative potency factor*)

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

SAD – Sjedinjene Američke Države

SSRI – selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (od engl. *selective serotonin reuptake inhibitors*)

T3 – Trijodtironin

T4 – Tiroksin

T47D-KBluc – humana stanična linija za ispitivanje učinaka na aktivnost estrogenskog receptora

TEM – transmisijska elektronska mikroskopija

U.S. EPA – United States Environmental Protection Agency

UNEP – UN Environment Programme

WHO – World Health Organization



## 9. ŽIVOTOPIS

Lucija Božičević rođena je 23. kolovoza 1995. u Ogulinu, gdje je završila osnovnu i srednju školu. Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala je 2014., a završila 2020. godine. Tijekom studija bavila se znanstvenim radom na Zavodu za organsku kemiju pod mentorstvom prof. dr. sc. Valerija Vrčeka te doc. dr. sc. Davora Šakića pri čemu je tijekom studija bila koautor na dva znanstvena rada. Aktivno je bila uključena i u rad studentske udruge CPSA pri čemu se ponajviše bavila uređivanjem i pisanjem za časopis i portal Recipe. Za znanstveni rad nagrađena je Rektorovom nagradom u ak. god. 2017./2018., a za rad na portalu Recipe 2019. godine nagrađena je Rektorovom nagradom za društveno koristan rad u akademskoj i široj zajednici.

Od listopada 2020. godine zaposlena je na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u grupi nasl. izv. prof. dr. sc. Ivane Vinković Vrček, znanstvene savjetnice u trajnom izboru kao asistent-doktorand na projektu „Science-based Risk Governance of Nano-Technology“ (RiskGONE, H2020-NMBP-13-2018 RIA) te u sklopu programa „Projekt razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti“ (natječajni rok DOK-01-2020) Hrvatske zaklade za znanost. Suradivala je i na hrvatsko-kineskom bilateralnom projektu „EmergeTox - Mehanizam hormonalnih učinaka tipičnih zagađivača okoliša“. Tijekom rada na Institutu koautor je na 6 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. Osim toga, ostvarila je pravo na British Scholarship Trust stipendiju te je od kraja ožujka do kraja svibnja 2023. godine boravila na Sveučilištu Swansea u Walesu, Ujedinjeno Kraljevstvo. Od trenutka zaposlenja do predaje disertacije sudjelovala je na više konferencija te edukacija. Članica je Hrvatske ljekarničke komore (HLJK).

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu

Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Doktorski rad

### ENDOKRINO DISRUPTIVNO DJELOVANJE SMJESA NANOČESTICA PLASTIKE I ODABRANIH LIJEKOVA *IN VITRO*

LUCIJA BOŽIČEVIĆ

Pretjerano korištenje i loše gospodarenje plastikom, doveli su do onečišćenja okoliša nanočesticama plastike (engl. plastic nanoparticles, PNP). Iako broj istraživanja o štetnim učincima PNP raste, nedostaju pouzdane informacije o učincima PNP na ljudsko zdravlje, posebice interakcijama s endokrinim sustavom. Osim PNP, okoliš je onečišćen i brojnim lijekovima. Paracetamol, ibuprofen, karbamazepin i fluoksetin svrstavaju su među lijekove koji su u okolišu kvantificirani u znatnim količinama. PNP mogu adsorbirati lijekove te činiti složene smjese čije djelovanje još nije istraženo. Unatoč tome, prisutnost okolišnih onečišćivala u složenim smjesama zanemaruje se te se primarno ispituje učinak pojedinačnih tvari. Cilj istraživanja bio je utvrditi endokrino disruptivne učinke složenih smjesa PNP i lijekova. Istraživanje se temelji na ispitivanju učinaka na aktivnost estrogenskog receptora (ER) i proces steroidogeneze. Složene smjese pripremljene su miješanjem lijekova i/ili nanočestica polistirena, polipropilena i polietilena. PNP su karakterizirane obzirom na oblik, veličinu, raspodjelu veličina i  $\zeta$  potencijal. Učinci pojedinih tvari i njihovih smjesa na preživljenje stanica ispitani su pomoću MTS testa i protočnom citometrijom. Unos PNP u stanice određen je metodom protočne citometrije. Učinci na ER aktivaciju ispitani su luciferaznim testom prema OECD smjernici 455, a utjecaj na proces steroidogeneze qPCR-om i LC-MS/MS metodom prema OECD smjernici 456. Dobiveni rezultati pokazali su da se učinci pojedinačnih tvari značajno razlikuju u odnosu na učinke složenih smjesa. Smjese PNP i lijekova pokazale su znatno jače toksične i endokrino disruptivne učinke. Binarne i tercijarne smjese lijekova pokazuju složeni odnos doze i biološkog odgovora koji ovisi o sastavu smjese.

Rad je pohranjen u Centralnoj knjižnici Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Rad sadrži: 126 stranica, 47 slika, 18 tablica, 203 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: nanočestice plastike, lijekovi, složene smjese, endokrini disruptori, estrogenski receptor, steroidogeneza

Mentori: nasl. izv. prof. dr. sc. Ivana Vinković Vrček, znan. savj. u tr. iz.

red. prof. dr. sc. u tr. iz. Valerije Vrček

Ocjenjivači:

Datum prihvatanja rada:

## BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Doctoral thesis

### ENDOCRINE DISRUPTING EFFECTS OF MIXTURES CONTAINING PLASTIC NANOPARTICLES AND SELECTED PHARMACEUTICALS *IN VITRO*

LUCIJA BOŽIČEVIĆ

Excessive use and inadequate management of plastic have led to environmental pollution with plastic nanoparticles (PNP). Although the number of studies on the adverse effects of PNP is increasing, there is a lack of reliable information on the effects of PNP on human health, especially their interactions with the endocrine system. In addition to PNP, the environment is also polluted with numerous drugs. Paracetamol, ibuprofen, carbamazepine and fluoxetine are among the drugs that are quantified in the environment in significant quantities. PNP can adsorb drugs and form complex mixtures whose action has not been investigated. Despite this, the presence of environmental pollutants in complex mixtures is neglected and the primary focus is on the effect of individual substances. The aim of the research was to determine endocrine disrupting effects of complex mixtures of PNP and drugs. Research is based on the examination of the effects on the estrogen receptor (ER) activity and the process of steroidogenesis. Complex mixtures were prepared by mixing drugs and/or nanoparticles of polystyrene, polypropylene and polyethylene. PNPs are characterized by means of shape, size, size distribution and  $\zeta$  potential. The effects of individual substances and their mixtures on cell survival were tested using the MTS assay and flow cytometry. PNP uptake into cells was determined by flow cytometry. The effects on ER activation were tested with the luciferase assay and OECD Guideline No. 455, and the influence on the steroidogenesis with qPCR and the LC-MS/MS method and OECD Guideline No. 456. The obtained results showed that the effects of individual substances differ significantly compared to the effects of complex mixtures. Mixtures of PNP and drugs showed significantly stronger toxic and endocrine disrupting effects. Binary and ternary mixtures of drugs show a complex dose-biological response relationship that depends on the composition of the mixture.

Thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 126 pages, 47 figures, 18 tables, 203 references. Original is in Croatian language.

Keywords: plastic nanoparticles, pharmaceuticals, mixtures, endocrine disruptors, estrogen receptor, steroidogenesis

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

Full Professor with Tenure Valerije Vrček, PhD

Reviewers:

Accepted:

Cite this: *Environ. Sci.: Nano*, 2024,  
11, 2112

## Estrogenic activity of plastic nanoparticle mixtures under *in vitro* settings†

Lucija Božičević,<sup>a</sup> Korinna Altmann,<sup>b</sup> Jana Hildebrandt,<sup>b</sup> Xenia Knigge,<sup>b</sup> Valerije Vrčec,<sup>c</sup> Nikolina Peranić,<sup>a</sup> Nikolina Kalčec<sup>a</sup> and Ivana Vinković Vrčec<sup>\*a</sup>

The plastic value chain, a central part of modern living, causes environmental pollution and bioaccumulation of plastic nanoparticles (PNPs). Their ubiquitous presence in different environmental and biological compartments has become a serious threat to human health and ecosystems. Frequently used plastic materials such as polypropylene (PP), polystyrene (PS) and polyethylene (PE) have been detected in the form of PNPs in the food chain, soil, water and air, as well as in human feces and blood. In this study, we aimed to provide novel insights into the endocrine disrupting properties of PNPs using *in vitro* estrogen receptor (ER) transactivation assay. The effects of PP-NPs, PE-NPs and PS-NPs and their mixture on the T47D-KBluc cell line stably transfected with luciferase as a reporter enzyme were evaluated by means of cytotoxicity, cellular uptake and ER activation. The tested dose range for PNPs was 0.001–10 mg L<sup>-1</sup>. Both cellular uptake and cytotoxicity for all PNPs were found to be dose-dependent. Only the highest dose of PP-NPs and PE-NPs induced apoptosis and cell death, while PS-NPs were not cytotoxic in the tested dose range. For tested concentrations, PP-NPs and PE-NPs showed significant agonistic activity on the ER, while PS-NPs cannot be considered ER active. When applied as a mixture, PNPs demonstrated additive toxicity effects compared to the effect of each individual PNP. Additivity was also observed for the ER agonistic effect of the PNP mixture according to the benchmark dose-addition modelling approach. This study provides missing science-based evidence on endocrine disrupting effects of PE-NPs, PP-NPs, PS-NPs and their mixtures and highlights the importance of considering unintentional, aggregate and combined exposure to different PNPs in risk management.

Received 29th November 2023,  
Accepted 16th March 2024

DOI: 10.1039/d3en00883e

rsc.li/es-nano

### Environmental significance

Global production of single-use plastic items, inappropriate plastic waste management and resistance of plastic materials to degradation have become issues of great concern for both human and ecosystem health due to their ubiquitous presence in the environment, foodstuff and even in the plastic value chain. Once released into the environment, plastic materials undergo slow chemical, physical and biological degradation and fragmentation to macro-, micro and nanoparticles. These particles may further contaminate different environmental compartments, plants, aquatic and terrestrial organisms, as well as humans. Whole risk management of unintentional exposure to plastics, either human or environmental, is further complicated by a high number of different polymers in industrial applications and use. Combined and aggregated exposure to plastics from different sources may have more pronounced adverse effects on human health and may trigger stronger adverse outcomes than exposure to individual polymer types alone, even at concentrations considered as safe. This study is particularly focused on the estrogenic activity of different plastic nanoparticles (PNP), namely polypropylene (PP), polystyrene (PS) and polyethylene (PE) nanoparticles and their mixtures. Interaction with and activation of estrogen receptors may result in endocrine disruption that may cause developmental, reproductive, neurological and immune adverse effects. Testing was performed according to the OECD test guideline No. 455. Results presented here provide the first evidence of endocrine disrupting properties of different plastic nanoparticles (PE-NPs, PP-NPs and PS-NPs) and their mixtures. Both PE-NPs and PP-NPs can be considered positive for the agonistic effect towards the ER, which was not the case for PS-NPs. Furthermore, the mixture of all three PNPs shows higher agonistic affinity towards the ER in comparison to individual components of the mixture, which highlights the importance of investigating environmentally present contaminants not as individual agents, but rather as parts of complex mixtures.

<sup>a</sup> Institute for Medical Research and Occupational Health, Ksaverska cesta 2, 10001 Zagreb, Croatia. E-mail: ivinkovic@imi.hr

<sup>b</sup> Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Unter den Eichen 87, 12205 Berlin, Germany

<sup>c</sup> Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Zagreb, Ante Kovačića 1, Zagreb, Croatia

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d3en00883e>

### Introduction

Plastics, mainly consisting of polymers, are ubiquitous and unavoidable in industrial applications as a cheap, multifunctional, resistant, easy-to-process and affordable material. Due to these unique properties, the plastic value chain is central to modern living and constitutes a vital

source for innovation-driven growth.<sup>1–6</sup> A 200-fold increase has been estimated for the production of plastics in the last 50 years.<sup>7</sup> Plastics hold similar promise for the future with production expected to double again over the next 20 years in a business-as-usual scenario.<sup>8–10</sup> However, global production of single-use plastic items, inappropriate plastic waste management and resistance of plastic materials to degradation cause environmental contamination with plastic micro- and nanoparticles.<sup>11</sup> Plastics in the environment undergo slow photo-, chemical, physical and biological degradation, which leads to fragmentation into pieces smaller than 5 mm, which are further degraded to plastic nanoparticles (PNPs) with sizes varying from 1 to 1000 nm. Polymeric particles have been detected in oceans, seas, rivers and lakes, while a surface contamination of up to 67 000 particles per km<sup>2</sup> has been estimated for open oceans.<sup>12</sup> Their ubiquitous presence in the environment, foodstuffs and even in the plastic value chain has become an issue of great concern for both human and ecosystem health. A recent literature survey from 26 different studies and in combination with US dietary data estimated total annual exposure to 81 000, 121 000, 74 000, and 98 000 plastic particles for male children, male adults, female children, and female adults, respectively.<sup>13</sup> A recent study<sup>14</sup> revealed that humans are exposed to the abundance of plastic micro- and nanoparticles from bottled water with particle count reaching up to 300 000 particles per bottle, while this was previously estimated to be the number of *ca.* 300 particles. As a support of these exposure-based findings, several research groups detected particles of different polymeric types in human faeces<sup>15–17</sup> and in human blood at concentrations up to 10 mg L<sup>-1</sup>.<sup>18</sup> These data revealed the presence of plastic particles in all stool samples, with polypropylene (PP), polyethylene terephthalate (PET), polystyrene (PS) and polyethylene (PE) as the most frequently found polymer types. Three polymers used in this study (PE, PP and PS) are among the most frequently detected polymers not only in human samples and foodstuffs, but also in the environment.<sup>19–21</sup> The dose range was selected based on the data obtained from several review papers that discuss the toxicological effects and human health impact of plastic micro- and nanoparticles present in the environment.<sup>22–24</sup> Unfortunately, the risk that plastic particles might pose to human health is largely unknown due to the lack of science-based data. Almost neglected ten years ago, this is today one of the most active research topics in the field of toxicology and risk assessment in the European Union and worldwide.<sup>25,26</sup> Environmental contamination with plastic particles can occur along the whole life cycle of plastic-based products, from their manufacturing to their disposal, in their original, aged or transformed form. Whole risk management of unintentional exposure to plastics, either human or environmental, is further complicated by a high number of different polymers in industrial applications and use. The health risks posed by the unwanted presence of specific plastics and their degradation products in different environmental compartments cannot be clearly distinguished

from the total risk related to the exposure due to a combination of different plastic types, *e.g.* multilayer packages, or other types of additives, which typically exceeds the risk related to the exposure to each of the individual components in the mixture. Such combined and aggregated exposure to plastics from different sources may have more pronounced adverse effects on human health and may trigger stronger adverse outcomes (AOs) than exposure to individual polymer types alone, even at concentrations considered as safe (*i.e.* where no effects are expected). In the European Union (EU), the evaluation of human exposure to mixtures was set as a research priority already in the White Paper for a future chemicals policy from 2001. In 2019, the EU set out the European Green Deal program with the zero pollution ambition for a toxic-free environment aiming to make the EU a sustainable climate neutral and circular economy by 2050. However, there is a huge lack of science-based and regulatory-relevant data for proper risk management of plastic particle mixtures. Moreover, human health impacts of exposure to plastic micro- and nanoparticles have been discussed significantly less in available scientific literature compared to their environmental impact despite indications for casual links between such exposure and increased incidence of immune disorders, neurodegenerative disease and cancers.<sup>27,28</sup> Most studies on the toxicity effects of micro- and nanoplastics are focused on cytotoxicity, oxidative stress response, immunotoxicity and genotoxicity,<sup>9,24,29,30</sup> while there is also some evidence on endocrine disrupting (ED) activities of plastic products and plastic microparticles.<sup>31–35</sup> Endocrine disruptors may mimic the effects of natural hormones by interaction with various hormone receptors or they can alter the metabolism of natural hormones. They interfere with the body's endocrine system and may cause developmental, reproductive, neurological and immune adverse effects.<sup>36</sup> Thus, any ED activity of substances and materials represents a global challenge and a source of concern for many EU citizens.<sup>37–39</sup> The screening and testing of potential ED chemicals was initiated by the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) as a high-priority activity back in 1998. One of the regulatory relevant targets for ED adverse effects is estrogenic activity and interference with normal estrogen signalling mediated by estrogen receptors (ERs). To this end, the OECD provides performance-based test guideline (PBTG) No. 455 (ref. 40) for screening and prioritization purposes of ED chemicals. This PBTG describes protocols to identify chemicals that may activate (*i.e.* act as agonists) and also suppress (*i.e.* act as antagonists) ER-dependent transcription.

Our ambition was to contribute to overcome knowledge and data gaps on ED-related effects of various PNPs given individually or in mixtures. A literature search performed in the Web of Science database in May 2023 using keywords micro\* OR nano\* AND plast\* AND endocr\* AND disrupt\* resulted in 834 papers (Fig. 1). Refinement of this search by additional keyword mix\* showed only 71 papers on ED

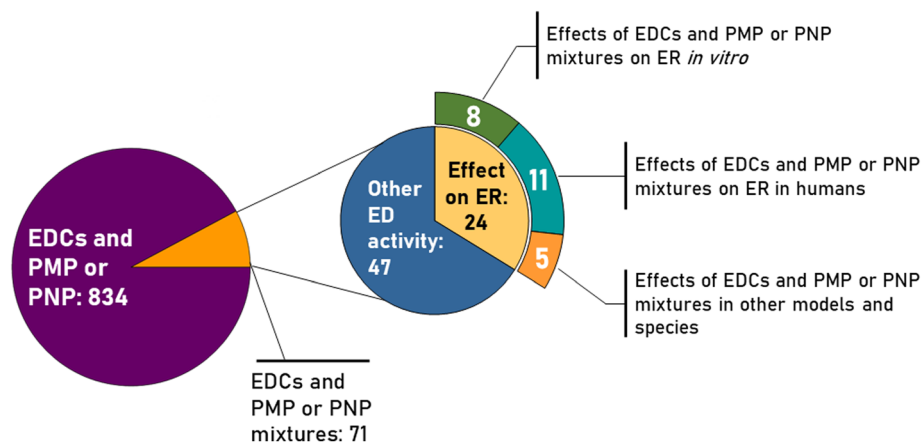


Fig. 1 Results of the literature search on ED effects of plastic micro- and nanoparticles including the numbers of scientific papers found for each keyword's combination.

effects of plastic particles, out of which 24 papers reported their interaction with the ER. Most studies were focused on PS-based particles, while studies on PE and PP showed results for chemicals released from PE- or PP-based products.

Here, we present the first study on the interaction of individual PS-, PE- and PP-based PNPs and their mixture with the ER. Our work has been conducted in accordance with regulatory guidelines for the ED screening programs recommended by the OECD<sup>40</sup> and the United States Environmental Protection Agency (US EPA).<sup>41</sup> Testing was performed using human-derived cell line T47D-KBluc. As we aimed to reach regulatory relevant results that are unbiased by lack of data on PNP characteristics, we used PNPs with defined properties, as scientific cases. The PS-NPs were obtained commercially, while PE-NPs and PP-NPs were developed and prepared by the team of Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM, Berlin, Germany) within the project PlasticsFatE (No. 965367), <https://www.plasticsfate.eu>, granted under the EU Horizon 2020 program. Finally, the obtained results are discussed in the context of the adverse outcome pathways (AOPs) concept that has been launched by the OECD to support risk assessment using mechanistic and causative knowledge on adverse health effects of chemicals and materials.<sup>42–44</sup>

## Materials and methods

### Characterization of nanoparticles

Polystyrene nanoparticles (PS-NPs, 25 nm in size and stock concentration of 10 500 mg L<sup>-1</sup>) were purchased from Phosphorex (Hopkinton, MA, USA). Polyethylene nanoparticles (PE-NPs, 350 nm in size and stock concentration of 82 mg L<sup>-1</sup>) and polypropylene nanoparticles (PP-NPs, 180 nm in size and stock concentration of 41 mg L<sup>-1</sup>) were prepared at the Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM, Berlin, Germany) according to the published procedure.<sup>45</sup> No modification was done for PE-NPs' production.

Visualization of PNPs by transmission electron microscopy (TEM) was used to determine their shape and primary size ( $d$ , nm). For that purpose, PNP suspensions were prepared at a concentration of 1 mg L<sup>-1</sup> in the medium used for *in vitro* testing, *i.e.* RPMI-1640 medium without phenol red (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) supplemented with 5% charcoal-stripped fetal bovine serum (CS-FBS) (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany). Then, a drop of each suspension was deposited on a Formvar®-coated copper grid (SPI Supplies, West Chester, PA, USA) and left overnight to dry at room temperature. The TEM instrument (JEOL JEM 1010, JEOL, Tokyo, Japan) was operated in a bright field mode at an accelerating voltage of 80 kV and images were taken with a Canon PowerShot S50 Camera (Canon, Tokyo, Japan). The primary size was obtained by the analysis of 60 particles per nanoparticle type using the ImageJ software (LOCI, University of Wisconsin, Madison, WI, USA). Results are reported as mean values with standard deviations obtained from measurements of 60 particles.

The size distribution and surface charge of PNPs were examined in the medium used for *in vitro* experiments for 24 h by determination of the hydrodynamic diameter ( $d_H$ ) and  $\zeta$  potential using dynamic light scattering (DLS) and electrophoretic light scattering (ELS) methods, respectively. Measurements were done on the Zetasizer Ultra instrument (Malvern Panalytical, Malvern, UK). The  $d_H$  values were obtained as the average of six measurements and expressed as intensity-weighted size distribution. Surface charge was obtained by determining the  $\zeta$  potential from the Henry equation with the Smoluchowski approximation by using mean values from three replicated ELS measurements. Data was processed in ZS Xplorer 3.21 (Malvern Panalytical, Malvern, UK). Results are shown as mean values with standard deviations obtained from six measurements for  $d_H$  values and three measurements for surface charge values.

Surface characterization according to ageing status and oxidized functionality was conducted by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The measurements were performed with



a lab-based ULVAC-PHI “Quantes” spectrometer (Chanhassen, USA) that is equipped with two X-ray sources: a monochromatic Al K $\alpha$ -source at 1486.6 eV for XPS and a monochromatic Cr K $\alpha$ -source at 5414.8 eV for HAXPES. The starting material granules were directly prepared with double-adhesive tape on a stainless-steel sample holder. The PP-NPs were prepared by putting a droplet on an Au surface and evaporation of the solvent. The particle residue on the Au surface was measured directly. The measuring spot was 100  $\mu$ m and the photoelectrons were collected at an emission angle of 45°. The pressure within the measuring chamber was lower than 10<sup>-6</sup> Pa during the whole measurement. The spectra were corrected to a binding energy of 285 eV for the C 1s peak. The XPS spectra were collected as survey spectra with a step size of 1 eV at a pass energy of 280 eV and a time per step of 200 ms. The measurements were repeated with 2 sweeps for XPS at an X-ray power of 25 W at 15 kV. Here the binding energy ranged from 0 eV to 1100 eV. High-resolution spectra were detected with a pass energy of 54 eV and a step size of 0.1 eV for XPS.

#### Cell line T47D-KBluc

T47D-KBluc (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA) is a human epithelial cell line derived from ductal breast carcinoma. This reporter-labelled cell line was developed for screening of estrogenic or anti-estrogenic activity of chemicals<sup>46</sup> by transfection with a triplet construct: estrogen-responsive elements (ERE)-promoter-luciferase reporter gene.

Cells were cultured in tissue culture (TC) treated T75 flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) in RPMI-1640 cell culture medium supplemented with 10% (v/v) CS-FBS and 1% (v/v) antibiotic-antimycotic solution (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany). Cells were grown at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> until they reached a density of approximately 1 × 10<sup>6</sup> cells per mL (90–95% confluency) at which point they were ready to be used in experiments.

#### Flow cytometry analysis of cell viability and apoptosis

Cells were seeded in TC-treated 12-well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) at density of 1 × 10<sup>5</sup> cells per well in 1 mL of complete cell culture medium and were left to attach for 24 hours in the incubator at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. On the following day, the cell culture medium was replaced and cells were treated with different concentrations of NPs alone and their mixture in the range of 1 × 10<sup>-4</sup>–10 mg L<sup>-1</sup>. Negative controls were non-treated cells, while cells treated with 10% v/v of DMSO (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) were used as positive controls. In addition, cytotoxic effects of Tween and sodium azide were also tested as PS-NPs were obtained as a suspension in deionized water containing 0.1% (v/v) Tween and 2 mM sodium azide. The original suspension of 10 g L<sup>-1</sup> of PS-NPs was diluted 1000 times prior to the experiments and final contents of Tween and sodium azide in the CCM were

0.0001% and 2  $\mu$ M, respectively, which were tested as a vehicle control (VC) and showed no differences compared to non-treated cells (Ctrl).

Treated cells were incubated for 48 hours at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Then, the cell culture medium was removed, and was acquired in 2 mL tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany) and the remaining cells were washed three times with sterile phosphate-buffered saline (PBS). After washing, cells were detached by adding the trypsin-EDTA solution (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) and incubation at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 5–7 minutes until the complete detachment of cells was observed under the microscope. Detached cells were added to 2 mL tubes containing the cell culture medium previously collected. Cells were prepared for measurement by staining with annexin V-FITC and propidium iodide (PI) using annexin V kit (Bio-Rad, Hercules, California, USA) according to the manufacturer's instructions.

Measurements and analysis were done using the Cytoflex SRT instrument and software (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, Indiana, USA). Cells stained with annexin V-FITC dye were considered apoptotic, PI positive cells were categorized as dead and cells stained with both annexin V-FITC and PI were considered late apoptotic. Cells that were not stained were considered live intact cells. Results are expressed as mean % values of apoptotic, dead or live cells compared to negative controls and were obtained from 3 independent experiments by performing 3 replicates in each experiment.

#### Flow cytometry analysis of NP cellular uptake

The prerequisite step to follow the cellular uptake of plastic NPs by flow cytometry was due to the determination of their fluorescence characteristics. All three types of NPs used in this study are characterized by fluorescence emission maxima in the green part of the visible electromagnetic spectrum. While this was a known property for PS-NPs, we determined the emission spectrum for PE-NPs and PP-NPs with a Cary Eclipse fluorescence spectrometer (Agilent, Melbourne, Australia) using a 10 mm path length quartz cuvette (Fig. S1†).

Cellular uptake was then analyzed using a Cytoflex SRT device and software by comparing median fluorescence intensity (MFI) on a 525/40 (FITC) detector of treated and negative control cells. These measurements were done only for NP concentrations that did not affect cellular viability, *i.e.* non-toxic concentrations. Results are presented as % of MFI on the FITC detector in treated cells compared to non-treated control cells. To ensure that the detected fluorescence signals originate from NPs that entered the cells, the experimental set-up (PMT voltage for forward and side scatter light) was adjusted so that it was possible to clearly distinguish debris from cell population using forward *versus* side scatter gating. Only the cell population, excluding the debris, was chosen for further analysis.

### Determination of estrogen receptor activity by luciferase assay

One week prior to the experiment, cells were kept in the cell culture medium in which 10% FBS was exchanged with 10% charcoal-stripped FBS to diminish interferences from serum hormones. After 7 days, cells were seeded in white opaque flat-bottom Nunc™ MicroWell™ 96-well microplates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) at a density of  $2 \times 10^4$  cells per well in 100  $\mu$ L per well of complete cell culture medium where 10% (v/v) charcoal-stripped FBS was exchanged for 5% (v/v) charcoal-stripped FBS.

Cells were incubated for 24 hours at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> to attach properly and then treated for 48 hours with different concentrations of plastic NPs alone or their mixture in a range of  $1 \times 10^{-4}$ –10 mg L<sup>-1</sup>. Non-treated cells were used as a negative control, while cells treated with diethylstilbestrol (DES) were considered as a positive control. After the treatment, cells were prepared for measurement using a Promega luciferase assay system (Cat. No.: E1500 and E1501, Promega, Madison, Wisconsin, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the cell culture medium was discarded and cells were washed thoroughly with PBS. Then, the cell lysate was prepared by adding 20  $\mu$ L of cell culture lysis reagent (included in the kit, diluted 5 times with distilled water as instructed) to each well followed by centrifugation for 20 minutes at 25 °C and 300 rpm using an Eppendorf 5810R centrifuge (Eppendorf, Hamburg, Germany) to achieve complete cell lysis and equilibrate lysates to the temperature optimal for the assay. Then, measurements were done using a SpectraMax iD3 microplate reader (Molecular Devices, San Jose, California, USA), which was prepared by priming the injector system to inject 100  $\mu$ L of the freshly prepared luciferase assay reagent into each well at the time and performing a 2-second measurement delay followed by a 10-second luminescence measurement read.

The Promega luciferase assay system is based on activated ER binding to the estrogen-responsive element (ERE) which is part of cells' DNA sequence. This binding enables gene transcription which results in the production of luciferase enzyme. The produced luciferase enzyme converts assay reagent beetle luciferin to the luminescent product oxyluciferin which produces light at all wavelengths and the measurements are done with all open channels. Before any experiments, the responsiveness of the test system was examined with two positive control substances, 17 $\beta$ -estradiol and diethylstilbestrol (DES), and one negative control substance, fulvestrant (Fig. S2†). In addition, the system was tested for any interferences (Fig. S3 in the ESI†). Diethylstilbestrol was chosen due to better stability and easier handling, after it was confirmed that it produces ER activity comparable to 17 $\beta$ -estradiol. According to the OECD PBTG No. 455,<sup>40</sup> quality control of the assay requires that the mean luciferase activity of the positive control should be at

least 4-fold that of the mean of the negative/vehicle control on each plate. This criterion was met and confirmed by satisfactory differences between positive and negative controls in each run of the assay. During setting up the protocol, interferences of each PNP and their mixtures with the assay components and readouts were also carefully checked and all testing proved the absence of any interferences. For this set of experiments, results were expressed in two different ways as recommended by the aforementioned OECD test guideline No. 455 – as fold inductions of the luminescent signal compared to non-treated cells and % of fold induction of the luminescent signal compared to positive control cells (treated with 10 nM DES).

### Identification of potential adverse outcome pathways (AOPs) in AOP-Wiki

The freely accessible web-based tool AOP-Wiki (<https://aopwiki.org/>) has been used to identify AOPs related to agonistic activity towards the ER, the main adverse effect examined in our study. The search was set up to find the AOPs in which agonism towards the ER is defined as a molecular initiating event (MIE) or key event (KE). After their retrieval, an analysis of AOPs linked to this specific MIE/KE was conducted to ensure that they were relevant and applicable to the results of this study.

### Statistical analysis

Statistical analysis of all the data acquired from the experiments was done using GraphPad Prism6 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test where all the treatment values were compared to negative control values. The threshold for statistical significance for all experimental data was set at  $P < 0.05$ . Statistically significant results were denoted with an asterisk (\*).

## Results and discussion

Considering the ubiquitous presence of different PNPs in different environmental, food and biological matrices it is of utmost importance to determine any possible AO related to human exposure not just to individual PNPs but also to their mixtures.<sup>10,47–49</sup> Many studies already demonstrated the endocrine-disrupting potency of plastics, especially the negative effects of plastic materials on the steroid hormone homeostasis.<sup>50–52</sup> From this perspective, the interaction of a specific substance with the ER has been considered as KE, even as MIE, in the steroid hormone homeostasis.<sup>53</sup> Therefore, our main aim is to reveal for the first time the individual and joint effects of three different PNPs (PE-NPs, PP-NPs and PS-NPs) on the modulation of the ER under *in vitro* settings.



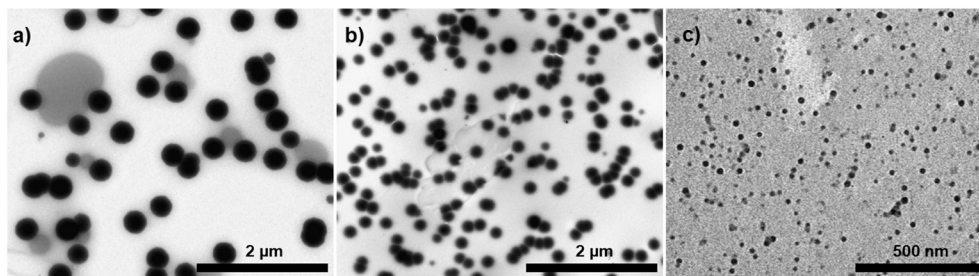


Fig. 2 Transmission electron micrographs (TEM) of polyethylene (a), polypropylene (b) and polystyrene (c) nanoparticles.

### Physico-chemical characteristics and stability of plastic nanoparticles and their mixture

The shape of PS-NPs, PP-NPs and PE-NPs, as evaluated by TEM (Fig. 2), was spherical, while their primary diameters ( $d_{\text{TEM}}$ ) were 25.3, 187.5 and 344.9 nm, respectively (Table 1). It should be highlighted here that PE-NPs and PP-NPs were prepared top-down and their shape should be irregular. After preparation they were characterized as irregularly shaped by scanning electron microscopy (SEM) as given in a previous study.<sup>45</sup> The differences in shape seen in SEM compared to TEM images can arise from the limitations of SEM and TEM. TEM is often used for NPs and works quite well. However, PNPs are polymer-based and suffer from TEM irradiation, which may change their origin shape. Both images are in a way correct just showing the limitations.

Additional important information can be obtained from the surface of the particles, which was analysed by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). It can be assumed that, due to the different production processes, PE and PP are aged on the surface and have oxygen-containing groups, whereas this should not be the case with PS. As an example, the C 1s peak of the starting material (PP pellets) and PP-NPs is shown. It is obvious that there is a further peak at 288.4 eV indicating C=O groups (Fig. S4†). Such ketone groups can be also detected in thermo extraction desorption-gas chromatography/mass spectrometry (TED-GC/MS) measurements not presented in this manuscript. The fluorescence of PE-NPs and PP-NPs themselves can be caused by these ketone groups. No labelling dye was used for PE-NPs and PP-NPs.<sup>54</sup>

Furthermore, hydrodynamic diameter ( $d_{\text{H}}$ ) and  $\zeta$  potential values (Table 1) were measured in both ultrapure-water, the medium in which they are dispersed, and in the cell culture medium (RPMI-1640 supplemented with 5% CS-FBS). The main aim was to evaluate the colloidal stability of different PNPs in the media used for cell experiments. As both parameters are extrinsic properties, thus medium dependent, and all PNP types were dispersed in water after production, the values obtained in the water can be considered as the initial or starting values. Measurements in cell culture medium were done immediately after the addition of PNPs into the medium and after 48 hours of incubation at 37 °C to gain data about PNP behavior during cell experiments. As expected, an increase in  $d_{\text{H}}$  values and less negative  $\zeta$  potential values were observed for all PNP types in the cell culture medium compared to water due to the formation of the hydration shell and protein corona on the nanosurface as most proteins from the cell culture medium may be of size between 1–20 nm and characterized by lower  $\zeta$  potential values compared to the tested PNPs. The increase of hydrodynamic diameter of PNPs in the cell culture medium is also an indication of aggregation due to the increased ionic strength of the medium. However, results indicate that the fate for all tested PNPs in the cell culture medium was similar as their  $d_{\text{H}}$  values doubled after transferring them from water to the cell culture medium (CCM). Moreover, the similar  $\zeta$  potential values observed in this medium after 48 h (Table 1) indicate a similar “aging” process for different PNP types in particular media. Indeed, the presence of CS-FBS in the CCM led to protein corona formation on the PNP surface. Additionally, the colloidal stability and behavior of PNPs

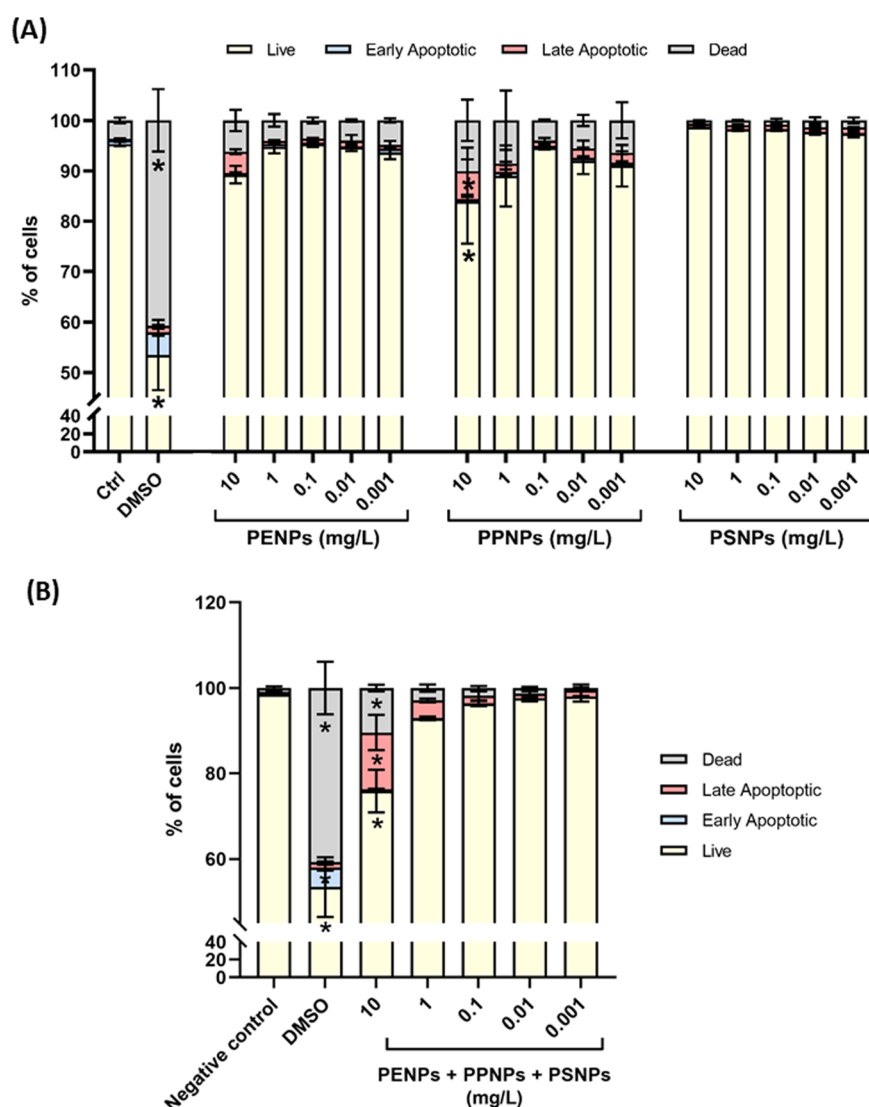
**Table 1** Physico-chemical characteristics of polystyrene (PS-NPs), polypropylene (PP-NPs) and polyethylene (PE-NPs) nanoparticles. Primary diameter ( $d_{\text{TEM}}$ , nm) was obtained by TEM, hydrodynamic diameters ( $d_{\text{H}}$ , nm) were determined by DLS and  $\zeta$  potential was measured using the ELS method. Hydrodynamic diameters and  $\zeta$  values were measured in ultrapure-water (UPW) and cell culture medium (CCM) used in experiments. All measurements were done at 25 °C and the concentration of all three types of nanoparticles was 10 mg L<sup>-1</sup>

Particle type	$d_{\text{TEM}}$ (nm)	Parameter	Measurement conditions (medium, incubation time)		
			UPW, $t = 0$ h	CCM, $t = 0$ h	CCM, $t = 48$ h
PS-NPs	25.3 ± 2.9	$d_{\text{H}}$ (nm)	27.0 ± 1.8	53.9 ± 5.7	87.5 ± 15.3
		$\zeta$ potential (mV)	-26.2 ± 3.3	-8.5 ± 1.3	-18.5 ± 1.8
PP-NPs	187.5 ± 28.7	$d_{\text{H}}$ (nm)	208.5 ± 6.3	345.8 ± 16.3	497.9 ± 37.9
		$\zeta$ potential (mV)	-31.1 ± 0.5	-15.3 ± 2.9	-21.8 ± 1.3
PE-NPs	344.9 ± 18.9	$d_{\text{H}}$ (nm)	372.6 ± 16.9	565.9 ± 72.4	649.2 ± 90.7
		$\zeta$ potential (mV)	-32.6 ± 1.6	-15.8 ± 1.3	-22.3 ± 0.6

given in mixture were also investigated in the CCM at time  $t = 0$  h and  $t = 48$  h. However, such results should be taken with care. Although there were PNPs with sizes of 25 nm, 187 nm and 345 nm in the mixture, only one peak was visible for the mixture containing  $10 \text{ mg L}^{-1}$  of each PNP type ( $261.2 \pm 9.4 \text{ nm}$ ). Indeed, DLS techniques cannot distinguish particles of different sizes and provide only the average size distribution. Moreover, larger particles can “mask” smaller particles. To carefully characterize the size distribution of mixtures containing nanoparticles of very different sizes like in our study other techniques such as particle tracking analysis and electrospray-scanning mobility particle sizer should be used.<sup>55</sup> However, such characterization was beyond the scope of this preliminary study as the main aim was to evaluate ER activity of PNPs given individually or in mixtures.

### Cytotoxic effect of plastic nanoparticles and their mixtures

Cytotoxic effects of PNPs and their mixtures were evaluated prior to any other experiments to determine the safe doses that will not kill or damage the cells. This was the pivotal step to find the dose range in which interaction with and the effect on the ER can be studied in viable T47D-KBluc cells. Therefore, experiments started employing a wide range of  $0.001\text{--}10 \text{ mg L}^{-1}$  for each PNP type administered individually or in mixtures containing all three PNP types at equal concentrations. Results showed that none of the tested PNPs in the given dose range induced significant damage in T47D-KBluc cells, either by means of the % of apoptotic or dead cells (Fig. 3A). The highest number of dead cells was observed after treatment with PP-NPs



**Fig. 3** Flow cytometry results on cell viability and apoptosis induction in the T47D-KBluc cell line treated with A) PE-NPs, PP-NPs and PS-NPs in the dose range  $0.001\text{--}10 \text{ mg L}^{-1}$  and B) mixtures of PE-NPs, PP-NPs and PS-NPs containing the same concentration of each. Non-treated cells were used as the negative control (Ctrl), while cells treated with 10% (v/v) DMSO were used as the positive control. Results are given as % of a number of cells and calculated as mean values from three independent experiments. Standard deviations are given as error bars and values that are significantly different from the negative control are marked with \* (at  $p < 0.05$ ).

(around 5% for doses below  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  and 9% and 10% for 1 and  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively). All tested doses of PE-NPs killed less than 5% of cells, while no cytotoxicity was observed for PS-NPs. Even the treatment with the highest dose of  $10 \text{ mg L}^{-1}$  led to only 10% or less of dead cells and *ca.* 10% of apoptotic cells after treatments with PE-NPs and PP-NPs.

The treatment with the highest concentration of PNPs ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) resulted in more than 80% of live cells (84% for PP-NPs, 89% for PE-NPs and 98% for PS-NPs). When applied as a mixture consisting of the three PNP types with the same concentration, significant toxicity was observed only for the mixture at  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (Fig. 3B) which induced apoptosis in 14% of cells and killed 11% of cells, which may account for the additive effect of each PNP type in the mixture. Therefore, only a dose range between 0.001 and  $1 \text{ mg L}^{-1}$  was used in subsequent experiments to skip any biased results that may arise from dead, unviable or damaged cells.

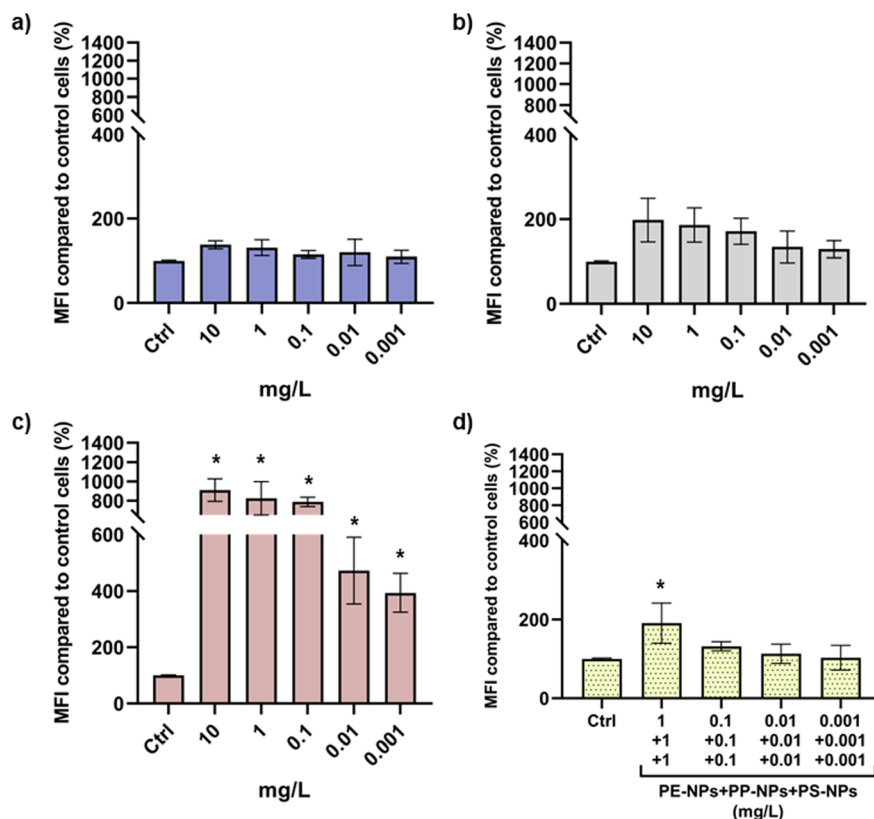
### Cellular uptake of plastic nanoparticles

The uptake of PE-NPs, PP-NPs, PS-NPs and their mixtures was analyzed by flow cytometry employing their emission

maxima in the green part of the spectrum. Thus, the changes in the median fluorescence intensity detected on the 525/40 (FITC) detector indicated internalization of PNPs. Dose-response in cellular uptake was only observed for PS-NPs that also demonstrated significantly higher cellular uptake compared to the other two tested PNPs (Fig. 4).

These results are probably caused by the particle size differences as all three PNPs had similar surface charges. The smallest type, PS-NPs, less than 100 nm in diameter even after agglomeration in the cell culture medium, was more easily internalized by human cells compared to PP-NPs and PE-NPs (Table 1). The cellular uptake of NPs is heavily dependent on their size. This has been discussed in several studies which demonstrated that NPs of smaller size are internalized faster and more extensively under both *in vitro* and *in vivo* conditions.<sup>56–60</sup>

Uptake of the PNP mixture followed a dose-response curve and significantly higher MFI values were observed only for mixtures containing more than  $1 \text{ mg L}^{-1}$  PNPs (Fig. 4d). However, the obtained results for mixtures indicate that the uptake of PS-NPs was significantly inhibited when combined with PE-NPs and PP-NPs, probably due to the presence of large agglomerates that obstructed contact and interaction of PS-NPs with the cell surface.



**Fig. 4** Uptake of a) PE-NPs, b) PP-NPs c) PS-NPs and d) their mixture by T47D-KBluc analyzed by flow cytometry and determined by the increase in median fluorescence intensity (MFI) detected on 525/40 (FITC) detector. Non-treated cells were used as negative control (Ctrl). Results are given as % of MFI compared to control cells and presented as mean values of three replicated experiments, while standard deviations are given as error bars. Values that are significantly different from negative control are marked with \* (at  $p < 0.05$ ).

## ER activity of plastic nanoparticles and their mixture

For the ER agonist assay, decision criteria dictate that the substance can be considered positive if the maximal ER response produced by the treatment with the test substance is equal to or exceeds 10% of the ER response observed in T47D-KBluc cells treated with the positive control. OECD TG No. 455 recommends analysis of results as both fold induction compared to the negative control (non-treated cells) and % of ER induction compared to the positive control (cells treated with DES). Both types of analyses were therefore applied to results obtained by performing luciferase assay as shown in Fig. 5 and 6. Evaluation of ER activity in T47D-KBluc cells after treatment revealed the highest agonistic effect of PE-NPs on ER activity that exhibited significant fold induction of luminescence signals compared to the negative control at all tested concentrations except at the lowest one. Significant ER induction was observed for PP-NPs only at the highest concentration (Fig. 5b). Interestingly, PS-NPs did not affect the ER activity significantly despite their highest cellular uptake compared to the other two PNP types. When T47D-KBluc cells were treated with a PNP mixture, a significant increase in fold induction values compared to the negative control was observed for all applied doses starting from 0.001 mg L<sup>-1</sup> in a dose response manner (Fig. 5d). At

the highest tested mixture dose of 1 mg L<sup>-1</sup> of each PNP a 5 times higher luminescent signal was observed than the signal of the negative control.

In the case of results for % of ER induction compared to cells treated with DES (Fig. 6), only the highest doses (10 mg L<sup>-1</sup>) of PE-NPs and PP-NPs (10 mg L<sup>-1</sup>) can be considered as positive ER agonists when applied alone, while no positive ER response was observed for PS-NPs. However, the PNP mixture showed a positive ER response at 1 mg L<sup>-1</sup> which was observed only insignificantly for PE-NPs (Fig. 6d).

Considering that the modulation of ER activity is not correlated with the uptake of individual NPs, these results could point towards the effect on the ER being affected by plastic materials (polymer) properties. According to the European Food Safety Authority (EFSA), there are several different approaches to calculate the potency of a mixture compared to the individual chemical.<sup>61</sup> As results obtained for the response of T47D-KBluc cells to PE-NPs, PP-NPs, PS-NPs and their mixtures indicate additivity, dose addition modelling<sup>62</sup> was used. Additivity can be assumed when chemicals act in the same or similar mode of action and their joint effect is cumulative compared to individual chemicals. Thus, the relative potency factor (RPF) model was applied to compare the relative potency of the PNP mixture with each of its individual components (PE-NPs, PP-NPs and

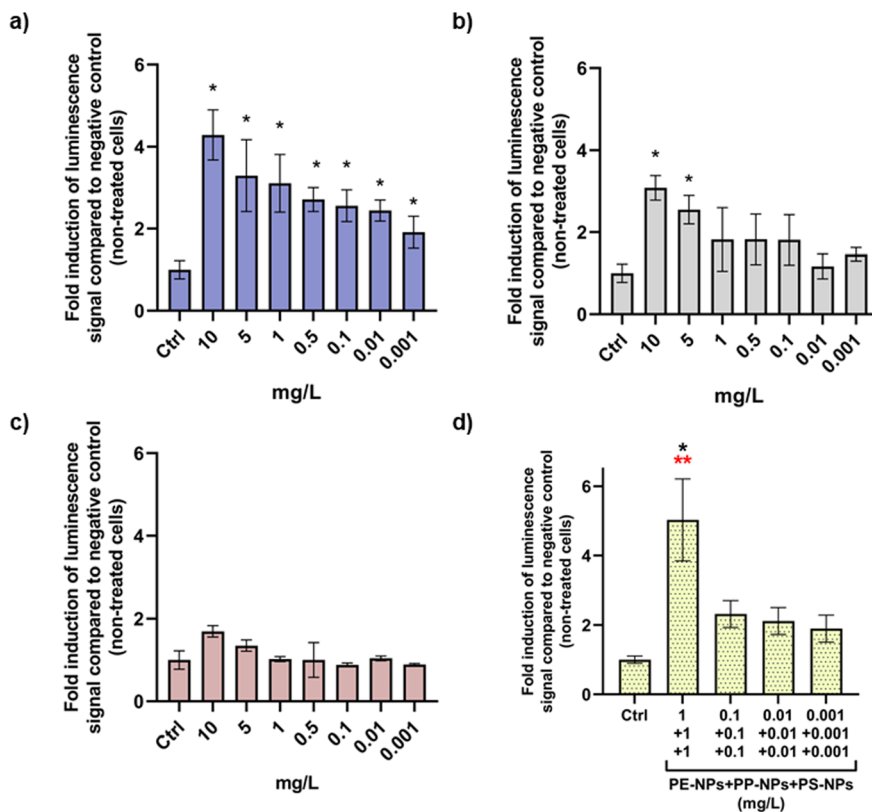
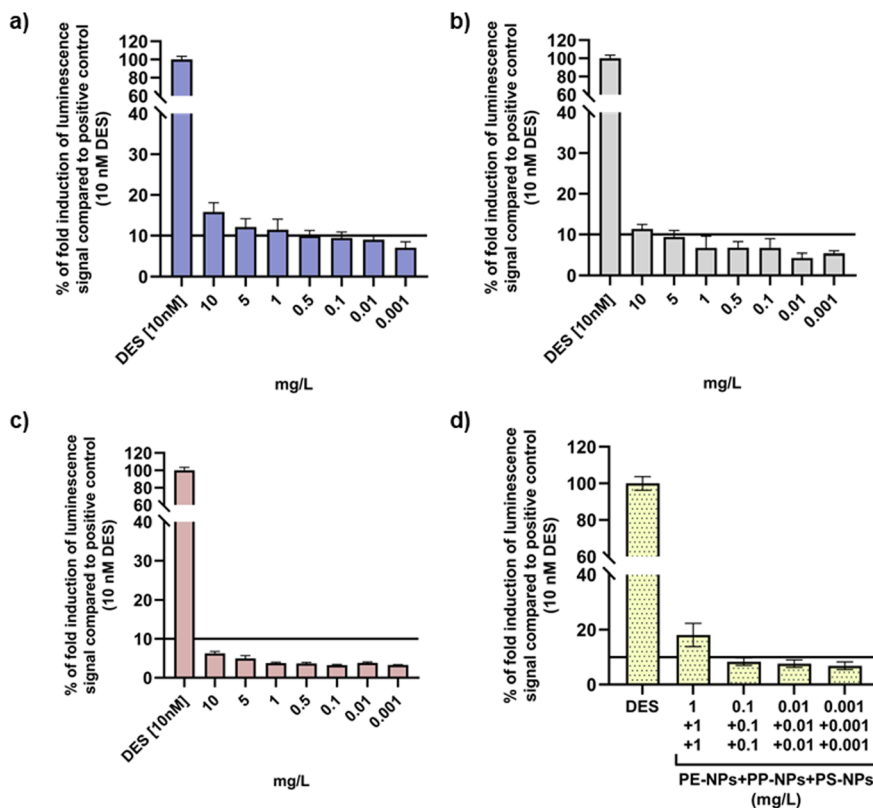


Fig. 5 ER activity induced by a) PE-NPs, b) PP-NPs, c) PS-NPs and d) their mixture. Results are shown as fold inductions of the luminescent signal compared to the negative control. Non-treated cells were used as the negative control (Ctrl). Results are presented as mean values of replicates from repeated experiments, while standard deviations are given as error bars. Values that are significantly different from the negative control are marked with \* ( $p < 0.05$ ), while differences between different treatments are marked with red \*\* ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 6** ER activity induced by a) PE-NPs, b) PP-NPs, c) PS-NPs and d) their mixture. Results are shown as % of fold induction of the luminescent signal in comparison with the positive control (10 nM diethylstilbestrol, DES). Results are presented as mean values of replicates from repeated experiments, while standard deviations are given as error bars. Values above the black line can be considered as positive for ER response according to the decision criteria defined in the OECD PBTG No. 455.

PS-NPs). This approach was chosen because RPF is calculated from benchmark doses (BMD), defined as doses of a substance that result in a pre-specified level of benchmark response (BMR). In our study, data corresponding to the % of ER activation compared to the positive control was used as BMD, and BMR was set to 10% in accordance with the OECD PBTG criteria for labelling chemicals as positive for agonistic activity towards the ER.<sup>40</sup> The advantage of this method is that BMD are equipotent doses for each chemical and are therefore applicable throughout the whole dose–response range even when it differs between substances.<sup>63,64</sup>

Dose–response curves are generated to obtain  $BMD_{mix}$  and  $BMD_{Px-NP}$  for each type of used PNP using the freely available software PROAST.<sup>65</sup> Generated curves are shown in the ESI (Fig. S4–S7†). The BMD of both the PNP mixture and each individual PNPs were calculated as the mean value between

the highest and the lowest BMD doses.  $BMD_{mix}$  was estimated to be 0.6345 and the BMD of each PNP type are shown in Table 2. Then, these data were used to calculate the  $RPF_{mix}$  according to the equation:

$$RPF_{mix} = \frac{BMD_{Px-NP}}{BMD_{mix}}$$

where Px-NP stands for PE-NPs, PP-NPs or PS-NPs. The  $RPF_{mix}$  indicates the potency of the mixture to disrupt ER activity compared to individual PNPs. The  $RPF_{mix}$  results (given in Table 2) clearly demonstrate that the agonistic activity of the PNP mixture towards the ER is higher than each individual component. RPF values are in accordance with the results of potency for each individual nanoparticle, with RPF being the lowest for PE-NPs which showed the highest potency towards the ER.

#### AOPs related to agonistic activity towards the ER

Results of the search for potential AOs related to interaction with the ER, performed by using AOP-Wiki, are listed in Table 3. In this search, ER activation was defined either as a key event (KE) or molecular initiating event (MIE).

**Table 2** Relative potency factor of the mixture ( $RPF_{mix}$ ) calculated from the benchmark doses ( $BMD_{Px-NP}$ ) of individual PNPs and their mixture according to the EFSA guidelines<sup>62</sup>

Type of PNPs	$BMD_{Px-NP}$	$RPF_{mix}$
PE-NPs	4.6845	7.38
PP-NPs	8.7677	13.82
PS-NPs	13.4850	21.25



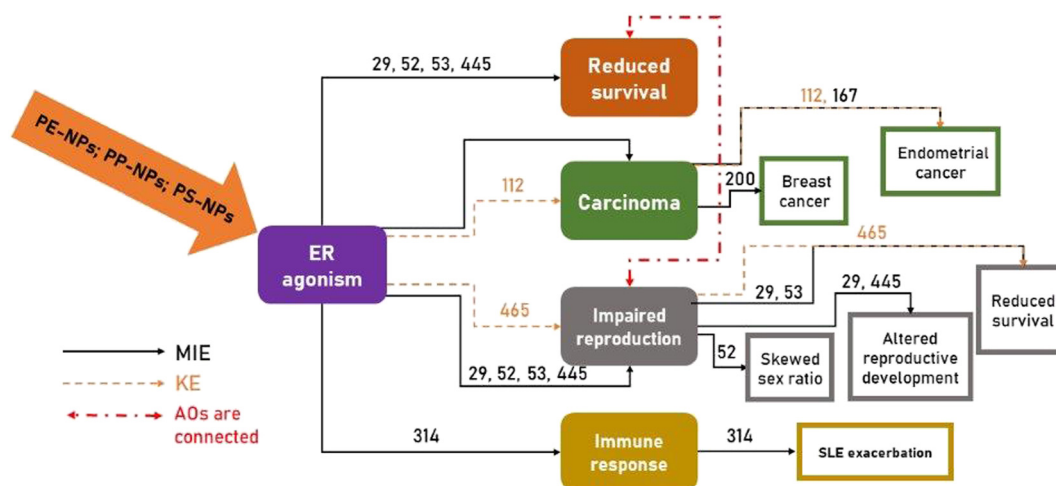
**Table 3** Summary of adverse outcome pathways (AOPs) associated with the agonistic activity of chemicals towards the estrogen receptor (ER). Keywords “estrogen receptor” were used to retrieve all related AOPs and their adverse outcomes (AOs) from AOP-Wiki

AOP number	AOP title	Role of ER agonism in the AOP	AO	Status
200	Estrogen receptor activation leading to breast cancer	MIE	ER + breast cancer	Open for adoption
167	Early-life estrogen receptor activity leading to endometrial carcinoma in the mouse	MIE/KE	Increased adenosquamous carcinomas of the endometrium	Under development
445	Estrogen receptor alpha agonism leads to impaired reproduction	MIE	Impaired reproduction	Under development
29	Estrogen receptor agonism leads to reproductive dysfunction	MIE	Decrease in population, altered reproductive behavior and larval development, impaired development of reproductive organs (in oviparous vertebrates)	Under development
52	ER agonism leading to skewed sex ratios due to altered sexual differentiation in males	MIE	Skewed sex ratio	Under development
53	ER agonism leading to reduced survival due to renal failure	MIE	Reduced survival	Under development
314	Binding to estrogen receptor (ER)- $\alpha$ in immune cells leading to exacerbation of systemic lupus erythematosus (SLE)	MIE	Exacerbation of SLE	Under development
112	Increased dopaminergic activity leading to endometrial adenocarcinomas (in Wistar rat)	KE	Endometrial adenocarcinoma	Under development
465	Alcohol dehydrogenase leading to reproductive dysfunction	KE	Reproductive dysfunction	Under development

The AOP-Wiki search showed that activation of ER leads to the development of various cancers such as breast or ovarian cancer and affects the reproductive capability of different organisms with high-level levels of evidence in various organisms (from invertebrates to mammals). Apart from the effects on the reproductive system, ER activation is also linked to autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus due to the presence of ER on immune cells. Another important cognition is that ER activity is intertwined with other hormonal and enzymatic activities (*e.g.* dopamine and alcohol dehydrogenase activity). Development of cancers after ER activation as an MIE is mediated through various KEs such as increased proliferation and migration of cells,

oxidative stress, non-genomic signalling and inflammatory response through activation of fibroblasts, macrophages and angiogenesis.

This insight in AOPs shows that the interplay of reproductive (and other endocrine) hormones with other organ systems is complex and intricate. Evidence of *in vivo* reproductive toxicity of individual PNPs was already provided in previous studies<sup>23,66–70</sup> and the number of studies on health hazards following aggregate human exposure to complex mixtures is increasing. For example, we showed the effects of mixtures on human breast cells, human lymphocytes and human monocytes using *in vitro* models.<sup>71–73</sup> However, there is no scientific data on the



**Fig. 7** Schematic summary of the network of different adverse outcome pathways (AOPs) (see Table 3) associated with the agonistic activity of PE-NPs, PP-NPs and PS-NPs (given individually or in mixture) towards the estrogen receptor (ER), where the ER agonistic effect was found to be either a molecular initiating event (MIE) or key event (KE).

reproductive toxicity of complex mixtures containing different PNP types. Our pioneering effort to provide scientific evidence of combined PNP effects on ER activity as one of the crucial MIEs/KEs involved in AOs that may lead to severe pathogenesis (Table 3) is fundamental for proper risk assessment that should be implemented in the circular economy for the plastic value chain. Based on the data collected in Table 3, the AOP network has been constructed (Fig. 7), which shows different possible modes of action of PNPs, either given individually or in mixture.

Finally, the main limitation of this study should be discussed as well. The study provides first and preliminary evidence on the ER agonistic action of different PNPs under *in vitro* settings and given individually or in mixture. However, it is not possible to reveal at this stage which physico-chemical characteristics were the most critical for observed biological effects and cellular uptake, as PE-NPs, PP-NPs and PS-NPs were of different sizes ranging from 25 nm to 345 nm. Moreover, they had also different surface chemistry, *i.e.* ketones on the surface of PE-NPs and PP-NPs, while the surface chemistry was not declared by the supplier of fluorescently labelled PS-NPs. All these properties may significantly impact PNP behavior in biological media and their interaction with cells including cellular uptake, cytotoxicity and interaction with receptors. Following studies should consider specifically the specific effects for different PNPs' physico-chemical characteristics.

## Conclusion

Results presented in this paper provide the first evidence of endocrine disrupting properties of plastic nanoparticles (PE-NPs, PP-NPs and PS-NPs) to the *in vitro* model for the detection of ER agonists and antagonists. Both PE-NPs and PP-NPs can be considered positive for the agonistic effect towards the ER in the T47D-KBluc cell line. Furthermore, the mixture of all three PNPs shows higher agonistic affinity towards ER in comparison to individual components of the mixture. Cytotoxicity of individual PNPs was also significantly lower compared to their mixtures. Some ambiguity may result from inherent features of different PNPs (*e.g.* hydrodynamic diameter), but this issue is out of the scope of the current study and will be resolved shortly. All this proves that environmentally present contaminants should not be investigated exclusively as individual agents, but rather as parts of complex mixtures. Therefore, future research on environmentally relevant contaminants, especially plastic nanoparticles, should take into account significant differences between the toxicological profiles of individual components *versus* their mixtures with other nanoparticles or different chemicals.

## Author contributions

Lucija Božičević (data curation; formal analysis; investigation; methodology; visualization; writing – original draft; writing –

review & editing), Korinna Altmann (formal analysis; methodology, funding acquisition; writing – review & editing), Jana Hildebrandt (investigation; formal analysis), Xenia Knigge (methodology; formal analysis), Valerije Vrčec (supervision; writing – review & editing), Nikolina Peranić (data curation; formal analysis; investigation; methodology), Nikolina Kalčec (data curation; formal analysis; investigation; methodology), Ivana Vinković Vrčec (conceptualization; methodology; funding acquisition; project administration; resources; supervision; writing – review & editing).

## Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

## Acknowledgements

This study was performed using the facilities and equipment funded within the European Regional Development Fund project KK.01.1.1.02.0007 “Research and Education Centre of Environmental Health and Radiation Protection – Reconstruction and Expansion of the Institute for Medical Research and Occupational Health”. The authors thank the European Commission for funding the PlasticsFatE joint research project (965367) as part of the Horizon 2020 cluster.

## References

- 1 Y. L. Zhang, S. C. Kang and T. G. Gao, Microplastics have light-absorbing ability to enhance cryospheric melting, *Adv. Clim. Change Res.*, 2022, **13**(4), 455–458, DOI: [10.1016/j.accre.2022.06.005](https://doi.org/10.1016/j.accre.2022.06.005).
- 2 A. Amobonye, P. Bhagwat, S. Raveendran, S. Singh and S. Pillai, Environmental Impacts of Microplastics and Nanoplastics: A Current Overview, *Front. Microbiol.*, 2021, **12**, 768297, DOI: [10.3389/fmicb.2021.768297](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.768297).
- 3 J. P. da Costa, P. S. M. Santos, A. C. Duarte and T. Rocha-Santos, (Nano)plastics in the environment - Sources, fates and effects, *Sci. Total Environ.*, 2016, **566–567**, 15–26, DOI: [10.1016/j.scitotenv.2016.05.041](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.041).
- 4 L. M. Rios Mendoza, D. Leon Vargas and M. Balcer, Microplastics occurrence and fate in the environment, *Curr. Opin. Green Sustainable Chem.*, 2021, **32**, 100523, DOI: [10.1016/j.cogsc.2021.100523](https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100523).
- 5 D. M. Mitrano, P. Wick and B. Nowack, Placing nanoplastics in the context of global plastic pollution, *Nat. Nanotechnol.*, 2021, **16**(5), 491–500, DOI: [10.1038/s41565-021-00888-2](https://doi.org/10.1038/s41565-021-00888-2).
- 6 S. S. Patil, R. V. Bhagwat, V. Kumar and T. Durugkar, *Megaplastics to Nanoplastics: Emerging Environmental Pollutants and Their Environmental Impacts*, 2019, pp. 205–235, DOI: [10.1007/978-981-13-7904-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-981-13-7904-8_10).
- 7 K. Kik, B. Bukowska and P. Sicińska, Polystyrene nanoparticles: Sources, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms, *Environ. Pollut.*, 2020, **262**, 114297, DOI: [10.1016/j.envpol.2020.114297](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114297).

- 8 Z. Sobhani, Y. Lei, Y. Tang, L. Wu, X. Zhang, R. Naidu, M. Megharaj and C. Fang, Microplastics generated when opening plastic packaging, *Sci. Rep.*, 2020, **10**(1), 1–7, DOI: [10.1038/s41598-020-61146-4](https://doi.org/10.1038/s41598-020-61146-4).
- 9 M. Shen, Y. Zhang, Y. Zhu, B. Song, G. Zeng, D. Hu, X. Wen and X. Ren, Recent advances in toxicological research of nanoplastics in the environment: A review, *Environ. Pollut.*, 2019, **252**, 511–521, DOI: [10.1016/j.envpol.2019.05.102](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.102).
- 10 L. Wang, W. M. Wu, N. S. Bolan, D. C. W. Tsang, Y. Li, M. Qin and D. Hou, Environmental fate, toxicity and risk management strategies of nanoplastics in the environment: Current status and future perspectives, *J. Hazard. Mater.*, 2021, **401**, 123415, DOI: [10.1016/j.jhazmat.2020.123415](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123415).
- 11 R. Lehner, C. Weder, A. Petri-Fink and B. Rothen-Rutishauser, Emergence of Nanoplastic in the Environment and Possible Impact on Human Health, *Environ. Sci. Technol.*, 2019, **53**(4), 1748–1765, DOI: [10.1021/acs.est.8b05512](https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05512).
- 12 J.-Q. Jiang, Occurrence of microplastics and its pollution in the environment: A review, *Sustain. Prod. Consum.*, 2018, **13**, 16–23, DOI: [10.1016/j.spc.2017.11.003](https://doi.org/10.1016/j.spc.2017.11.003).
- 13 K. D. Cox, G. A. Covernton, H. L. Davies, J. F. Dower, F. Juanes and S. E. Dudas, Human Consumption of Microplastics, *Environ. Sci. Technol.*, 2019, **53**(12), 7068–7074, DOI: [10.1021/acs.est.9b01517](https://doi.org/10.1021/acs.est.9b01517).
- 14 N. Qian, X. Gao, X. Lang, H. Deng, T. M. Bratu, Q. Chen, P. Stapleton, B. Yan and W. Min, Rapid single-particle chemical imaging of nanoplastics by SRS microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2024, **121**(3), e2300582121, DOI: [10.1073/pnas.2300582121](https://doi.org/10.1073/pnas.2300582121).
- 15 Z. Yan, Y. Liu, T. Zhang, F. Zhang, H. Ren and Y. Zhang, Analysis of Microplastics in Human Feces Reveals a Correlation between Fecal Microplastics and Inflammatory Bowel Disease Status, *Environ. Sci. Technol.*, 2022, **56**(1), 414–421, DOI: [10.1021/acs.est.1c03924](https://doi.org/10.1021/acs.est.1c03924).
- 16 Z. Yan, H. Zhao, Y. Zhao, Q. Zhu, R. Qiao, H. Ren and Y. Zhang, An efficient method for extracting microplastics from feces of different species, *J. Hazard. Mater.*, 2020, **384**, 121489, DOI: [10.1016/j.jhazmat.2019.121489](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121489).
- 17 N. Zhang, Y. Bin Li, H. R. He, J. F. Zhang and G. S. Ma, You are what you eat: Microplastics in the feces of young men living in Beijing, *Sci. Total Environ.*, 2021, **767**, 144345, DOI: [10.1016/j.scitotenv.2020.144345](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144345).
- 18 H. A. Leslie, M. J. M. van Velzen, S. H. Brandsma, A. D. Vethaak, J. J. Garcia-Vallejo and M. H. Lamoree, Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood, *Environ. Int.*, 2022, **163**, 107199, DOI: [10.1016/j.envint.2022.107199](https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107199).
- 19 Y. Feng, C. Tu, R. Li, D. Wu, J. Yang, Y. Xia, W. J. G. M. Peijnenburg and Y. Luo, A systematic review of the impacts of exposure to micro- and nano-plastics on human tissue accumulation and health, *Eco-Environment & Health*, 2023, **2**(4), 195–207, DOI: [10.1016/j.eehl.2023.08.002](https://doi.org/10.1016/j.eehl.2023.08.002).
- 20 P. Schwabl, S. Koppel, P. Konigshofer, T. Bucsics, M. Trauner, T. Reiberger and B. Liebmann, Detection of various microplastics in human stool: A prospective case series, *Ann. Intern. Med.*, 2019, **171**(7), 453–457, DOI: [10.7326/M19-0618](https://doi.org/10.7326/M19-0618).
- 21 D. Lithner, A. Larsson and G. Dave, Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition, *Sci. Total Environ.*, 2011, **409**(18), 3309–3324, DOI: [10.1016/j.scitotenv.2011.04.038](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.04.038).
- 22 M. Shen, Y. Zhang, Y. Zhu, B. Song, G. Zeng, D. Hu, X. Wen and X. Ren, Recent advances in toxicological research of nanoplastics in the environment: A review, *Environ. Pollut.*, 2019, **252**, 511–521, DOI: [10.1016/j.envpol.2019.05.102](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.102).
- 23 I. Ali, Q. Cheng, T. Ding, Q. Yiguang, Z. Yuechao, H. Sun, C. Peng, I. Naz, J. Li and J. Liu, Micro- and nanoplastics in the environment: Occurrence, detection, characterization and toxicity – A critical review, *J. Cleaner Prod.*, 2021, **313**, 127863, DOI: [10.1016/j.jclepro.2021.127863](https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.127863).
- 24 J. L. Xu, X. Lin, J. J. Wang and A. A. Gowen, A review of potential human health impacts of micro- and nanoplastics exposure, *Sci. Total Environ.*, 2022, **851**, 158111, DOI: [10.1016/j.scitotenv.2022.158111](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158111).
- 25 European Commission, *The European Green Deal. European Commission*, 2019, vol. 53(9), p. 24.
- 26 European Commission, *Chemicals Strategy for Sustainability Towards a Toxic-Free Environment*, [https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:f815479a-0f01-11eb-bc07-01aa75ed71a1.0003.02/DOC\\_1&format=PDF](https://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:f815479a-0f01-11eb-bc07-01aa75ed71a1.0003.02/DOC_1&format=PDF).
- 27 S. Allen, D. Allen, S. Karbalaee, V. Maselli and T. R. Walker, Micro(nano)plastics sources, fate, and effects: What we know after ten years of research, *J. Hazard. Mater. Adv.*, 2022, **6**, 100057, DOI: [10.1016/j.hazadv.2022.100057](https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2022.100057).
- 28 J. C. Prata, J. P. da Costa, I. Lopes, A. C. Duarte and T. Rocha-Santos, Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects, *Sci. Total Environ.*, 2020, **702**, 134455, DOI: [10.1016/j.scitotenv.2019.134455](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134455).
- 29 S. S. Sana, L. K. Dogiparthi, L. Gangadhar, A. Chakravorty and N. Abhishek, Effects of microplastics and nanoplastics on marine environment and human health, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2020, **27**(36), 44743–44756, DOI: [10.1007/s11356-020-10573-x](https://doi.org/10.1007/s11356-020-10573-x).
- 30 K. Yin, Y. Wang, H. Zhao, D. Wang, M. Guo, M. Mu, Y. Liu, X. Nie, B. Li, J. Li and M. Xing, A comparative review of microplastics and nanoplastics: Toxicity hazards on digestive, reproductive and nervous system, *Sci. Total Environ.*, 2021, **774**, 145758, DOI: [10.1016/j.scitotenv.2021.145758](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145758).
- 31 C. Z. Yang, S. I. Yaniger, V. C. Jordan, D. J. Klein and G. D. Bittner, Most Plastic Products Release Estrogenic Chemicals: A Potential Health Problem That Can Be Solved, *Environ. Health Perspect.*, 2011, **119**(7), 989–996, DOI: [10.1289/ehp.1003220](https://doi.org/10.1289/ehp.1003220).
- 32 J. H. Park, S. Hong, O.-H. Kim, C.-H. Kim, J. Kim, J.-W. Kim, S. Hong and H. J. Lee, Polypropylene microplastics promote metastatic features in human breast cancer, *Sci. Rep.*, 2023, **13**(1), 6252, DOI: [10.1038/s41598-023-33393-8](https://doi.org/10.1038/s41598-023-33393-8).
- 33 E. Drakvik, R. Altenburger, Y. Aoki, T. Backhaus, T. Bahadori, R. Barouki, W. Brack, M. T. D. Cronin, B. Demeneix, S. H. Bennekou, J. van Klaveren, C. Kneuer, M. Kolossa-Gehring, E. Lebreton, L. Posthuma, L. Reiber, C. Rider, J. Rügge, G. Testa, B. van der Burg, H. van der Voet, A. M. Warhurst, B. van de Water, K. Yamazaki, M. Öberg and Å.



- Bergman, Statement on advancing the assessment of chemical mixtures and their risks for human health and the environment, *Environ. Int.*, 2020, **134**, 105267, DOI: [10.1016/j.envint.2019.105267](https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105267).
- 34 A. F. Hernandez, A. Buha, C. Constantin, D. R. Wallace, D. Sarigiannis, M. Neagu, B. Antonijevic, A. Wallace Hayes, M. F. Wilks and A. Tsatsakis, Critical assessment and integration of separate lines of evidence for risk assessment of chemical mixtures, *Arch. Toxicol.*, 2019, **93**(10), 2741–2757, DOI: [10.1007/s00204-019-02547-x](https://doi.org/10.1007/s00204-019-02547-x).
- 35 S. K. Bopp, A. Kienzler, A.-N. Richarz, S. C. van der Linden, A. Paini, N. Parissis and A. P. Worth, Regulatory assessment and risk management of chemical mixtures: challenges and ways forward, *Crit. Rev. Toxicol.*, 2019, **49**(2), 174–189, DOI: [10.1080/10408444.2019.1579169](https://doi.org/10.1080/10408444.2019.1579169).
- 36 E. Diamanti-Kandarakis, J.-P. Bourguignon, L. C. Giudice, R. Hauser, G. S. Prins, A. M. Soto, R. T. Zoeller and A. C. Gore, Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement, *Endocr. Rev.*, 2009, **30**(4), 293–342, DOI: [10.1210/er.2009-0002](https://doi.org/10.1210/er.2009-0002).
- 37 M. Batke, G. Damm, H. Foth, A. Freyberger, T. Gebel, U. Gundert-Remy, J. Hengstler, A. Mangerich, F. Partosch, C. Röhl, T. Schupp and K. M. Wollin, The EU chemicals strategy for sustainability: critical reflections on proposed regulatory changes for endocrine disruptors and mixture toxicity, *Arch. Toxicol.*, 2022, **96**(4), 1133–1135, DOI: [10.1007/s00204-022-03227-z](https://doi.org/10.1007/s00204-022-03227-z).
- 38 J. Ahlers, B. Schwarz-Schulz and H.-C. Stolzenberg, Strategie für eine zukünftige chemikalienpolitik, *Umweltwiss. Schadst.-Forsch.*, 2001, **13**(2), 75–78, DOI: [10.1007/BF03038641](https://doi.org/10.1007/BF03038641).
- 39 R. N. Carvalho, A. Arukwe, S. Ait-Aissa, A. Bado-Nilles, S. Balzamo, A. Baun, S. Belkin, L. Blaha, F. Brion, D. Conti, N. Creusot, Y. Essig, V. E. Ferrero, V. Flander-Putrlle, M. Fürhacker, R. Grillari-Voglauer, C. Hogstrand, A. Jonáš, J. B. Kharlyngdoh, R. Loos, A. K. Lundebye, C. Modig, P. E. Olsson, S. Pillai, N. Polak, M. Potalivo, W. Sanchez, A. Schifferli, K. Schirmer, S. Sforzini, S. R. Stürzenbaum, L. Søfteland, V. Turk, A. Viarengo, I. Werner, S. Yagur-Kroll, R. Zounková and T. Lettieri, Mixtures of Chemical Pollutants at European Legislation Safety Concentrations: How Safe Are They?, *Toxicol. Sci.*, 2014, **141**(1), 218–233, DOI: [10.1093/toxsci/kfu118](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu118).
- 40 *OECD Test Guideline No. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation In Vitro Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists; OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*, OECD, 2021, DOI: [10.1787/9789264265295-en](https://doi.org/10.1787/9789264265295-en).
- 41 U.S. EPA, Office of Prevention, Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines - OPPTS 890.1300, Estrogen Receptor Transcriptional Activation, 2009, EPA-HQ-OPPT-2009-0576-0006.
- 42 Y. Sakuratani, M. Horie and E. Leinala, Integrated Approaches to Testing and Assessment: OECD Activities on the Development and Use of Adverse Outcome Pathways and Case Studies, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 2018, **123**, 20–28, DOI: [10.1111/bcpt.12955](https://doi.org/10.1111/bcpt.12955).
- 43 N. Delrue, M. Sachana, Y. Sakuratani, A. Gourmelon, E. Leinala and R. Diderich, The Adverse Outcome Pathway Concept: A Basis for Developing Regulatory Decision-making Tools, *ATLA, Altern. Lab. Anim.*, 2016, **44**(5), 417–429, DOI: [10.1177/026119291604400504](https://doi.org/10.1177/026119291604400504).
- 44 M. Vinken, The adverse outcome pathway concept: A pragmatic tool in toxicology, *Toxicology*, 2013, **312**, 158–165, DOI: [10.1016/j.tox.2013.08.011](https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.08.011).
- 45 J. Hildebrandt and A. F. Thünemann, Aqueous Dispersions of Polypropylene: Toward Reference Materials for Characterizing Nanoplastics, *Macromol. Rapid Commun.*, 2023, **44**(6), 2200874, DOI: [10.1002/marc.202200874](https://doi.org/10.1002/marc.202200874).
- 46 V. S. Wilson, Development and Characterization of a Cell Line That Stably Expresses an Estrogen-Responsive Luciferase Reporter for the Detection of Estrogen Receptor Agonist and Antagonists, *Toxicol. Sci.*, 2004, **81**(1), 69–77, DOI: [10.1093/toxsci/kfh180](https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh180).
- 47 J. C. Prata, J. L. Castro, J. P. da Costa, A. C. Duarte, M. Cerqueira and T. Rocha-Santos, An easy method for processing and identification of natural and synthetic microfibers and microplastics in indoor and outdoor air, *MethodsX*, 2020, **7**, 1–9, DOI: [10.1016/j.mex.2019.11.032](https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.11.032).
- 48 J. Q. Jiang, Occurrence of microplastics and its pollution in the environment: A review, *Sustain. Prod. Consum.*, 2018, **13**, 16–23, DOI: [10.1016/j.spc.2017.11.003](https://doi.org/10.1016/j.spc.2017.11.003).
- 49 Q. Yu, X. Hu, B. Yang, G. Zhang, J. Wang and W. Ling, Distribution, abundance and risks of microplastics in the environment, *Chemosphere*, 2020, **249**, 126059, DOI: [10.1016/j.chemosphere.2020.126059](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126059).
- 50 F. Amereh, M. Babaei, A. Eslami, S. Fazelpour and M. Rafiee, The emerging risk of exposure to nano(micro)plastics on endocrine disturbance and reproductive toxicity: From a hypothetical scenario to a global public health challenge, *Environ. Pollut.*, 2020, **261**, 114158, DOI: [10.1016/j.envpol.2020.114158](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114158).
- 51 C. Duan, Y. Fang, J. Sun, Z. Li, Q. Wang, J. Bai, H. Peng, J. Liang and Z. Gao, Effects of fast food packaging plasticizers and their metabolites on steroid hormone synthesis in H295R cells, *Sci. Total Environ.*, 2020, **726**, 138500, DOI: [10.1016/j.scitotenv.2020.138500](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138500).
- 52 S. Ullah, S. Ahmad, X. Guo, S. Ullah, S. Ullah, G. Nabi and K. Wanghe, A review of the endocrine disrupting effects of micro and nano plastic and their associated chemicals in mammals, *Front. Endocrinol.*, 2023, **13**, 1084236, DOI: [10.3389/fendo.2022.1084236](https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1084236).
- 53 N. Fuentes and P. Silveyra, Estrogen receptor signaling mechanisms, *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.*, 2019, **116**, 135–170, DOI: [10.1016/bs.apcsb.2019.01.001](https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001).
- 54 M. P. O'Sullivan and A. C. Testa, Fluorescence of aliphatic ketones, *J. Am. Chem. Soc.*, 1970, **92**(20), 5842–5844, DOI: [10.1021/ja00723a005](https://doi.org/10.1021/ja00723a005).
- 55 H. Lee, D.-B. Kwak, S. C. Kim and D. Y. H. Pui, Characterization of colloidal nanoparticles in mixtures with polydisperse and multimodal size distributions using a particle tracking analysis and electrospray-scanning mobility particle sizer, *Powder Technol.*, 2019, **355**, 18–25, DOI: [10.1016/j.powtec.2019.07.029](https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.07.029).

- 56 R. Firdessa, T. A. Oelschlaeger and H. Moll, Identification of multiple cellular uptake pathways of polystyrene nanoparticles and factors affecting the uptake: Relevance for drug delivery systems, *Eur. J. Cell Biol.*, 2014, **93**(8–9), 323–337, DOI: [10.1016/j.ejcb.2014.08.001](https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2014.08.001).
- 57 T. Wang, L. Wang, X. Li, X. Hu, Y. Han, Y. Luo, Z. Wang, Q. Li, A. Aldalbahi, L. Wang, S. Song, C. Fan, Y. Zhao, M. Wang and N. Chen, Size-Dependent Regulation of Intracellular Trafficking of Polystyrene Nanoparticle-Based Drug-Delivery Systems, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2017, **9**(22), 18619–18625, DOI: [10.1021/acsami.7b05383](https://doi.org/10.1021/acsami.7b05383).
- 58 A. Banerjee, L. O. Billey and W. L. Shelver, Uptake and toxicity of polystyrene micro/nanoplastics in gastric cells: Effects of particle size and surface functionalization, *PLoS One*, 2021, **16**(12), 1–25, DOI: [10.1371/journal.pone.0260803](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260803).
- 59 H. J. Johnston, M. Semmler-Behnke, D. M. Brown, W. Kreyling, L. Tran and V. Stone, Evaluating the uptake and intracellular fate of polystyrene nanoparticles by primary and hepatocyte cell lines in vitro, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2010, **242**(1), 66–78, DOI: [10.1016/j.taap.2009.09.015](https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.09.015).
- 60 M. Forte, G. Iachetta, M. Tussellino, R. Carotenuto, M. Prisco, M. De Falco, V. Laforgia and S. Valiante, Polystyrene nanoparticles internalization in human gastric adenocarcinoma cells, *Toxicol. In Vitro*, 2016, **31**, 126–136, DOI: [10.1016/j.tiv.2015.11.006](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.11.006).
- 61 S. J. More, V. Bampidis, D. Benford, C. Bragard, T. I. Halldorsson, A. F. Hernández-Jerez, S. H. Bennekou, K. Koutsoumanis, C. Lambré, K. Machera, E. Mullins, S. S. Nielsen, J. Schlatter, D. Schrenk, D. Turck and M. Younes, Guidance on the use of the benchmark dose approach in risk assessment, *EFSA J.*, 2022, **20**(10), e07584, DOI: [10.2903/j.efsa.2022.7584](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7584).
- 62 A. Hardy, D. Benford, T. Halldorsson, M. J. Jeger, K. H. Knutsen, S. More, A. Mortensen, H. Naegeli, H. Noteborn, C. Ockleford, A. Ricci, G. Rychen, V. Silano, R. Solecki, D. Turck, M. Aerts, L. Bodin, A. Davis, L. Edler, U. Gundert-Remy, S. Sand, W. Slob, B. Bottex, J. Cortiñas Abrahantes, D. Court Marques, G. Kass and J. R. Schlatter, Update: use of the benchmark dose approach in risk assessment, *EFSA J.*, 2017, **15**(1), e04658, DOI: [10.2903/j.efsa.2017.4658](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4658).
- 63 Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), *Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures*, 2005, pp. 1–50.
- 64 M. J. Zeilmaker, S. Fragki, E. M. J. Verbruggen, B. G. H. Bokkers and J. P. A. Lijzen, *Mixture exposure to PFAS: A Relative Potency Factor approach*, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) Report number: 2018-0070, 2018, DOI: [10.21945/RIVM-2018-0070](https://doi.org/10.21945/RIVM-2018-0070).
- 65 National Institute for Public Health and the Environment, *ProastWeb*, <https://proastweb.rivm.nl/>.
- 66 L. Sun, K. Liao and D. Wang, Comparison of transgenerational reproductive toxicity induced by pristine and amino modified nanoplastics in *Caenorhabditis elegans*, *Sci. Total Environ.*, 2021, **768**, 144362, DOI: [10.1016/j.scitotenv.2020.144362](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144362).
- 67 R. C. Marcelino, R. M. Cardoso, E. L. B. C. Domingues, R. V. Gonçalves, G. D. A. Lima and R. D. Novaes, The emerging risk of microplastics and nanoplastics on the microstructure and function of reproductive organs in mammals: A systematic review of preclinical evidence, *Life Sci.*, 2022, **295**, 120404, DOI: [10.1016/j.lfs.2022.120404](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120404).
- 68 X. Lin, Y. Wang, X. Yang, P. Watson, F. Yang and H. Liu, Endocrine disrupting effect and reproductive toxicity of the separate exposure and co-exposure of nano-polystyrene and diethylstilbestrol to zebrafish, *Sci. Total Environ.*, 2023, **865**, 161100, DOI: [10.1016/j.scitotenv.2022.161100](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161100).
- 69 B. Jeong, J. Y. Baek, J. Koo, S. Park, Y.-K. Ryu, K.-S. Kim, S. Zhang, C. Chung, R. Dogan, H. S. Choi, D. Um, T. K. Kim, W. S. Lee, J. Jeong, W. H. Shin, J. R. Lee, N. S. Kim and D. Y. Lee, Maternal exposure to polystyrene nanoplastics causes brain abnormalities in progeny, *J. Hazard. Mater.*, 2022, **426**, 127815, DOI: [10.1016/j.jhazmat.2021.127815](https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127815).
- 70 E.-J. Park, J.-S. Han, E.-J. Park, E. Seong, G.-H. Lee, D.-W. Kim, H. Y. Son, H. Y. Han and B. S. Lee, Repeated-oral dose toxicity of polyethylene microplastics and the possible implications on reproduction and development of the next generation, *Toxicol. Lett.*, 2020, **324**, 75–85, DOI: [10.1016/j.toxlet.2020.01.008](https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.01.008).
- 71 Ž. Roje, K. Ilić, E. Galić, I. Pavičić, P. Turčić, Z. Stanec and I. Vinković Vrček, Synergistic effects of parabens and plastic nanoparticles on proliferation of human breast cancer cells, *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, 2019, **70**(4), 310–314, DOI: [10.2478/aiht-2019-70-3372](https://doi.org/10.2478/aiht-2019-70-3372).
- 72 K. Ilić, L. Krce, J. Rodriguez-Ramos, F. Rico, N. Kalčec, I. Aviani, P. Turčić, I. Pavičić and I. Vinković Vrček, Cytotoxicity of nanomixture: Combined action of silver and plastic nanoparticles on immortalized human lymphocytes, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 2022, **73**, 127004, DOI: [10.1016/j.jtemb.2022.127004](https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2022.127004).
- 73 K. Ilić, N. Kalčec, L. Krce, I. Aviani, P. Turčić, I. Pavičić and I. Vinković Vrček, Toxicity of nanomixtures to human macrophages: Joint action of silver and polystyrene nanoparticles, *Chem.-Biol. Interact.*, 2022, **368**, 110225, DOI: [10.1016/j.cbi.2022.110225](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110225).



# Nanoplastics increase *in vitro* oestrogenic activity of neurotherapeutic drugs

Lucija Božičević<sup>1</sup>, Valerije Vrčec<sup>2</sup>, Nikolina Peranić<sup>1</sup>, Nikolina Kalčec<sup>1</sup>, and Ivana Vinković Vrčec<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb, Croatia

<sup>2</sup> University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry, Zagreb, Croatia

<sup>3</sup> University of Rijeka Faculty of Medicine, Rijeka, Croatia

[Received in January 2024; Similarity Check in January 2024; Accepted in March 2024]

Environmental pollution with plastic nanoparticles (PNPs) has rendered hazard assessment of unintentional human exposure to neurotherapeutic drugs through contaminated water and food ever more complicated. Due to their small size, PNPs can easily enter different cell types and cross different biological barriers, while their high surface-to-volume ratio enables higher adsorption of chemicals. This is how PNPs take the role of a Trojan horse as they enhance bioaccumulation of many different pollutants. One of the health concerns related to water pollution with neurotherapeutic drugs is endocrine disruption, already evidenced for the anticonvulsant drug carbamazepine (Cbz) and antidepressant fluoxetine (Flx). Our study aimed to evaluate endocrine disrupting effects of Cbz and Flx in mixtures with polystyrene nanoparticles (PSNPs) using the *in vitro* luciferase assay to measure oestrogen receptor activity in T47D-KBluc cells treated with Cbz-PSNPs or Flx-PSNPs mixtures and compare it with the activities observed in cells treated with individual mixture components (Cbz, Flx, or PSNPs). Dose ranges used in the study were 0.1–10 mg/L, 1–100 µmol/L, and 0.1–10 µmol/L for PSNPs, Cbz, and Flx, respectively. Our findings show that none of the individual components activate oestrogen receptors, while the mixtures induce oestrogen receptor activity starting with 0.1 mg/L for PSNPs, 10 µmol/L for Cbz, and 0.5 µmol/L for Flx. This is the first study to evidence that PSNPs increase oestrogen receptor activity induced by neurotherapeutic drugs at their environmentally relevant concentrations and calls for urgent inclusion of complex mixtures in health hazard assessments to inform regulatory response.

**KEY WORDS:** polystyrene; carbamazepine; fluoxetine; oestrogen receptors; T47D-KBluc cell line

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) raise great health concerns for the global population. The strategic approach to deal with these substances in the European Union has been outlined in the Communication Towards a Comprehensive EU Framework on Endocrine Disruptors (1). EDCs interfere with the endocrine system and adversely affect the development, reproduction, metabolism, and the nervous and immune system (2) as they mimic body hormones that trigger and bind to cell receptors, blocking their interaction with natural hormones. Some EDCs interact with multiple receptors, and multiple EDCs interact with the same receptor (3). Interactions of EDCs with human organism can lead to several disorders such as obesity, diabetes, infertility, and endocrinopathies, as well as to hormone-dependent cancers (4).

Screening and testing for EDCs was initiated as high-priority in 1998 by the Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), which developed the test No. 455 (5) to evaluate oestrogenic activity and EDC interference with normal oestrogen signalling mediated by oestrogen receptors.

EDCs are highly diverse and include phytoestrogens in food, synthetic endocrine-acting chemicals in regulated birth control, hormone replacement and steroid medicines, non-hormonal

medicines (such as antipsychotics, antiepileptics, antihypertensives, antivirals, antidiabetics, and anticancer drugs), as well as environmental contaminants (such as pesticides, dioxins, perchlorates, phthalates, and polybrominated diphenyl ethers) (6). Our environment is being polluted with pharmaceuticals of all categories and their metabolites throughout their life cycle, most notably the aquatic environment, in which they are detected in low concentrations (measured in pg/L to µg/L) (7, 8). The general population is mostly exposed to them through drinking water, residues in leaf crops, root crops, fishery products, dairy products, and meat.

Health risks posed by pharmaceuticals in different environmental compartments cannot be clearly distinguished from the total risk of combined exposure with other chemicals and materials with potentially stronger impact on human health than exposure to individual components alone, even at concentrations regarded as safe. In this respect, the European Food and Safety Authority (EFSA) and the OECD have already provided guidance on how to assess risk from such mixtures (9–11).

Assessment is additionally challenged by plastic along its value chain. Plastic pollution is now considered one of the greatest

environmental issues due to its abundance and persistence in the aquatic environment (12). Plastics undergo various types of mechanical and biological degradation to micro- and nanoparticles (13), and nanoplastics can adsorb and accumulate toxic chemicals from the environment, acting as a “Trojan horse” for hazardous substances (14).

Our intent with this study was to contribute to human health hazard assessment by investigating for the first time the oestrogenic activity of complex mixtures of nanoplastics and neuroactive drugs. To this end we used selected, well characterised, commercially available polystyrene nanoparticles (PSNPs) combined with either carbamazepine (Cbz) or fluoxetine (Flx).

Cbz is an anticonvulsant for the treatment of epilepsy, bipolar disorder, and, more recently, neuropathic pain such as trigeminal neuralgia (15). It is often found in water bodies in a wide range from ng/L to µg/L and average concentration of 11.6 µg/L globally (16) or 12 µg/L in Europe (17). It is mostly neurotoxic as it lowers neuronal excitability, changes transmembrane transport, and regulates several neurotransmitters, but some studies evidence endocrine disruption, which causes imbalance in sex hormones and reproductive function impairment (15, 18, 19).

Flx is the third most prescribed selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) indicated for depression (20). Its average concentrations can reach 1.4 µg/L in the environment (11) and range between 0.5 and 0.8 ng/L in drinking water (21). In surface waters, it can reach 50 ng/L, as reported in the United Kingdom and some parts of Europe (22). Flx can have behavioural, neurotoxic, and endocrine disruptive effects (20, 23, 24). Several *in vitro* studies also reported disruption of steroid hormone production (25, 26) and interaction with oestrogen receptors (27, 28).

## MATERIALS AND METHODS

All testing was done in accordance with the EDC screening programmes devised by the OECD (5) and the United States Environmental Protection Agency (US EPA) (29) using the human-derived cell line T47D-KBluc.

### Characterisation of nanoparticles

PSNPs were purchased as a commercial stock of 25 nm particles in the concentration of 10,500 mg/L from Phosphorex (Hopkinton, MA, USA). They were visualised and their primary size ( $d$ , nm) determined with a transmission electron microscope (TEM) (JEOL JEM 1010, JEOL, Tokyo, Japan) in samples prepared by suspending them in the cell culture RPMI-1640 medium without phenol red (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) supplemented with 5 % charcoal-stripped foetal bovine serum (CS-FBS) (Sigma Aldrich) to obtain the concentration of 1 mg/L. The suspension was dropped on a Formvar<sup>®</sup>-coated copper grid (SPI Supplies, West Chester, PA, USA), dried overnight at room temperature, and measured in a bright field mode at an acceleration voltage of 80 kV. Images were

taken with a Canon PowerShot S50 Camera (Canon, Tokyo, Japan). Results are presented as mean values ( $d$ , in nm) of 60 particles with standard deviations (SD) calculated with the ImageJ software (LOCI, University of Wisconsin, Madison, WI, USA). Hydrodynamic diameter ( $d_{H}$ ) and size distribution were determined for PSNPs suspended in cell culture for 24 h and those not suspended in cell culture with dynamic light scattering and zeta potential using a Zetasizer Ultra instrument (Malvern Panalytical, Malvern, UK). Data were processed with the ZS Xplorer 3.21 software (Malvern Panalytical). The  $d_{H}$  results represent the means of six measurements expressed as intensity-weighted size distribution (in nm), while the zeta potential represents the means of three ELS measurements expressed in mV.

### Cell culturing

The T47D-KBluc cell line was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). These are reporter-labelled cells transfected with triplet oestrogen-responsive elements used to screen for oestrogenic or anti-oestrogenic activity of chemicals (30). T47D-KBluc cells were cultured in tissue culture flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) with the RPMI-1640 medium supplemented with 10 % (v/v) CS-FBS and 1 % (v/v) antibiotic-antimycotic solution (Sigma Aldrich) at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub> to reach the density of 1×10<sup>6</sup> cells/mL (90–95 % confluence) before treatment.

### Cytotoxicity evaluation

Before we determined oestrogen receptor activity, we established dose-response cytotoxicity for PSNPs, Cbz, and Flx alone and for their mixtures. For that purpose, T47D-KBluc cells were seeded in 12-well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) containing 1 mL of cell culture medium at a density of 1×10<sup>5</sup> cells/well at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>. After 24 h, we replaced the medium and treated the cells with different concentrations of test substances or their mixtures.

Dose ranges were selected based on literature data on *in vitro* toxicity of PSNPs, Cbz, and Flx (31–33) as follows: 0.1–10 mg/L for PSNPs, 3.75–500 µmol/L for Cbz, and 0.75–100 µmol/L for Flx. Their cytotoxicity was first tested with the MTS assay as described elsewhere (34) with the aim to find the doses at which >90 % cells remained viable. Negative controls were untreated cells and positive controls were cells treated with 10 % (v/v) DMSO (Sigma Aldrich).

After 48 h of treatment at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>, the medium was removed from the plates into 2 mL Eppendorf tubes (Eppendorf, Hamburg, Germany). Cells remaining in the wells were washed with phosphate buffered saline (PBS) three times and then detached by incubating them with Trypsin-EDTA solution (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany) at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub> for 5–7 min. The detached cells were then added to the Eppendorf tubes with previously collected medium.



Due to possible interferences with the MTS assay, cytotoxicity testing was then repeated using flow cytometry for PSNP doses of 0.1, 1, and 10 mg/L, for Cbz doses of 50 and 100  $\mu\text{mol/L}$ , and for Flx doses of 5 and 10  $\mu\text{mol/L}$ . Tube content (with viable and dead cells) was stained with Annexin V-FITC (AnnV) and propidium iodide (PI) using the flow cytometry Annexin V Kit (Bio Rad, Hercules, California, USA) to count live (AnnV-, PI-), early apoptotic (AnnV+, PI-), apoptotic (AnnV+, PI+), and dead cells (AnnV-, PI+) on a Cytoflex SRT sorter using its software (Beckman Coulter Life Sciences, Indianapolis, IN, USA).

Results are reported as the percentage of live, early apoptotic, late apoptotic, or dead cells compared to negative controls obtained from three independent experiments done in triplicate.

For further experiments we used only Cbz, Flx, and PNSP doses that left more than 90 % of cells viable to avoid bias that may arise from dead, unviable, or damaged cells.

### Measurement of oestrogen receptor activity

Oestrogen receptor activity in T47D-KBluc cells was determined for the test substances or their mixtures using the luciferase assay (Promega, Madison, WI, USA, Cat. Nos.: E1500 and E1501). The assay is based on the binding to oestrogen-responsive elements by oestrogen receptors that make part of the T47D-KBluc cell DNA sequence. Binding to these elements induces gene transcription that produces luciferase, which converts beetle luciferin (assay reagent) to a luminescent product oxyluciferin. The intensity of its luminescence is proportional to oestrogen receptor activation.

Our measurements followed the OECD test No. 455 (5). The responsiveness of the test system was checked using diethylstilbestrol (DES) as positive control and fulvestrant as negative control. The quality control of the assay confirmed  $\geq$ four-fold mean luciferase activity compared to negative/vehicle control on each plate and no interference by the test substances (PSNPs and neurodrugs) with the assay components and readouts.

The assay was run on T47D-KBluc cells that were first cultured for a week in a medium in which 10 % FBS was replaced by 10 % charcoal-stripped FBS to attenuate interferences from serum hormones. After one week, the cells were seeded in white opaque flat-bottom Nunc™ MicroWell™ 96-well microplates (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at a density of  $2 \times 10^4$  cells per well, each containing 100  $\mu\text{L}$  of culture medium containing 5 % (v/v) charcoal-stripped FBS and kept there at 37 °C and 5 %  $\text{CO}_2$  for 24 h to attach to the wells. Followed a 48-hour treatment with different concentrations of PSNPs, Cbz, and Flx alone or their mixtures. Untreated cells were used as negative control and cells treated with 10 nmol/L DES as positive control. After the treatment, oestrogen receptor activity was measured on a SpectraMax iD3 microplate reader (Molecular Devices, San Jose, CA, USA) using the Promega luciferase assay kit as described above.

Results are expressed either as the percentage of fold luminescent signal inductions compared to negative or positive controls.

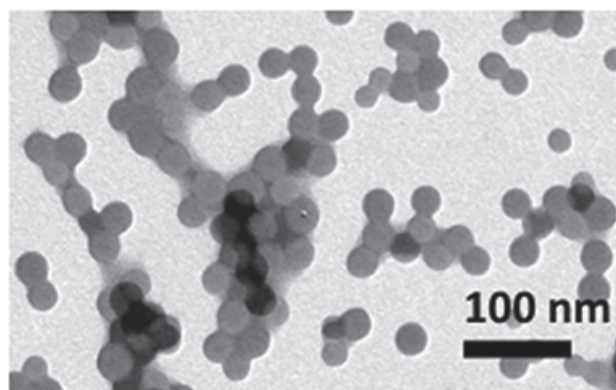
### Statistical analysis

Statistical analysis was run on GraphPad Prism6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test with negative control values and set to  $P < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

### Physico-chemical characteristics and stability of PSNPs

Figure 1 shows the shape, size, size distribution, and zeta potential of the PSNPs used in this study. They were of spherical shape and primary diameter ( $d_{\text{TEM}}$ ) of  $25.6 \pm 3.2$  nm, confirming the producer's declaration (Phosphorex). Their hydrodynamic diameter ( $d_{\text{H}}$ ) was greater than  $d_{\text{TEM}}$  due to hydration and protein corona shell formation on the nanosurface, while further increase in  $d_{\text{H}}$  after 48 h indicates slight aggregation due to increased ionic strength of the cell culture medium (RPMI-1640). The zeta potential was negative and also increased after 48 h.



$d_{\text{TEM}} = 25.6 \pm 3.2$  nm

Measurement conditions (medium, incubation time)		
UPW, t = 0 h	CCM, t = 0 h	CCM, t = 48 h
$d_{\text{H}} = 26.7 \pm 2.9$ nm	$d_{\text{H}} = 51.8 \pm 6.1$ nm	$d_{\text{H}} = 91.4 \pm 8.9$ nm
$\zeta = -31.3 \pm 5.1$ mV	$\zeta = -9.1 \pm 2.2$ mV	$\zeta = -12.4 \pm 3.6$ mV

**Figure 1** Transmission electron micrograph (TEM) and physico-chemical properties of 10 mg/L polystyrene nanoparticles (PSNPs) in ultrapure water (UPW) and the RPMI-1640 cell culture medium (CCM) at baseline ( $t=0$  h) and after 48 h ( $t=48$  h) at 25 °C.  $d_{\text{TEM}}$  – PSNP dispersion in ultrapure water,  $d_{\text{H}}$  – PSNP hydrodynamic diameter in UPW and CCM;  $\zeta$  – PSNP zeta potential in in UPW and CCM

### Cytotoxicity of PSNPs, Cbz, Flx, and their mixtures

The MTS assay showed that doses below 60 µmol/L for Cbz and below 12.5 µmol/L for Flx did not affect the viability of T47D-KBluc cells (Figure 2), while the IC<sub>50</sub> values were 174.8 and 30.17 µmol/L, respectively.

Further flow cytometry showed that none of tested substances at given doses (0.1, 1, 5, and 10 mg/L for PSNPs; 1, 5, 10, 50, and 100 µmol/L for Cbz; and 0.1, 0.5, 1, 5, and 10 µmol/L for Flx) induced significant damage to the T47D-KBluc cells (Figure 3), so we proceeded with these doses in further luciferase assay experiments.

### Oestrogen receptor activity in cells exposed to PSNPs, Cbz, Flx, and their mixtures

Endocrine disrupting effects of Cbz and Flx in mixtures with PSNPs were determined by comparing cell oestrogen receptor

activity in respective mixtures (Cbz-PSNPs and Flx-PSNPs) with that of individual components (Cbz, Flx, or PSNPs). As described in the OECD test No. 455, a substance can be considered endocrine disruptor if oestrogen receptor response is equal to or exceeds 10 % of the response obtained with 10 nmol/L of DES. In view of these guidelines, the tested substances alone did not induce oestrogen receptor activity (Figure 4).

However, Cbz-PSNP and Flx-PSNP mixtures show quite alarming results in terms of health hazard and evidence that nanoplastics do behave like a Trojan horse in T47D-KBluc cells regardless of their concentration (Figure 5). Cbz and Flx mixed with PSNPs evoked strong endocrine disrupting response (≥10 % of oestrogen response to 10 nmol/L DES) starting with the doses of 50 and 1 µmol/L, respectively.

Interestingly, oestrogen receptor response did not depend on PSNP concentrations. This may be owed to greater PSNP aggregation in the cell culture medium when particle concentrations are higher, which may decrease specific surface area available for interaction with cells and drug absorption. Furthermore, the observed response did not show dose dependence for the two higher drug doses (50 and 100 µmol/L of Cbz, 5 and 10 µmol/L of Flx), most likely because of nanosurface saturation.

### CONCLUSION

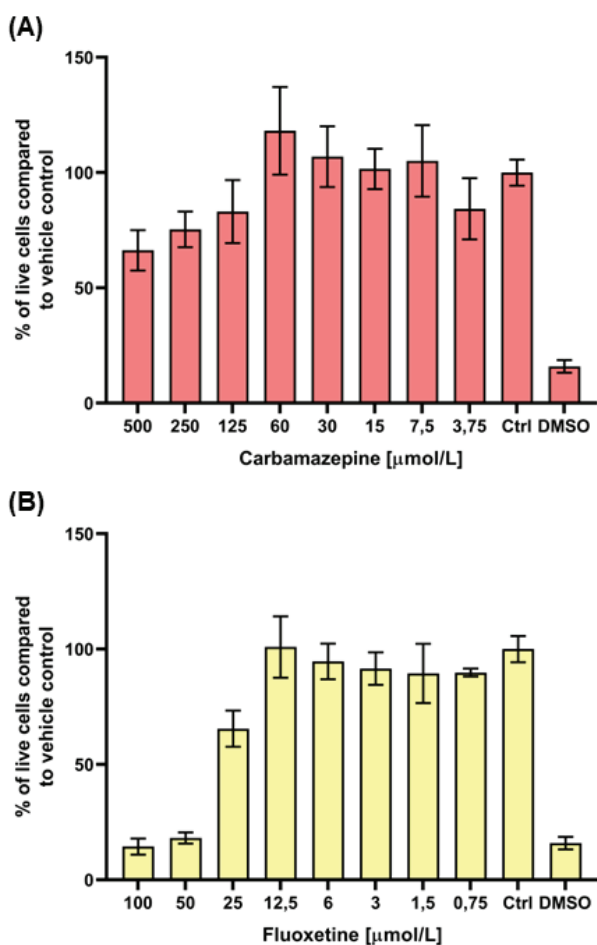
This *in vitro* study presents the first evidence of endocrine disrupting activity of complex mixtures containing polystyrene nanoparticles and neuroactive drugs. Our findings have confirmed our initial hypothesis that substances combined with nanoparticles will induce endocrine disruptive response at doses which do not provoke such response when applied alone. This calls for the revision of current health hazard assessment practices for environmental pollutants to include mixtures of plastic nanoparticles and pharmaceuticals in toxicity evaluation, considering that oestrogen receptor activation can lead to the development of various cancers mediated by various key events, such as increased proliferation and migration of cells, oxidative stress, non-genomic signalling and inflammatory response as evidenced by the AOP-Wiki, an open web platform launched by the OECD to support hazard assessment (35–37).

### Conflicts of interest

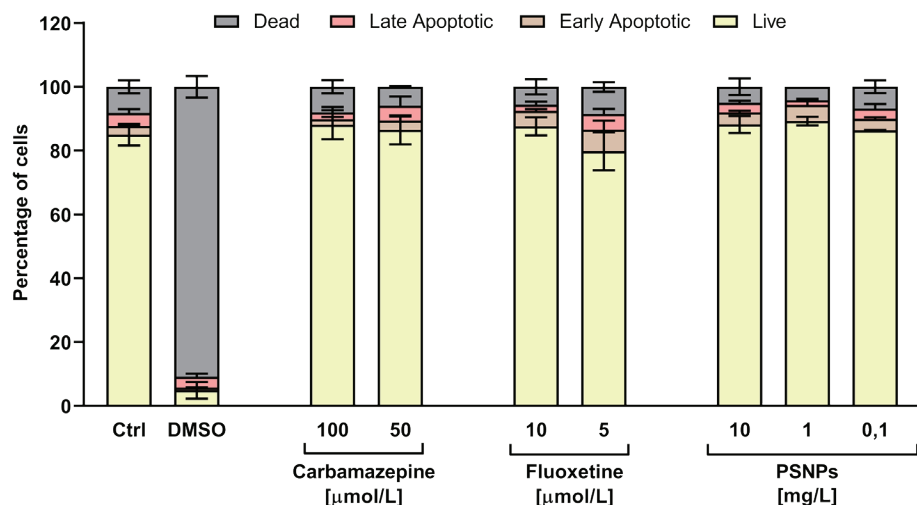
None to declare.

### Acknowledgements

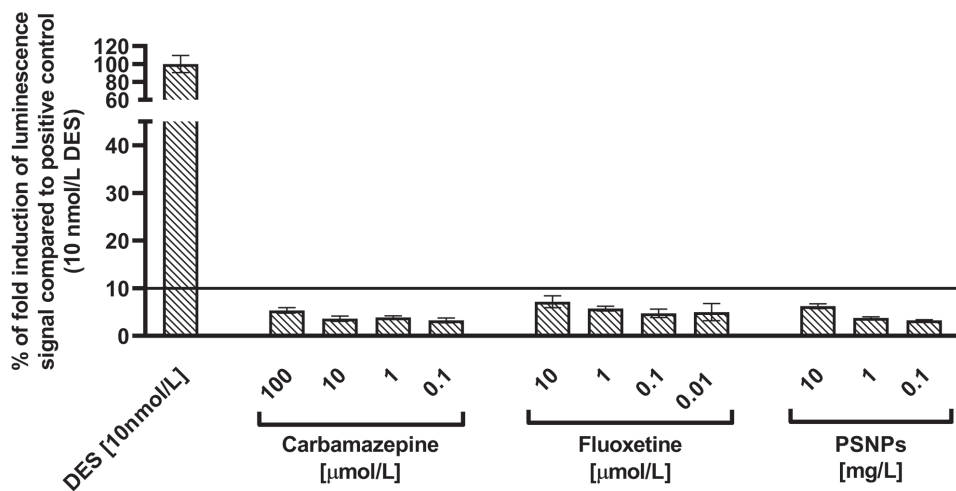
This study was performed using the facilities and equipment funded as part of the European Regional Development Fund project KK.01.1.1.02.0007 “Research and Education Centre of Environmental Health and Radiation Protection – Reconstruction and Expansion of the Institute for Medical Research and Occupational Health”.



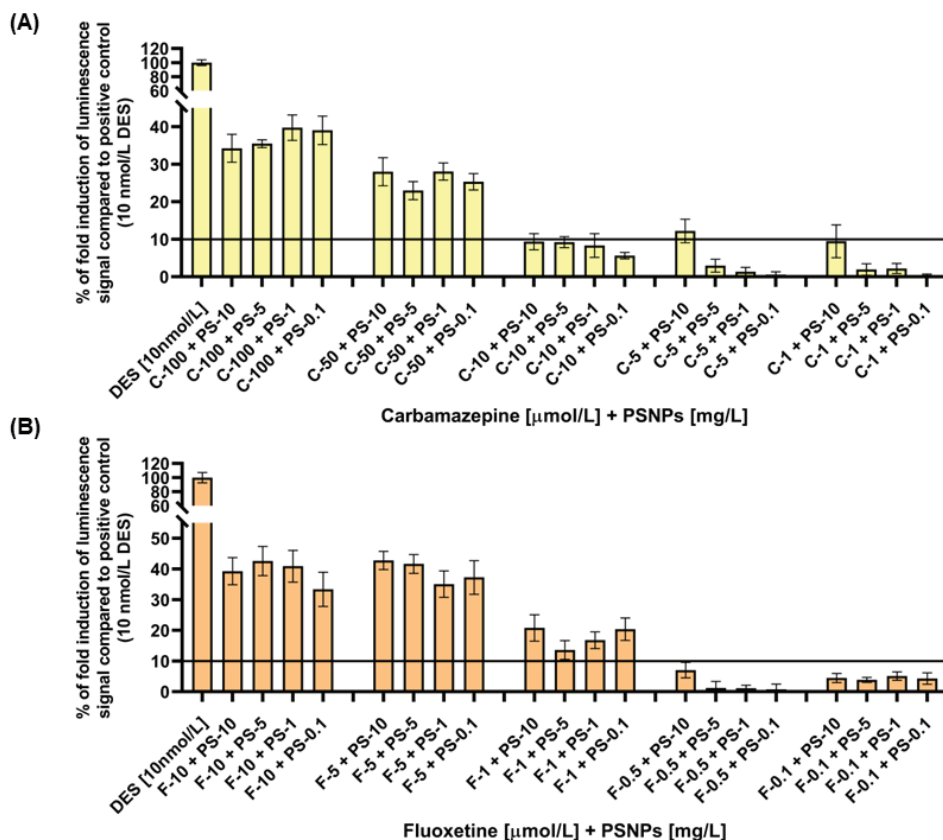
**Figure 2** Viability of T47D-KBluc cells treated with A) carbamazepine (Cbz) and B) fluoxetine (Flx) established with the MTS assay. Untreated cells were used as negative control (Ctrl) and cells treated with 10 % (v/v) DMSO as positive control (DMSO). Results are given as the percentage of Ctrl and calculated as mean values from three independent experiments. Standard deviations are given as error bars, and values that are significantly different from Ctrl are marked with \* (P<0.05)



**Figure 3** Viability and apoptosis in T47D-KBluc cells treated with PSNPs, Cbz and Flx established with flow cytometry. Untreated cells were used as negative control (Ctrl) and cells treated with 10 % (v/v) DMSO as positive control (DMSO). Results are given as the percentage of live, early apoptotic, late apoptotic, and dead cells compared to Ctrl and calculated as mean values from three independent experiments. Standard deviations are given as error bars



**Figure 4** Oestrogen receptor activity in response to carbamazepine (Cbz), fluoxetine (Flx), and polystyrene nanoparticle (PSNP) treatment of T47D-KBluc cells. Results are shown as the percentage of fold induction of luminescent signal in comparison with positive control (10 nmol/L diethylstilbestrol, DES) and represent mean values from three independent experiments done in triplicate. Standard deviations (SD) are given as error bars. Values above the black line denote endocrine disrupting response according to the OECD test No. 455 (5)



**Figure 5** Oestrogen receptor activity in response to PSNP mixtures with (A) carbamazepine (Cbz) and (B) fluoxetine (Flx) in T47D-KBluc cells. Results are shown as the percentage of fold induction of luminescent signal in comparison with positive control (10 nmol/L diethylstilbestrol, DES) and represent mean values from three independent experiments done in triplicate. Standard deviations (SD) are given as error bars. Values above the black line denote endocrine disrupting response according to the OECD test No. 455 (5)

## REFERENCES

1. EUR-Lex. Communication from the Commission to the European Parliament, the Council, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions - Towards a comprehensive European international investment policy /\* COM/2010/0343 final \*/ [displayed 5 March 2024]. Available at <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=celex%3A52010DC0343>
2. Cho YJ, Yun JH, Kim SJ, Kwon HY. Nonpersistent endocrine disrupting chemicals and reproductive health of women. *Obstet Gynecol Sci* 2020;63:1–12. doi: 10.5468/ogs.2020.63.1.1
3. United Nations Environment Programme (UNEP), World Health Organization (WHO). State of the science of endocrine disrupting chemicals – 2012. Geneva: UNEP/WHO, 2012 [displayed 6 March 2024]. Available at: [https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/78101/9789241505031\\_eng.pdf?sequence=1](https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/78101/9789241505031_eng.pdf?sequence=1)
4. Rutkowska AZ, Diamanti-Kandaraki E. Polycystic ovary syndrome and environmental toxins. *Fertil Steril* 2016;106:948–58. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.08.031
5. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Test No. 455: Performance-Based Test Guideline for Stably Transfected Transactivation *In Vitro* Assays to Detect Estrogen Receptor Agonists and Antagonists, 2021 [displayed 5 March 2024]. Available at <https://doi.org/10.1787/9789264265295-en>
6. Sabir S, Akhtar MF, Saleem A. Endocrine disruption as an adverse effect of non-endocrine targeting pharmaceuticals. *Environ Sci Pollut Res Int* 2019;26:1277–86. doi: 10.1007/s11356-018-3774-4
7. Batucan NSP, Tremblay LA, Northcott GL, Matthaei CD. Medicating the environment? A critical review on the risks of carbamazepine, diclofenac and ibuprofen to aquatic organisms. *Environ Adv* 2022;7:100164–78. doi: 10.1016/j.envadv.2021.100164
8. Küster A, Adler N. Pharmaceuticals in the environment: scientific evidence of risks and its regulation. *Philos Trans R Soc Lond B Bio Sci* 2014;369(1656):20130587–95. doi: 10.1098/rstb.2013.0587
9. Batke M, Damm G, Foth H, Freyberger A, Gebel T, Gundert-Remy U, Hengstler J, Mangerich A, Partosch F, Röhl C, Schupp T, Wollin KM. The EU chemicals strategy for sustainability: critical reflections on proposed regulatory changes for endocrine disruptors and mixture toxicity. *Arch Toxicol* 2022;96:1133–5. doi: 10.1007/s00204-022-03227-z
10. McEntaggart K, Chirico S, Etienne J, Rigoni M, Papoutsis S, Leather J. EFSA EU Insights Chemical mixtures awareness, understanding and risk perceptions. *EFSA Support Publ* 2019;EN-1602. doi: 10.2903/sp.efsa.2019.EN-1602
11. OECD. Considerations for Assessment of Risk from the Combined Exposure to Multiple Chemicals. Series on Testing and Assessment No. 296, 2018 [displayed 5 March 2024]. Available at <https://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/considerations-for-assessing-the-risks-of-combined-exposure-to-multiple-chemicals.pdf>



12. Sharma S, Chatterjee S. Microplastic pollution, a threat to marine ecosystem and human health: a short review. *Environ Sci Pollut Res Int* 2017;24:21530–47. doi: 10.1007/s11356-017-9910-8
13. Lehner R, Weder C, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B. Emergence of nanoplastic in the environment and possible impact on human health. *Environ Sci Technol* 2019;53:1748–65. doi: 10.1021/acs.est.8b05512
14. Katsumiti A, Losada-Carrillo MP, Barros M, Cajaraville MP. Polystyrene nanoplastics and microplastics can act as Trojan horse carriers of benzo(a)pyrene to mussel hemocytes *in vitro*. *Sci Rep* 2021;11(1):22396. doi: 10.1038/s41598-021-01938-4
15. Mezzelani M, Peruzza L, D'Errico G, Milan M, Gorbi S, Regoli F. Mixtures of environmental pharmaceuticals in marine organisms: Mechanistic evidence of carbamazepine and valsartan effects on *Mytilus galloprovincialis*. *Sci Total Environ* 2023;860:160465. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.160465
16. Batucan NSP, Tremblay LA, Northcott GL, Matthaei CD. Medicating the environment? A critical review on the risks of carbamazepine, diclofenac and ibuprofen to aquatic organisms. *Environ Adv* 2022;7:100164. doi: 10.1016/j.envadv.2021.100164
17. Ács A, Liang X, Bock I, Griffiths J, Ivánovics B, Vásárhelyi E, Ferincz Á, Pirger Z, Urbányi B, Csenki Z. Chronic effects of carbamazepine, progesterone and their mixtures at environmentally relevant concentrations on biochemical markers of zebrafish (*Danio rerio*). *Antioxidants* 2022;11(9):1776. doi: 10.3390/antiox11091776
18. Almeida Á, Soares AMVM, Esteves VI, Freitas R. Occurrence of the antiepileptic carbamazepine in water and bivalves from marine environments: A review. *Environ Toxicol Pharmacol* 2021;86:103661. doi: 10.1016/j.etap.2021.103661
19. Mezzelani M, Nardi A, Bernardini I, Milan M, Peruzza L, d'Errico G, Fattorini D, Gorbi S, Patarnello T, Regoli F. Environmental pharmaceuticals and climate change: The case study of carbamazepine in *M. galloprovincialis* under ocean acidification scenario. *Environ Int* 2021;146:106269. doi: 10.1016/j.envint.2020.106269
20. Correia D, Domingues I, Faria M, Oliveira M. Effects of fluoxetine on fish: What do we know and where should we focus our efforts in the future? *Sci Total Environ* 2023;857:159486. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.159486
21. Nentwig G. Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part II: the antidepressant drug fluoxetine. *Arch Environ Contam Toxicol* 2007;52:163–70. doi: 10.1007/s00244-005-7190-7
22. Oakes KD, Coors A, Escher BI, Fenner K, Garric J, Gust M, Knacker T, Küster A, Kussatz C, Metcalfe CD, Monteiro S, Moon TW, Mennigen JA, Parrott J, Péry AR, Ramil M, Roennefahrt I, Tarazona JV, Sánchez-Argüello P, Ternes TA, Trudeau VL, Boucard T, Van Der Kraak GJ, Servos MR. Environmental risk assessment for the serotonin re-uptake inhibitor fluoxetine: Case study using the European risk assessment framework. *Integr Environ Assess Manag* 2010;6(Suppl):524–39. doi: 10.1002/ieam.77
23. Yamindago A, Lee N, Lee N, Jo Y, Woo S, Yum S. Fluoxetine in the environment may interfere with the neurotransmission or endocrine systems of aquatic animals. *Ecotoxicol Environ Saf* 2021;227:112931. doi: 10.1016/j.ecoenv.2021.112931
24. Correia D, Bellot M, Prats E, Gómez-Canela C, Moro H, Raldúa D, Domingues I, Oliveira M, Faria M. Impact of environmentally relevant concentrations of fluoxetine on zebrafish larvae: from gene to behavior. *Chemosphere* 2023;345:140468. doi: 10.1016/j.chemosphere.2023.140468
25. Lupu D, Sjödin MOD, Varshney M, Lindberg J, Loghin F, Rüegg J. Fluoxetine modulates sex steroid levels *in vitro*. *Clujul Med* 2017;90:420–4. doi: 10.15386/cjmed-868
26. Jacobsen NW, Hansen CH, Nellemann C, Styrisshave B, Halling-Sørensen B. Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on three sex steroids in two versions of the aromatase enzyme inhibition assay and in the H295R cell assay. *Toxicol in Vitro* 2015;29:1729–35. doi: 10.1016/j.tiv.2015.07.005
27. Pop A, Lupu DI, Cherfan J, Kiss B, Loghin F. Estrogenic/antiestrogenic activity of selected selective serotonin reuptake inhibitors. *Clujul Med* 2015;88:381–5. doi: 10.15386/cjmed-474
28. Müller JC, Imazaki PH, Boaretto AC, Lourenço EL, Golin M, Vechi MF, Lombardi NF, Minatovicz BC, Scippo ML, Martino-Andrade AJ, Dalsenter PR. *In vivo* and *in vitro* estrogenic activity of the antidepressant fluoxetine. *Reprod Toxicol* 2012;34:80–5. doi: 10.1016/j.reprotox.2012.04.001
29. USEPA. Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines - OPPTS 890.1300: Estrogen Receptor Transcriptional Activation (Human Cell Line (HeLa-9903)) [EPA 740-C-09-006] [displayed 5 March 2024]. Available at <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2009-0576-0006>
30. Wilson VS, Bobseine K, Gray LE Jr. Development and characterization of a cell line that stably expresses an estrogen-responsive luciferase reporter for the detection of estrogen receptor agonist and antagonists. *Toxicol Sci* 2004;81:69–77. doi: 10.1093/toxsci/kfh180
31. Shen M, Zhang Y, Zhu Y, Song B, Zeng G, Hu D, Wen X, Ren X. Recent advances in toxicological research of nanoplastics in the environment: A review. *Environ Pollut* 2019;252:511–21. doi: 10.1016/j.envpol.2019.05.102
32. Ali I, Cheng Q, Ding T, Yiguang Q, Yuechao Z, Sun H, Peng C, Naz I, Li J, Liu J. Micro- and nanoplastics in the environment: Occurrence, detection, characterization and toxicity – A critical review. *J Clean Prod* 2021;313:127863. doi: 10.1016/j.jclepro.2021.127863
33. Xu JL, Lin X, Wang JJ, Gowen AA. A review of potential human health impacts of micro- and nanoplastics exposure. *Sci Total Environ* 2022;851:158111. doi: 10.1016/j.scitotenv.2022.158111
34. Malich G, Markovic B, Winder C. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the *in vitro* cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology* 1997;124(3):179–92. doi: 10.1016/S0300-483X(97)00151-0
35. Sakuratani Y, Horie M, Leinala E. Integrated approaches to testing and assessment: OECD activities on the development and use of adverse outcome pathways and case studies. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2018;123(Suppl 5):20–8. doi: 10.1111/bcpt.12955
36. Delrue N, Sachana M, Sakuratani Y, Gourmelon A, Leinala E, Diderich R. The adverse outcome pathway concept: A basis for developing regulatory decision-making tools. *Altern Lab Anim* 2016;44:417–29. doi: 10.1177/026119291604400504
37. Vinken M. The adverse outcome pathway concept: A pragmatic tool in toxicology. *Toxicology* 2013;312:158–65. doi: 10.1016/j.tox.2013.08.011

### Nanoplastika pojačava agonistički učinak neuroterapeutika u uvjetima *in vitro*

Onečišćenje okoliša nanočesticama plastike (PNP) dodatno je otežalo procjenu opasnosti od nenamjernog izlaganja ljudi neuroterapijskim lijekovima putem kontaminirane vode i hrane. Zbog svoje male veličine, PNP-i mogu lako ući u različite tipove stanica i prijeći različite biološke barijere, a njihov omjer površine i volumena omogućuje adsorpciju veće količine tvari na njihovu površinu. Upravo na taj način PNP-i preuzimaju ulogu trojanskoga konja te pospješuje bioakumulaciju mnogih zagađivača u ljudskom i drugim organizmima. Među štetnim učincima povezanim sa zagađenjem vode neuroterapijskim lijekovima jesu i poremećaji rada endokrinoga sustava. Takvi su učinci već dokazani za antikonvulzivni lijek karbamazepin (Cbz) i za antidepresiv fluoksetin (Flx). Našem je istraživanju cilj bio procijeniti endokrino disruptivne učinke Cbz i Flx u složenim smjesama s nanočesticama polistirena (PSNP) korištenjem luciferaznog eseja za ispitivanje aktivacije estrogenskih receptora u T47D-KBluc stanicama tretiranim smjesama Cbz-PSNP ili Flx-PSNP i usporediti ih s učincima koji su uočeni u stanicama tretiranim pojedinačnim komponentama smjese (Cbz, Flx ili PSNP). U istraživanju su korišteni ovi rasponi doza: 0,1 – 10 mg/L, 1 – 100  $\mu\text{mol/L}$  i 0,1 – 10  $\mu\text{mol/L}$  za PSNP, Cbz i Flx. Rezultati su pokazali kako niti jedna od pojedinačnih komponenti ne aktivira ER, a smjese induciraju aktivnost estrogenskih receptora, počevši od 0,1 mg/L za PSNP, 10  $\mu\text{mol/L}$  za Cbz i 0,5  $\mu\text{mol/L}$  za Flx. Ovo je prva studija koja dokazuje da PSNP-i povećavaju aktivnost estrogenskih receptora izazvanu neuroterapijskim lijekovima u njihovim ekološki relevantnim koncentracijama i poziva na hitno uključivanje procjene opasnosti od izloženosti složenim smjesama u procjene rizika za ljudsko zdravlje.

KLJUČNE RIJEČI: estrogenski receptori; fluoksetin; karbamazepin; polistiren; stanična linija T47D-KBluc