

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS**

EMILIJĄ STRIOGAITĖ

**Polisitireno nanodalelių citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimai žmogaus hepatomos
ląstelių linijoje (HepG2) *in vitro***

Magistro baigiamasis darbas

Genetikos studijų programa

Darbo vadovas

Milda Babonaitė

Vilnius 2024

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	4
SANTRAUKA	5
SUMMARY	6
ĮVADAS	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA	8
1.1 Plastiką ir jo tipai	8
1.2 Plastiką šaltiniai	9
1.2.1 Pirminiai plastiką šaltiniai	10
1.2.2 Antriniai plastiką šaltiniai	11
1.3 Polistireno nanodalelės	11
1.3.1 Mikro- ir nanoplastiką patekimo į žmogaus organizmą mechanizmai	13
1.3.2 Nanoplastiką nanodalelių patekimo į ląstelę mechanizmai	14
1.3.3 Plastiką nanodalelių toksiškas poveikis ląstelių organelėms	16
1.4 Nanodalelių genotoksiškumas	17
1.4.1 Nanodalelių genotoksiškumo mechanizmai	17
1.4.2 Nanodalelių genotoksiškumo įvertinimas	18
1.4.3 Nanodalelių genotoksiškumo kometos tyrimų apžvalga	20
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	23
2.1 Tiriamoji medžiaga	23
2.2 Reagentai ir tirpalai	23
2.3 Ląstelių kultivavimas	25
2.4 Ląstelių veikimas tiriamąja medžiaga	26
2.5 Ląstelių gyvybingumo įvertinimas	26
2.6 Nanodalelių patekimo į ląstelę analizė	27
2.7 Sukeliamų reaktyvių deguonies formų lygio įvertinimas	28
2.8 Šarminis kometų metodas	28
2.9 Fermentinė reakcija papildytas kometos metodas	29
2.10 Statistinė duomenų analizė	29
3. REZULTATAI	31
3.1 Polistireno (PS) nanodalelių charakterizavimas	31
3.2 Polistireno (PS) nanodalelių patekimo į ląstelę ir ROS lygio matavimai	32
3.3 Polistireno (PS) nanodalelių citotoksiškumo tyrimo rezultatai	33
3.4 Polistireno (PS) nanodalelių genotoksiškumo įvertinimas šarminiu kometos metodu	36
3.5 Polistireno (PS) nanodalelių genotoksiškumo įvertinimas fermentinė reakcija papildytu kometos metodu	36

4. REZULTATŲ APTARIMAS	40
IŠVADOS	44
ASMENINIO INDĒLIO APRAŠYMAS	45
PADĒKA	46
LITERATŪROS ŠALTINIAI	47
PRIEDAI	57

SANTRUMPU SĄRAŠAS

BPA – bisfenolis A;

EndoIII (angl. *endonuclease III*) – endonukleazė III;

Fpg (angl. *formamidopyrimidine DNA glycosylase*) – formamido pirimidino DNR glikozilazė;

HDPE (angl. *high density polyethylene*) – didelio tankio polietilenas;

LDPE (angl. *low density polyethylene*) – mažo tankio polietilenas;

ND – nanodalelės;

OECD (angl. *Organisation for Economic Co-operation and Development*) – ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacija;

PET – polietileno tereftalatas;

PP – polipropilenas;

PS – polistirenas;

PVC – polivinilchloridas;

ROS (angl. *reactive oxygen species*) – reaktyvios deguonies formos;

TEM (angl. *transmission electron microscopy*) – transmisinė elektroninė mikroskopija.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Emilija Striogaitė

Polistireno nanodalelių citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimai žmogaus hepatomos ląstelių linijoje (HepG2) *in vitro*

Magistro baigiamasis darbas

SANTRAUKA

Polistireno nanodalelės (PS-ND) yra vienos iš labiausiai aplinkoje paplitusių plastiko nanodalelių. *In vitro* ir *in vivo* tyrimai parodė, kad polistireno nanodalelės gali patekti į žmogaus organizmą keliais būdais – per odą, kvėpavimo takus ir virškinamąjį traktą. Tai kelia susirūpinimą dėl jų galimo neigiamo poveikio žmogui.

Šiame darbe buvo tirtas 70 nm dydžio PS nanodalelių citotoksiškumas ir genotoksiškumas žmogaus hepatomos ląstelių linijoje HepG2 *in vitro*. Tyrimo metu buvo įvertintas PS nanodalelių patekimas į HepG2 ląsteles ir gebėjimas sukelti reaktyvias deguonies formas. Ląstelių gyvybingumui įvertinti buvo atliekami AlamarBlue ir tripano mėlio testai. Pirminėms DNR pažeidimams įvertinti naudotas šarminis kometos metodas, o oksidacinėms DNR pažeidimams – fermentinėmis reakcijomis (Fpg ir EndoIII) papildytas kometos metodas.

AlamarBlue testu nenustatytas santykinio fluorescencinio intensyvumo signalo sumažėjimas daugiau nei 20 %. Tuo tarpu tripano mėlio testu nustatyta, kad nors ir po 24 valandų poveikio su skirtingomis PS nanodalelių koncentracijomis, 10, 60, 80 ir 100 µg/ml koncentracijos statistiškai reikšmingai sumažino HepG2 ląstelių gyvybingumą, nei viena tirta koncentracija nesukėlė citotoksinio poveikio.

Šarminiu ir fermentinėmis reakcijomis papildytu kometos metodais nustatyta, kad visos tirtos PS-ND koncentracijos (5–100 µg/ml) statistiškai reikšmingai padidino pirminių ir oksidacinių DNR pažeidimų kiekį HepG2 ląstelėse, kur didžiausią pažeidimų dalį sudarė oksiduoti purinai.

VILNIUS UNIVERSITY
LIFE SCIENCES CENTER

Emilija Striogaitė

Analysis of *in vitro* Cytotoxicity and Genotoxicity of Polystyrene Nanoparticles in Human Hepatoma Cell Line HepG2

Master thesis

SUMMARY

Polystyrene nanoparticles (PS-NPs) are one of the most represented NPs in the environment. *In vivo* and *in vitro* studies have suggested that PS-NPs may penetrate organisms through several routes i.e. skin, respiratory and digestive tracts. One of the main concerns of PS-NPs exposure is their genotoxic potential.

In this study, we investigated the cytotoxicity and genotoxicity of 70 nm size PS nanoparticles in the human hepatoma cell line HepG2 *in vitro*. First of all, the PS nanoparticles uptake by HepG2 cells and their ability to generate reactive oxygen species was evaluated. AlamarBlue and trypan blue exclusion assays were performed to assess cell viability. To evaluate primary DNA damage induced by PS nanoparticles, the alkaline comet assay was employed, while oxidative DNA damage was assessed using enzyme-modified (Fpg and EndoIII) comet assay.

The AlamarBlue test did not show a decrease in relative fluorescence intensity signal of more than 20 %. Meanwhile, the trypan blue assay indicated that after 24 hours of incubation with various concentrations of PS nanoparticles, the viability of HepG2 cells decreased significantly at concentrations of 10, 60, 80, and 100 µg/ml. However, none of the tested concentrations were considered cytotoxic.

The alkaline and enzyme-modified comet assays revealed that all concentrations of PS-NPs tested (5–100 µg/ml) were significantly associated with increased primary and oxidative DNA damage in HepG2 cells, where the highest proportion of damage was attributed to oxidized purines.

IVADAS

Dėl plastiko panaudojimo ir augančio išmetamų jo atliekų kiekio, susiduriame su viena iš ekologinių problemų – plastiko tarša. Plastiką, veikiamą įvairių aplinkos veiksnių, gali būti fragmentuojamas iki mikro dydžio dalelių, o vėliau iki dar mažesnių – nano dydžio plastiko dalelių (Lai et al., 2022). Nanoplastikas gali patekti į žmogaus organizmą per odą, virškinamąjį traktą arba kvėpavimo takus, prasiskverbti į ląsteles ir sutrikdyti jų normalią veiklą (Kiek et al., 2020). Taigi, plastiko nanodalelių paplitimas aplinkoje gali sukelti ne tik ekotoksikologines problemas, bet ir galimą neigiamą poveikį žmonėms, o vienas iš pagrindinių nerimą keliančių klausimų yra nanoplastiko galimas genotoksinis potencialas.

Polistireno nanodalelės (PS-ND) yra vienos iš labiausiai aplinkoje paplitusių plastiko nanodalelių. Polistireno nanodalelės randamos maisto produktų pakuotėse, vienkartinuose induose, patekusios į žmogaus organizmą gali nusėsti, kauptis ir sukelti neigiamą poveikį sveikatai (Ho et al., 2018, Yee et al., 2021, Moshiran et al., 2021). Dėl to šiame darbe buvo tirtas 70 nm dydžio polistireno (PS) nanodalelių (ND) citotoksiškumas ir genotoksiškumas žmogaus hepatomos ląstelių linijoje. Polistireno nanodalelių citotoksiškumui įvertinti buvo taikyti du metodai: AlamarBlue ir tripano mėlio. Genotoksiškumas įvertintas šarminiu kometos metodu, kuris leidžia aptikti pirmines DNR pažaidas, tokias kaip viengrandžiai ir dvigrandžiai DNR trūkiai ir fermentinėmis reakcijomis (Fpg ir EndoIII) papildytu kometos metodu, kuris leidžia įvertinti, oksidacines DNR pažaidas (Muruzabal et al., 2021).

Darbo tikslas: ištirti polistireno nanodalelių citotoksiškumą ir genotoksiškumą žmogaus hepatomos ląstelių linijoje (HepG2) *in vitro*.

Darbo uždaviniai:

1. Įvertinti tiriamųjų PS-ND hidrodinaminį dydį ir aglomeracijos lygį.
2. Įvertinti PS-ND gebėjimą patekti į HepG2 ląsteles.
3. Nustatyti reaktyvių deguonies formų susidarymo lygį ląstelėse, veiktose PS-ND 24 valandas.
4. Įvertinti PS-ND citotoksiškumą AlamarBlue ir tripano mėlio testais.
5. Įvertinti PS-ND genotoksiškumą šarminiu ir fermento reakcija papildytu kometos metodais.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Plastiką ir jo tipai

Plastikas ir jo gaminiai yra neatsiejama mūsų kasdienybės dalis. Dėl savo universalumo ir ilgaamžiškumo plastiką naudojamas įvairiose srityse – nuo maisto produktų pakuočių iki elektronikos ir automobilių padangų (Yee et al., 2021). Tarptautinės ekonominio bendradarbiavimo ir plėtros organizacijos (angl. *Organisation for Economic Co-operation and Development*, OECD) „Pasaulinė plastiko perspektyva: politiniai scenarijai iki 2060 m.“ (2022) ataskaitoje prognozuojama, kad plastiko sunaudojimas išaugs beveik trigubai nuo 460 mln. tonų 2019 m. iki 1231 mln. tonų 2060 m. per metus. Toks spartus plastiko vartojamumo šuolis numatomas dėl ekonomikos augimo. Šiuo metu didžioji dalis plastiko nėra perdirbama, o jo gaminiai yra naudojami kaip vienkartiniai, todėl atsiduria sąvartynuose arba aplinkoje (Kalali et al., 2023). Nors prognozuojama, kad perdirbto plastiko vartojamumas augs sparčiau nei neperdirbto plastiko, vis tiek numatoma, kad 2060 m. jis sudarys tik 12 % sunaudojamo plastiko dalies, kai neperdirbtas plastiką liks naudojamu labiausiai (88 %) (OECD, 2022).

Plastikas gali būti suskirstytas į skirtingus tipus, pagal tai, iš ko jis yra sudarytas, ar jis yra natūralus, ar sintetinis, ar jį galima perdirbti ar ne (European Environment Agency – EEA, 2021). Daugiausiai plastiką yra gaminamas iš sintetinių organinių polimerų: polistireno (PS), mažo tankio polietileno (LDPE), didelio tankio polietileno (HDPE), polipropileno (PP), polivinilchlorido (PVC) ir polietileno teraftalato (PET) (1.1 lentelė) (Kiek et al., 2020, Geremia et al., 2023).

1.1 lentelė. Pagrindiniai plastiko tipai ir jų panaudojimo būdai (pagal Kiek et al., 2020)

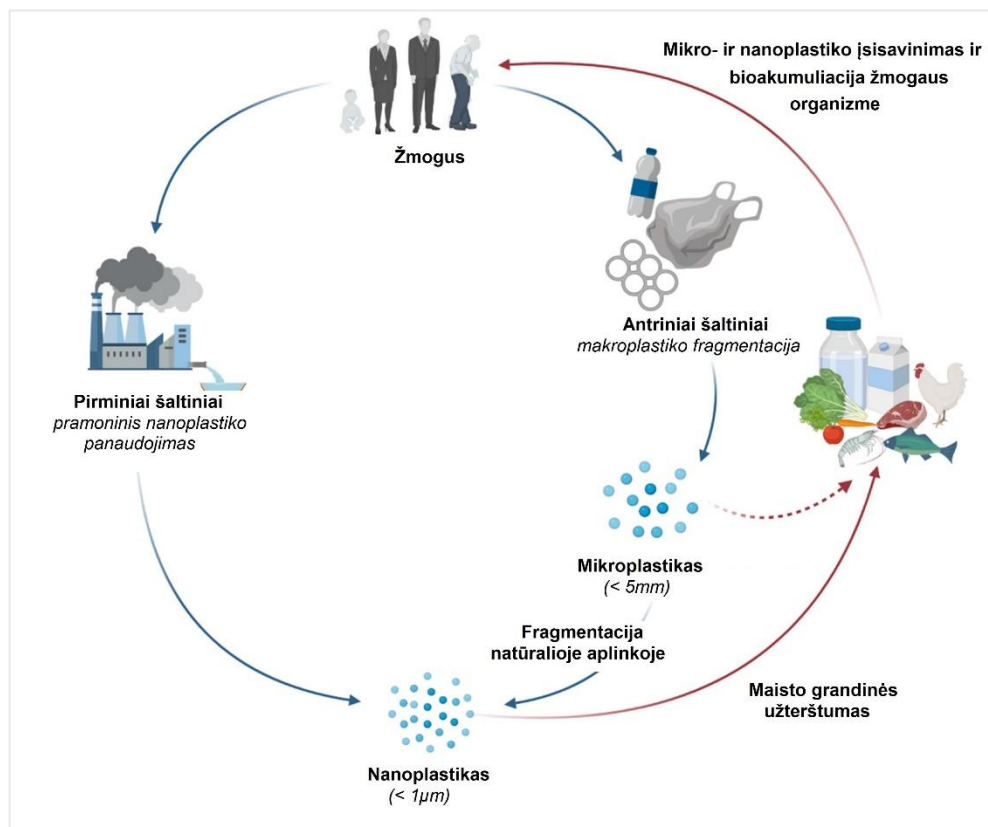
Plastiko tipas	Panaudojimas
Polietileno teraftalatas (PET)	Gėrimų buteliukai, vaistų pakuotės, virvės, drabužių ir kilimų tekstilės
Didelio tankio polietilenas (HDPE)	Pieno, variklių alyvos talpyklos, šampūnų ir kondicionierių, muilo buteliukai, plovikliai ir balikliai
Polivinilchloridas (PVC)	Visų rūšių vamzdžiai ir plytelės, gėrimų ir maisto pakuotės
Mažo tankio polietilenas (LDPE)	Lipnioji plėvelė, įvairaus tipo maišeliai
Polipropilenas (PP)	Margarino, jogurto indeliai, sirupo buteliukai, vaistų buteliukai, plastikiniai butelių dangteliai ir plastikiniai puodeliai
Polistirenas (PS)	Vienkartiniai kavos puodeliai, plastikinės maisto dėžutės, plastikiniai stalo įrankiai ir pakavimo putos

PET yra lygi, skaidri ir plona plastiko rūšis, kuri gaminama vienkartiniam naudojimui, todėl puikiai tinka vienkartiniam sulčių, burnos skalavimo, kosmetikos buteliukams gaminti (Okunola et al., 2019). Didelio ir mažo tankio polietilenas yra atsparus aukštai temperatūrai plastiką, gaminamas iš naftos. Šio tipo plastiką savo sudėtyje neturi ftalatų ir bisfenolio A (BPA), todėl iš jo

dažniausia gaminamos maisto, gėrimų ar higienos priemonių pakuotės (Proshad et al., 2017). Priešingai, polivinilchloridas laikomas labai toksišku dėl jame esančių ftalatų, BPA, sunkiųjų metalų ir kt. Deja, nors ir įrodyta, kad PVC sukelia genetinius pokyčius, apsigimimus ir kepenų veiklos sutrikimus, vis tiek išlieka populiarus vartojamų prekių gamyboje (Okunola et al., 2019). Už polietileną sunkesnis ir tvirtesnis plastikas – polipropilenas. Šis plastiko tipas kaip HDPE ir LDPE yra nekenksmingas ir dažniausiai naudojamas maisto ir gėrimų pakuotėms gaminti (Proshad et al., 2017, Okunola et al., 2019). Polistirenas, dar vienas iš naftos gaminamas plastikas, sudarytas iš stireno, naudojamas izoliacinėms ir pakavimo medžiagoms gaminti. Jo ilgalaikis nedidelio kiekio poveikis gali būti pavojingas sveikatai, sukelti citogenetinį ir kancerogeninį poveikį (Proshad et al., 2017, Siddiqui et al., 2023).

1.2 Plastiko šaltiniai

Aplinkoje esantis plastikas gali irti, todėl susidaro mažesnės nei 5 mm dydžio mikroplastiko dalelės arba mažesnės nei 100 nm nanoplastiko dalelės. Šių dalelių formavimosi šaltiniai skirstomi į dvi grupes: pirminius ir antrinius šaltinius (1.1 pav.) (Yee et al., 2021).



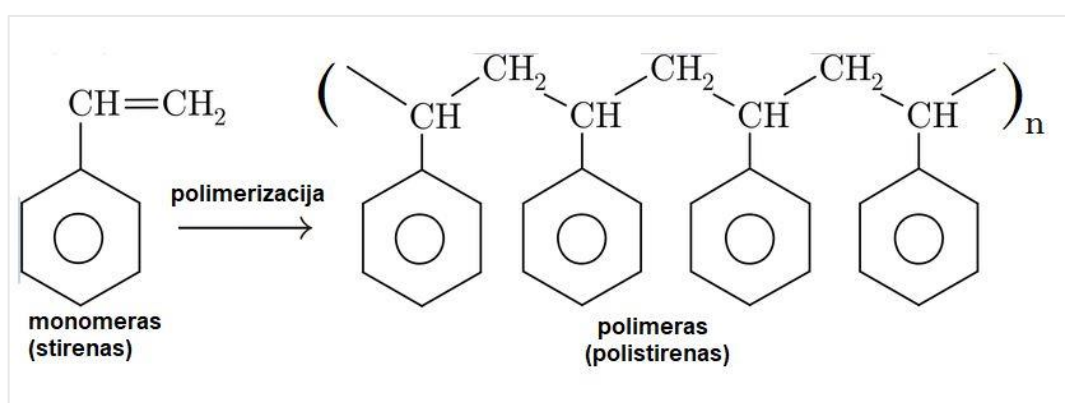
1.1 pav. Mikroplastikų ir nanoplastikų šaltiniai ir padėtis aplinkoje (pagal Yee et al., 2021)

Išmestos plastiko atliekos yra veikiamos įvairių biologinių, cheminių ir aplinkos elementų ir skyla į didelius mikro- ir nanoplastiko kiekius dėl hidrolizės, oksidacinio skilimo arba fizikocheminių procesų (Li et al., 2023).

1.2.1 Pirminiai plastiko šaltiniai

Pirminiai mikro- ir nanoplastiko šaltiniai yra pramonėje sintetintos mikro- ir nanoplastiko dalelės, skirtos pramoniniam jų naudojimui. Šios dalelės gali būti naudojamos šveitimui skirtų kremų ir dantų pastos sudėtyje arba sintetinių drabužių ir kitų tekstilės gaminių gamybai (Ziani et al., 2023). Šių produktų gamybos, pakavimo ir transportavimo metu, netinkamai išmetamos plastiko turinčios priemonės atsiduria ant gatvių, šaligatvių ir kitų paviršių ir taip gali būti išnešiojamos vėjo arba nuplaunamos lietaus į kanalizacijos sistemas ir galiausiai patekti į upes ir kitus vandens telkinius (Laskar & Kumar, 2019). Prie mikro- ir nanoplastiko patekimo į vandenynus prisideda ir jūreivystė bei žvejyba (Geremia et al., 2023).

Plastiko nano- ir mikrodalelės sintetintos, kai cheminės reakcijos metu jungiantis monomerams susidaro polimeras (1.2 pav.) (Adeniyi et al., 2022). Polimerizacijos reakciją sudaro keli etapai. Pirmojo etapo metu, dalyje naudojamų monomero molekulių susidaro aktyvusis centras, prie kurio kitame etape jungiasi monomero molekulės – vyksta grandinės augimas. Grandinės ilgėjimas nutraukiamas, kai aktyvusis centras tampa neaktyviu ir pereina į kitą monomerą. Polimerizacija gali būti radikalinė, kai aktyvusis centras yra laisvas radikalas ir joninė, kai aktyvusis centras – katijonas arba anijonas (Hu et al., 2016, Shrivastava A., 2018).



1.2 pav. Stireno monomero polimerizacijos polistirenui gaminti (pagal Adeniyi et al., 2022)

Kitas polimerų sintezės būdas – polikondensacija. Jos metu reakcija vyksta tarp monomerų, kurių sudėtyje yra dvi ar daugiau reaktyvių funkcinių grupių, tokių kaip hidroksilo, karboksilo ir amino (Hu et al., 2016). Šio proceso metu, jungiantis dviem skirtingiems monomerams, susidaro oligomeras ir išsiskiria šalutiniai produktai, tokie kaip vanduo arba alkoholis. Vėliau, oligomeraai sudaro didesnės molekulinės masės ir sudėtingesnės struktūros polimerus (Yang et al., 2020).

Polimerizacijos ir polikondensacijos reakcijos yra panašios savo polimerų sinteze, tačiau polimerizacijos proceso metu, monomero ir polimero sudėtis identiška, kai tuo tarpu polikondensacijos metu susidaro ne tik nuo pradinės monomero formos besiskiriantis polimeras, bet ir antrinės medžiagos.

1.2.2 Antriniai plastiko šaltiniai

Antriniu plastiko dalelių šaltiniu yra laikomas plastiko atliekų, esančių gamtoje, natūralus irimas (dėl mechaninio, fizikinio ar biologinio poveikio) iki mikro- ir nanodydžio dalelių. Plastiko biodegradacija yra plastiko dalių skilimas, veikiant mikroorganizmams aerobinėmis sąlygomis, kai susidaro anglies dioksidas, vanduo, mineralinės druskos ir nauja biomasė. Biodegradacijos proceso pradžioje ant plastiko medžiagos paviršiaus besikolonizuojantys mikroorganizmai, tokie kaip bakterijos ir grybeliai, gali būti natūraliai randami aplinkoje arba sąmoningai pridedami, siekiant pagreitinti skilimo procesus (Zeenat et al., 2021, Silva et al., 2023). Mikroorganizmai, esantys ant plastiko, išskiria tarpląstelinius fermentus, kurie suardydami plastiko molekulinis ryšius, pagreitina jo skilimą. Dėl fermentų ir kitų fizikinių ar cheminių procesų, plastikas skyla į oligomeras ir monomeras, o mikroorganizmai gali įsisavinti šiuos fragmentus ir panaudoti savo metaboliniams keliams, kur šie fragmentai skyla į galutinius produktus – anglies dioksidą, vandenį ir biomasę (Silva et al., 2023, Mandal et al., 2024). Tačiau, biodegradacijos trukmė ir veiksmingumas gali skirtis priklausomai nuo plastiko sudėties, mikroorganizmų ir aplinkos sąlygų (Bher et al., 2022).

Fotodegradacija – medžiagos skilimo procesas veikiant šviesai. Dauguma sintetinių polimerų, įskaitant ir plastiko, yra jautrūs irimui, kurį inicijuoja ultravioletinė (UV) ir regimoji šviesa (Zeenat et al., 2021). Absorbavus šviesą, energija perduodama molekulei elektronams ir pakeičia jų konfigūraciją – vyksta perėjimas į sužadintą būseną. Esant O_2 ir H_2O tokios būsenos molekulės nėra stabilios ir gali savaime suirti – oksiduotis arba hidrolizuotis, taip sukeldami plastiko polimerinių grandinių skilimą į mažesnius fragmentus (Mandal et al., 2024). Į aplinką išskirtos molekulės gali reaguoti su kitomis aplinkoje esančiomis molekulėmis ir pakenkti gamtai ir ekosistemoms.

Dar vienas plastiko irimo būdas – mechaninis – kai plastiko polimerai skyla veikiant išorinėms jėgoms (Lin et al., 2020). Mechaninį plastiko skilimą gali sukelti jo susidūrimas su akmenimis, smėliu, vėju ar bangomis gamtinėje aplinkoje (Zhang & Wu, 2023). Mechaniniu būdu dažniausiai skyla automobilio padangų ar stabdžių diskų, kelio paviršiaus ir kitų dangų atveju, kai susidaro trintis, kuri sukelia mikro įtrūkimus, kurie galiausiai medžiagą suardo (Lai et al., 2022).

1.3 Polistireno nanodalelės

Polistirenas yra sintetinis polimeras, pagamintas iš aromatinių angliavandenilio stireno monomerų. Tai yra vienas gausiausiai pasaulyje gaminamų plastikų, kuris panaudojamas maisto

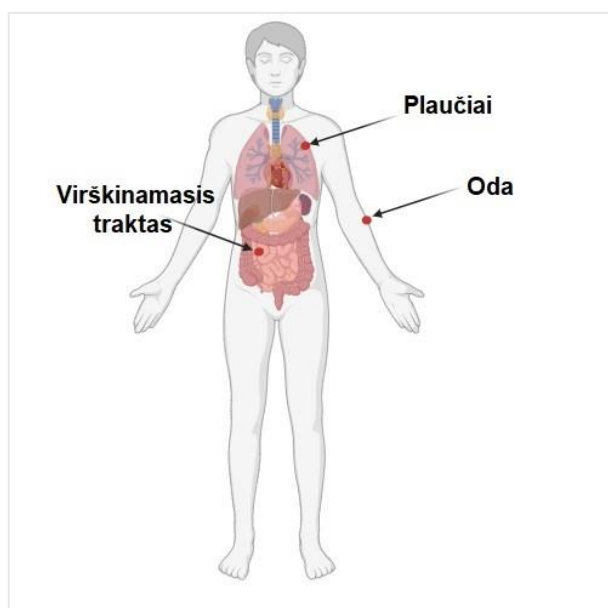
produktų pakuotėms, vienkartiniams indams, izoliacinėms statybinėms medžiagoms ar kompaktiniams diskams gaminti (Ho et al., 2018). Polistirenas plačiai naudojamas dėl savo gerų mechaninių savybių, turi stiprų hidrofobinį pobūdį ir yra atsparus biologiniam irimui (Yousif & Haddad, 2013).

Ši plastiko forma skirstoma į keturias rūšis ir pagal tai pritaikoma panaudojimui: bendrosios paskirties polistirenas, didelio poveikio polistirenas (angl. *high impact polystyrene*), polistireno putplastis ir putų polistirenas (Capricho et al., 2022). Bendrosios paskirties ir didelio poveikio polistireno formos yra kietos, bespalvės ir riboto lankstumo, todėl dažniausiai naudojamos anksčiau minėtiems vienkartiniams indams, produktų pakuotėms, taip pat gaminant televizorių ar kompiuterių korpusus bei dėl savo biologinio suderinamumo ir medicinos pramonėje gaminant Petri lėkšteles ir mėgintuvėlius (Yousif & Haddad, 2013, Ho et al., 2018). Tuo tarpu, polistireno putplastis plačiai naudojamas dūžtančioms siuntoms gabenti, taip apsaugant daiktus nuo smūgių ir pažeidimų transportavimo metu. Putų polistirenas yra viena iš labiausiai paplitusių ir naudojamų šio plastiko formų. Ji naudojama šiluminių barjerų sukūrimui, pastatų sienų, stogų ar pamatų konstrukcijose, taip išvengiant šilumos nuostolių ir sumažinant energijos sąnaudas (Gaidhani et al., 2023).

Nepaisant visų polistireno pritaikymo ypatumų ir galimybių, polistirenas gali būti ir kenksmingas. Dėl savo kietumo ir hidrofobiškumo jis ilgai išlieka gamtoje ir teršia aplinką. Stirenas, iš kurio sudarytas polistirenas, yra lakus organinis junginys, kuris sklynt polistirenui iki mikro ir nano dydžio dalelių gali išsiskirti į orą ir vandenį. Neskaitant oro ir vandens, žemė/dirvožemis yra dar viena vieta, kur kaupiasi didžioji dalis mikro- ir nanoplastiko (Bhat et al., 2023). Dalelės nuo dirvožemio paviršiaus keliauja į gilesnius sluoksnius ir nusėda, o tai gali turėti įtakos ten augantiems augalams, tokiems kaip pupa (lot. *Vicia faba*) ir valgomasis svogūnas (lot. *Allium cepa*). Tiriant 5 μm ir 100 nm dydžio polistireno daleles, nustatyta, kad jos kaupiasi pupos šaknų audiniuose ir yra citotoksiškos (Jiang et al., 2019). Tuo tarpu tiriant rutuliuko formos 50 nm dydžio PS-ND valgomajame svogūne, nustatyta, kad dalelės ne tik kaupiasi citoplazmoje ir vakuolėse, bet ir sukelia chromosomines anomalijas ir mikrobranduolių susidarymą (Gorgetti et al., 2020). Literatūroje teigiama, kad polistireno turintys gaminiai, veikiami karščio ar rūgščių medžiagų, yrant gali patekti į maistą ir gėrimus ir neigiamai paveikti ir žmonių sveikatą. Lėtinis stireno poveikis yra susijęs su tokiais sveikatos problemomis kaip akių, odos ir kvėpavimo takų dirginimas, taip pat galimas neigiamas poveikis nervų sistemai ir kepenims (Yee et al., 2021). Pavyzdžiui, tiriant stireno poveikį naftos chemijos pramonės darbuotojų sveikatai, 16 % darbuotojų nustatyta kancerogeniškumo rizika (Moshiran et al., 2021).

1.3.1 Mikro- ir nanoplastiko patekimo į žmogaus organizmą mechanizmai

Mikroplastikas ir nanoplastikas į žmogaus organizmą gali patekti trimis pagrindiniais būdais: per odą, plaučių gleivinę ir virškinamąjį traktą (1.3 pav.) (Li et al., 2023, Niu et al., 2023). Patekimo į žmogaus organizmą mechanizmai priklauso nuo nanodalelių fizikinių ir cheminių savybių. Nanoplastiko dalelės patekę į žmogaus organizmą sąveikauja su įvairiomis žmogaus organizmo biomolekulėmis (baltymais, lipidais, angliavandeniais, nukleino rūgštimis), kurios apgaubia daleles, sudarydamos vainikus (angl. *corona*), kurie palengvina nanodalelių patekimą į ląsteles (Stapleton, 2019, Yee et al., 2021).



1.3 pav. Nanodalelių patekimo į žmogaus organizmą būdai (sukurta su BioRender)

Yee ir kt. (2021) teigia, kad daugiausia plastiko dalelių į žmogaus organizmą patenka per virškinamąjį traktą su mikro- ar nanoplastiku užterštu maistu ir gėrimais, bei jų pakuotėmis. Ilgiausia žmogaus virškinamojo trakto dalis, plonoji žarna, savo sienelėje turi ataugas vadinamas gaureliais, kurie papildomai padengti mikrogaureliais, o tai padidina paviršiaus plotą. Tokia plonosios žarnos sienelės sandara leidžia įsisavinti didžiąją dalį mažos molekulinės masės, įskaitant mikro- ir nanodaleles, medžiagų (Lundquist & Artursson, 2016). Taip pat yra žinoma, kad žarnyno mikrobioma yra sudėtinga biologinė aplinka, o į šią aplinką patekusios nanodalelės gali sąveikauti su joje esančiomis bakterijomis ir mikroorganizmais, taip sutrikdant šeimininko ir mikroorganizmų sąveiką (Stater et al., 2021).

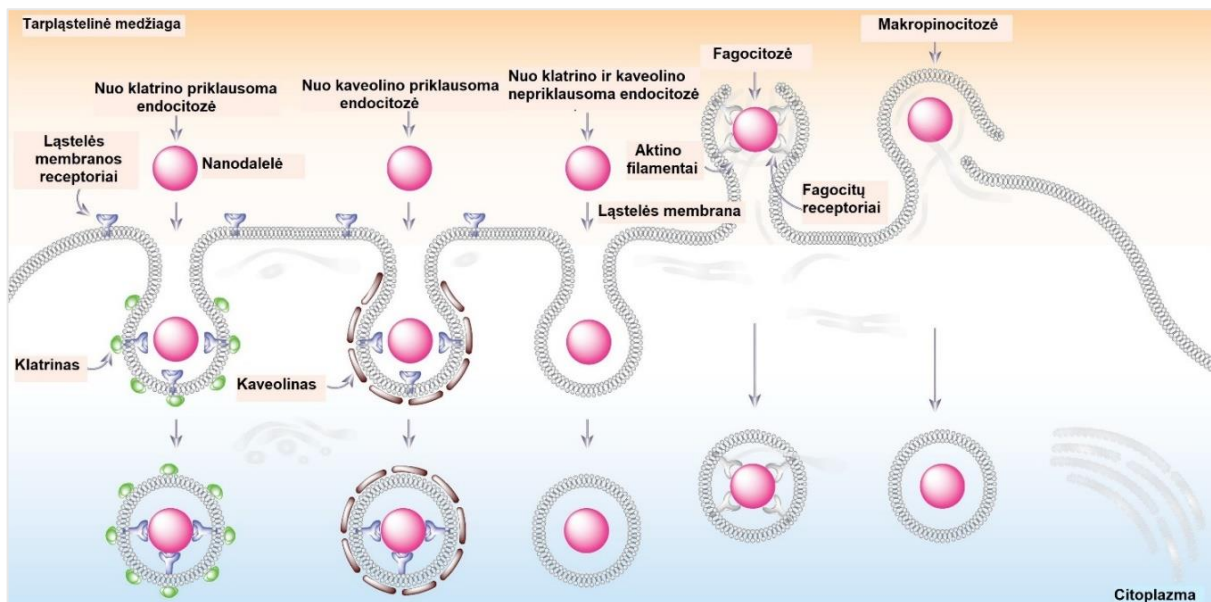
Nanoplastikas į žmogaus organizmą gal patekti ir per kvėpavimo takus. Žmogus su įkvepiamo nanoplastiko rizika susidurti gali tiek patalpose, tiek lauke dėl užteršto oro sąlygų (Ghosh et al., 2023). Žmogaus kvėpavimo sistema sudaryta iš viršutinių ir apatinių kvėpavimo takų. Viršutiniai kvėpavimo takai yra padengti virpinamuoju epiteliumu, kurie pašalina nusėdusias daleles ir taip

apsaugo plaučius nuo pažeidimų ir infekcinių uždegimų. Tačiau antriniai kvėpavimo takai yra jautresni dėl didelio paviršiaus ploto, kur alveolėse vyksta intensyvi deguonies ir anglies dioksido apykaita tarp oro ir kraujo (Lu et al., 2014). Taigi nanoplastikas patekęs į alveoles gali nusėsti ant pakankamai plono plaučių epitelio ląstelių sluoksnio ir net prasiskverbti pro jį į kapiliarinio kraujo sistemą, taip pasklisdamos po visą žmogaus organizmą (Yee et al., 2021). Neseniai publikuotame Yang ir kt. (2024) tyrime, kur pelės buvo veikiamos trimis polistireno nanodalelių koncentracijomis, nustatyta, kad PS-ND ne tik sukėlė oksidacinį stresą, proteazių ir antiproteazių pusiausvyros sutrikimus, bet ir pablogino kvėpavimo funkciją ir sukėlė į lėtinę obstrukcinę plaučių ligą panašių pažeidimų.

Mikro- ir nanoplastikas randamas kosmetikos priemonėse, tokiose kaip kūno ar veido šveitikliai, taip pat ir daugelyje tekstilės gaminių mikropluoštuose, todėl yra teigiama, kad tokios dalelės gali patekti į žmogaus organizmą per sąlytį su oda (Grote et al., 2023). Nors oda atlieka apsauginę organizmo funkciją ir yra nepralaidi, pastebėta, kad nanoplastikas gali patekti per įvairius odos pažeidimus, prakaito liaukas ir plaukų folikulus (Friedman et al., 2021). Tyrimai su zebrinių danijų embrionais, paveiktais skirtingomis 25 nm polistireno nanodalelių koncentracijomis (0, 5, 25 ir 50 g/l) 96 valandas, parodė, kad iš susidariusio reaktyvių deguonies formų kiekio, tiek odos jonocitai, tiek keratonocitai patyrė oksidacinį stresą, o pastarųjų pažeista ir apikalinė struktūra (Kantha et al., 2022).

1.3.2 Nanoplastiko nanodalelių patekimo į ląstelę mechanizmai

Nanodalelės patekęs į žmogaus organizmą, gali sąveikauti su įvairiais ląstelės plazminės membranos ar viduląstelinio matrikso komponentais ir patekti į ląstelę aktyviosios pernašos būdu – endocitoze. Priklausomai nuo ląstelių tipo, baltymų, lipidų ir kitų molekulių, dalyvaujančių šiame procese, endocitozė gali būti skirstoma į fagocitozę, nuo klatrino priklausomą endocitozę, nuo kaveolino priklausomą endocitozę, nuo klatrino ir kaveolino nepriklausomą endocitozę ir makropinocitozę (1.4 pav.) (Manzanares & Cena, 2020, Almeida et al., 2021, Awashra & Mlynarz, 2023).



1.4 pav. Schematiškai pavaizduoti nanodalelių patekimo į ląstelę būdai: nuo klitrino ir kaveolino priklausoma endocitozė, nuo klitrino ir kaveolino nepriklausoma endocitozė, fagocitozė ir makropinocitozė (pagal Augustine et al., 2020)

Fagocitozė tai procesas, kurio metu fagocitai atpažįsta nanodaleles. Šis atpažinimas įvyksta po opsonizacijos proceso, kai opsoninai, pavyzdžiui, imunoglobulinai, absorbuojami ant nanodalelės paviršiaus. Tada fagocitas apgaubia nanodalelę savo ląstelės membrana ir įtraukia ją į ląstelės vidų (Awashra & Mlynarz, 2023). Nuo klitrino priklausoma endocitozė vyksta specializuotose plazminės membranos srityse, kuriose klatrinai susitelkia aplink pūslelę ir ją padengia. Tuomet klatrinu dengta pūslelė internalizuojasi, praranda klatriną apvalkalą ir susijungia su kitomis pūslelėmis, sudarydama ankstyvąją endosomą (Rennick et al., 2021, Awashra & Mlynarz, 2023). Nuo kaveolino priklausomą endocitozė sudaro plazminės membranos invaginacijos, kur kaveolinas jungdamasis su cholesteroliu sudaro kaveolino pūsleles (Manzanares & Cena, 2020). Kai ląstelėse nėra tokių baltymų kaip klatrinai ir kaveolinas, nanodalelės į ląstelę gali patekti ir nuo klitrino ir kaveolino nepriklausomu būdu. Šis patekimo mechanizmas priklauso nuo cholesterolio ir reikalauja specifinės lipidų sudėties (Almeida et al., 2021). Dar vienas galimas nanodalelių patekimo būdas į ląstelę – makropinocitozė. Tai nespecifinis ekstraląstelinio skysčio apgaubimas membranos išsikišimais ir susiliejimais į plazminę membraną, sukuriant makropinosomą (Means et al., 2022).

Nanodalelių patekimo į ląstelę mechanizmas priklauso nuo jų dydžio, formos ir paviršiaus savybių (Moore et al., 2019). 44 nm dydžio polistireno dalelių absorbcijos į žmogaus storosios žarnos fibroblastus tyrimai parodė, kad šios nanodalelės absorbuojamos nuo klitrino priklausomos endocitozės būdu (Fiorentino et al., 2015). Tuo tarpu Maneerat ir kt., (2012) tirdami panašaus dydžio (50 nm), bet su skirtingomis paviršiaus savybėmis, be krūvio ir su amino funkcinę grupę polistireno nanodaleles, nustatė, kad krūvio neturinčios dalelės į žmogaus kiaušidžių vėžio ląsteles

buvo įsisavintos nuo kaveolino nepriklausomu keliu, o aminu modifikuotos polistireno nanodalelės – fagocitozės būdu, formuojant lizosomas. Panašius rezultatus parodė ir Liu ir kitų (2023) tyrimas su 50 ir 100 nm polistireno nanodalelėmis žmogaus plaučių vėžinėje ląstelių linijoje A549. 50 nm dydžio PS-ND buvo įsisavinamos nuo kaveolino priklausomu endocitozės būdu, kai didesnės, 100 nm PS-ND į ląsteles pateko nuo klatrino priklausančios endocitozės ir makropinocitozės būdais.

1.3.3 Plastiko nanodalelių toksiškas poveikis ląstelių organelėms

Mikro- ir nanoplastikas patekęs į ląstelę, gali sąveikauti su ląstelės organelėmis, tokiomis kaip branduolys, lizosomos, mitochondrijos, endoplazminis tinklas ir ribosomos (Khan & Jis, 2023).

Nėra nustatyta, kad nanoplastikas kauptųsi mitochondrijose, tačiau jų tarpusavio sąveika ir neigiamas poveikis pastebėtas. Žmogaus storosios žarnos adenokarcinomos ląsteles Caco-2 paveikus 50 nm dydžio fluorescuojančiomis ir nefluorescuojančiomis polistireno nanodalelėmis 24 valandas ir pasitelkus transmisinę elektroninę mikroskopiją (TEM), nustatyta, kad išsipūtė mitochondrijų kristos, o tai gali inicijuoti mitochondrijų sukeltą ląstelių mirtį (Domenech et al., 2021). Lin ir kt. (2022) tirdami 80 nm polistireno nanodaleles žmogaus kepenų ir plaučių ląstelių linijose (atitinkamai L02 ir BEAS-2B), nustatė, kad abiejų ląstelių atveju padidėjo mitochondrinų reaktyvių deguonies formų ir sumažėjo mitochondrijų membranų potencialas.

Viena iš viduląstelinio nanotoksiškumo priežasčių yra nanodalelių sukelta lizosominė disfunkcija (Uzhytchak et al., 2023). Tiriant 100, 200, 500 ir 1000 nm dydžio PS-ND žmogaus indukuotose pluripotentinėse kamieninėse ląstelėse, nustatyta, kad 1000 nm PS-ND ne tik kaupiasi lizosomose, bet sukelia jų išsiplėtimą, dėl kurio ląstelė žūsta (Jeong et al., 2022). Liu su kolegomis (2022) tirdami mikro ir nano polistireno dalelių (50 nm, 500 nm ir 5 μm) sukeltą organelių pažeidimus žiurkių bazofilinės leukemijos ląstelėse (RBL-2H3) vertino lizosomų membranos pralaidumą ir joje randamus baltymus LAMP-1 ir LAMP-2. Abiejų baltymų raiška buvo sumažėjusi atitinkamai didėjant tiriamų dalelių dydžiui, membranos pralaidumas po poveikio PS-ND susilpnėjo, o esant didžiausiai PS koncentracijai – išnyko.

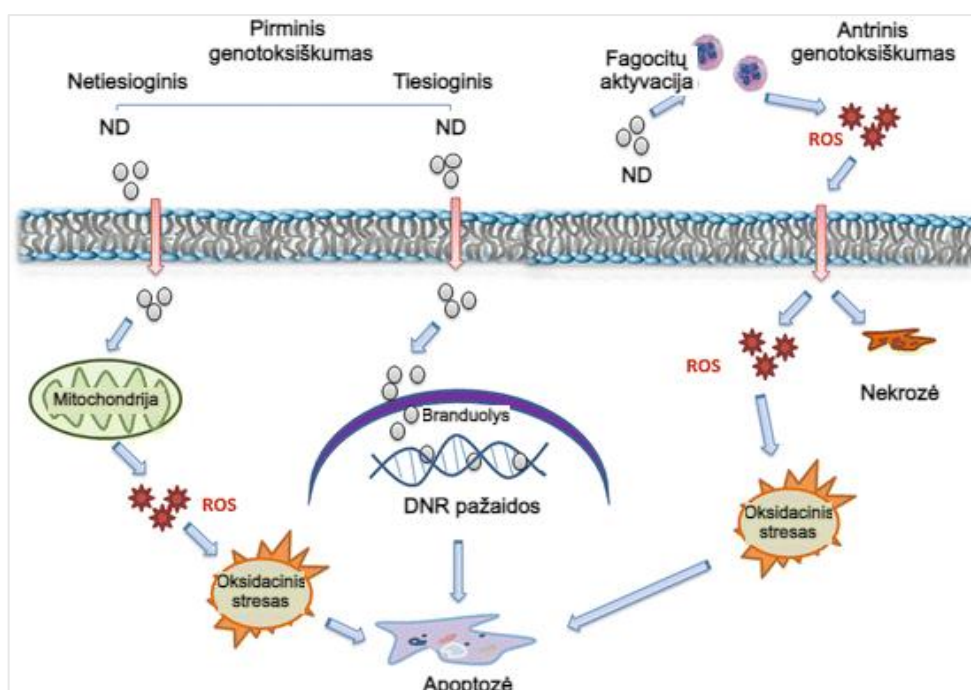
Dar viena ląstelių organelė, kurios normalias funkcijas gali sutrikdyti nanoplastiko dalelės yra endoplazminis tinklas. Tai svarbi baltymų ir lipidų sintezės vieta ląstelėje, atliekanti svarbų vaidmenį viduląstelinį signalų perdavime, susijusiam su ląstelių gyvybingumu (Lai et al., 2022). Tiriant 20 nm PS-ND su papildoma amino grupe ir 20 bei 50 nm nmodifikuotas PS-ND žmogaus alveolių epitelio ląstelių linijoje A549, nustatyta statistiškai reikšmingas NOX4 baltymo (randamo endoplazminio tinklo membranoje) raiškos padidėjimas visų tiriamų nanodalelių atveju. Taip pat pastebėta, kad šiose ląstelėse žymiai padidėjo BiP ir ATF4 baltymų kiekis. Esant endoplazminio

tinklo stresui BiP atsiskiria nuo šios organelės streso jutiklių ir taip inicijuoja streso sukeliama ATF4 signalinį kelią (Halimu et al., 2022).

1.4 Nanodalelių genotoksiškumas

1.4.1 Nanodalelių genotoksiškumo mechanizmai

Nanodalelėms patekus į ląstelę, jos gali veiksmingai sąveikauti su DNR ir sukelti struktūrinius ir funkcinius DNR pakitimus. Yra du pagrindiniai nanodalelių sukeliama genotoksiškumo mechanizmai: pirminis ir antrinis genotoksiškumas (1.5 pav.) (Vallabani & Karlsson, 2022).



1.5 pav. Pirminis ir antrinis genotoksiškumo mechanizmai. ND – nanodalelės; ROS – reaktyvios deguonies formos (pagal Manickam et al., 2017)

Pirminis genotoksiškumas dar skirstomas į tiesioginį ir netiesioginį. Pirminį, tiesioginį genotoksiškumą sukelia mechanizmai susiję su tiesiogine nanodalelių sąveika su genetinė medžiaga ir susijusiais baltymais (Manickam et al., 2017). Tokia sąveika ląstelės interfazės metu gali sutrikdyti DNR replikaciją ir transkripciją, o mitozės metu – sukelti klastogeninį arba aneugeninį poveikį (Barabadi et al., 2019). Netiesioginis pirminis genotoksiškumas sukeliama per reaktyvių deguonies formų (ROS) susidarymą. Šios ROS formos sudaro laisvuosius radikalus, kurie sąveikaudami su ląstelių biomolekulėmis, gali tiesiogiai paveikti DNR ir sukelti purinų ir pirimidinų oksidacines pažeidimas, netiesiogiai paveikti padidėjusią laisvųjų radikalų gamybą mitochondrijose ir sukelti oksidacinį stresą, kuris lemia DNR pažeidimus (Barabadi et al., 2019, Shukla et al., 2021).

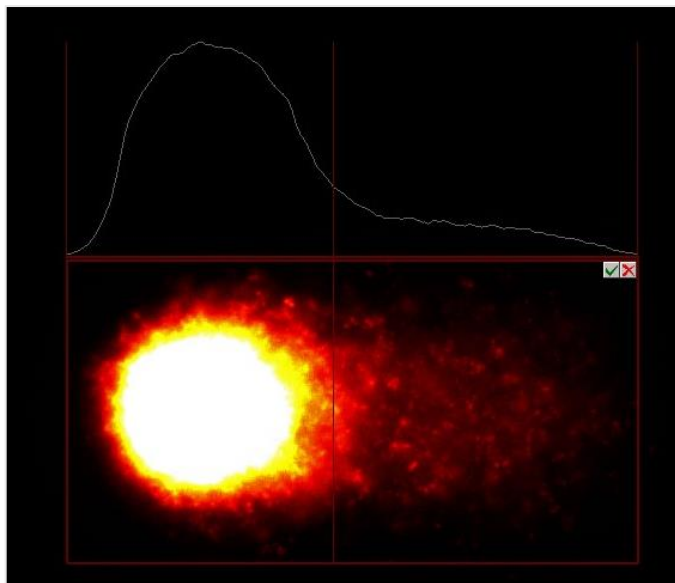
Antrinis genotoksiškumas laikomas pagrindiniu nanodalelių genotoksiškumo mechanizmu ir yra siejamas su uždegiminiais procesais, kuriuos sukelia fagocitų, įskaitant makrofagų ir neutrofilų, suaktyvinimas. Fagocitams suaktyvinus įgimto imuniteto reakciją, padidėja ląstelinio deguonies sunaudojimas, todėl išskiriama daugiau laisvųjų radikalų. Su uždegiminiu poveikiu susijusios DNR pažeidimos atsiranda dėl reaktyvių deguonies ir azoto formų. Šio tipo genotoksiškumo neįmanoma iširti standartiniais *in vitro* metodais dėl monokultūrų negebėjimo sukelti genotoksiškumą per uždegiminę reakciją (Kohl et al., 2020). Pavyzdžiui, nanodalelių kaupimasis plaučių ląstelėse gali sukelti lėtinį imuninį atsaką, susijusį su oksidaciniu stresu. Visa reakcijų grandinė sukelia laisvųjų radikalų susidarymą, o imuninės ląstelės išskiria citokinus ir chemokinus, kurie sukelia antrinį genotoksiškumą ir kaimyninėms tikslinėms ląstelėms (Shukla et al., 2021, Vallabani & Karlsson, 2022).

1.4.2 Nanodalelių genotoksiškumo įvertinimas

Nanodalelių sukeliama genotoksiškumo įvertinimas gali būti atliekamas keliuose lygiuose: genų mutacijų, DNR pažeidimų ir chromosomų mutacijų. Genų mutacijų vertinimui gali būti atliekami tyrimai pagrįsti timidino kinazės arba hipoksantino-guanino fosforiboziltransferazės (*HPRT*) genais (Elespuru et al., 2018). Pelių limfomos (MLA) tyrimas leidžia nustatyti klastogenines ir aneugenines chromosomų mutacijas bei genų mutacijas, tačiau taikant šį metodą yra reikalingi tolimesni tyrimai (Kohl et al., 2020). Chromosominėms pažeidimams aptikti, tokioms kaip mikrobranduoliai, nukleoplazminiai tiltai, chromosomų lūžiai atliekamas mikrobranduolių testas, o DNR pažeidimos vertinamos kometos metodu (Shukla et al., 2021).

Kometos metodas arba vienos ląstelės gelio elektroforezės metodas yra universalus ir jautrus metodas, naudojamas DNR pažeidimams atskirų ląstelių lygmenyje įvertinti. Atliekant kometos tyrimą, pirmiausia ląstelės imobilizuojamos žemos lydymosi temperatūros agarozėje ant objektyvio stiklelio ir lizuojamos buferiu (Karbaschi et al., 2019). Lizės metu suardomos ir pašalinamos ląstelių membranos ir citoplazmos bei nukleoplazmos sudedamosios dalys. Po lizės likusi neigiama superspiralizuota DNR denatūruojama ir panaudojant elektrinį lauką, ląstelėms taikomas krūvis. Elektroforezės metu susiformuoja struktūra panaši į kometą. Pažeista DNR pradeda judėti iš branduolio link teigiamai įkrauto anodo ir sudaro kometos uodegą, o nepažeista DNR lieka superspiralizuota ir sudaro kometos galvos struktūrą (1.6 pav.) (Karbaschi et al., 2019, Costa et al., 2024). Po elektroforezės mėginiai yra neutralizuojami Tris HCl buferiu ir dažomi įvairiais fluorescuojančiais DNR dažais, tokiais kaip etidžio bromidas, propidžio jodidas ir SYBR Green I (Tamara & Elke, 2015). Gautas kometas galima vizualizuoti fluorescenciniu mikroskopu ir analizuoti rankiniu būdu, vertinant santykinį DNR kiekį kometos uodegoje, taip pat su pusiau arba

pilnai automatizuota vaizdų analizės sistema. Kompiuterizuoti būdai leidžia įvertinti ne tik dažniausiai analizuojamą procentinį DNR kiekį kometos uodegoje, bet ir uodegos ilgį bei momentą.



1.6 pav. Kometa (400×). Originali mikrofotografija

Kometos metodas turi kelias versijas: neutralus, šarminis ir fermento reakcija papildytas metodai. Populiariausias iš šių metodų – šarminis, leidžiantis aptikti viengrandžius, dvigrandžius DNR trūkius ir šarmams labilias vietas. Po lizės mėginyje likęs įmobilizuotas ląstelės branduolys yra patalpinamas į šarminį buferį ($\text{pH} \geq 13$), kurio pagalba yra denatūruojama DNR ir vyksta šarmams labilių vietų hidrolizė (Pu et al., 2015). Šarminės sąlygos leidžia lengviau išsivynioti DNR ir atskleisti pažaidas. Dvigrandžiai DNR trūkiai sukelia mutacijas ir chromosomų pakitimus, todėl atliekant tyrimus yra svarbu atpažinti būtent tokio tipo pažaidas (Cannan & Pederson, 2017). Neutralus kometos metodas leidžia nustatyti mažesnę DNR pažaidų lygį. Pasibaigus lizės etapui, mėginiai yra talpinami į neutralų elektroforezės buferį ($\text{pH} = 9$). Ląsteles veikiant neutraliomis sąlygomis, DNR grandinės yra apsaugomos nuo konformacinio išsikraipymo, todėl šiuo metodu galima specifiskai nustatyti tik dvigrandininės DNR pažeidimus (Roy et al., 2021). Siekiant metodą padaryti specifiskesnį ir jautresnį, galima pridėti papildomą fermentinę reakciją. Ši reakcija įterpiama iškart po lizės etapo, o jai panaudojamos specifinės DNR bazių pažaidas atpažįstančios endonukleazės (Costa et al., 2024). Oksiduotų DNR bazių vietose, susidaro apurininės ir apirimidininės sritys, kurių aptikimui naudojami fermentai, atitinkamai, formamido pirimidino DNR glikozilazė (Fpg) ir endonukleazė III (EndoIII) (Pu et al., 2015, Fabbrizi et al., 2021). Fpg yra bazių ekscizijos reparacijos fermentas, kuris katalizuoja oksiduotų purinų, tokių kaip 7-hidro-8-oksoguanino pažaidos pašalinimą ir geba atpažinti atvirus purinų ar formamido pirimidinų žiedus, susidarančius dėl purininių pažaidų. Endonukleazė III atpažįsta oksiduotus pirimidinus, įskaitant ir timino glikolį ir uracilo glikolį (Fabbrizi et al., 2021, Muruzabal et al., 2021). Dar vienas fermentas,

kuriuo galima papildyti kometos metodą – T4 endonukleazė V. Šis fermentas turi tiek DNR N-glikozilazės, tiek apurininį/apirimidinį (AP) liazės aktyvumą, todėl geba aptikti ir išlaisvinti pirimidino dimerus sukuriant apurininę arba apirimidinę vietą, kurioje AP liazė skelia fosfodiesterinę jungtį taip suformuojant grandininį trūkį (Fabbrizi et al., 2021).

1.4.3 Nanodalelių genotoksiškumo kometos tyrimų apžvalga

Anksčiau minėtos kometos metodo versijos yra naudojamos tiek *in vitro*, tiek *in vivo* nanodalelių genotoksiškumui įvertinti (1.2 lentelė). Atliekant kometos metodą buvo nustatinėjamas 40 nm polietileno tereftalato nanodalelių genotoksiškumas žmogaus monocitinių ląstelių linijoje THP-1 (Villacorta et al., 2022). Atlikti šarminis ir Fpg fermentu papildytas kometos metodai parodė, kad PET nanodalelių 5, 10, 25 ir 50 µg/ml koncentracijos nesukėlė nei pirminių, nei oksidacinių DNR pažeidimų, lyginant su kontroliniais mėginiais.

Priešingai, PET nanodalelių (136–167 nm) genotoksiškumą žmogaus plaučių epitelio ląstelėse A549 tyrė Alzaben ir kiti (2023), nustatė, kad PET tiriamos koncentracijos (2, 16, 125 µg/ml) padidino DNR pažeidimų kiekį ląstelėse, ir koreliacija tarp tirtų koncentracijų ir sukeltų DNR pažeidimų kiekio buvo statistiškai reikšminga. Apskaičiuota, kad didžiausios tirtos koncentracijos atveju grynasis pažeidimų kiekio padidėjimas buvo 0,1 pažeidimo/10⁶ bazių porų.

Tiriant polistireno (50, 200 ir 500 nm) nanodalelių genotoksiškumą *Drosophila melanogaster* lervų hemocituose *in vivo*, gauta, kad 160 ir 800 µg/ml (0,4 ir 2 g PS-ND maiste) koncentracijos visų trijų dydžių atveju sukėlė reikšmingą DNR pažeidimų kiekio padidėjimą, o 50 nm dalelių atveju buvo stebimas stipriausias poveikis (Alaraby et al., 2022).

Skaidraus polipropileno (158 nm) ir polietileno tereftalato (252 nm) nanodalelių ir juodos spalvos polietileno tereftalato (107 nm) nanodalelių genotoksiškumas kometos metodu įvertintas žmogaus hepatomos ląstelių linijoje HepG2 ir kolorektalinės adenokarcinomos epitelio ląstelių linijoje Caco-2 (Roursgaard et al., 2022). PP nanodalelių koncentracijų (3, 5, 11, 22, 44, 88, 175 ng/ml) poveikis ląstelėms buvo tiesiogiai susijęs su DNR pažeidimais, tačiau rezultatai nebuvo statistiškai reikšmingi. Tiek skaidrių, tiek juodos spalvos PET nanodalelių koncentracijų (1, 2, 4, 8, 16, 32 ir 63 ng/ml) atveju sukeltas DNR pažeidimų kiekis buvo statistiškai reikšmingas ir teigiamai koreliavo su naudotomis koncentracijomis.

Nefunkcionalizuotų (50 nm) ir aminintų polistireno nanodalelių (PS-NH₂) (50 nm) bei polivinilchlorido mikrodalelių (<50 nm) galimas genotoksinis potencialas tirtas Caco-2 ir HT29-MTX-E12 ląstelių monokultūrose (Busch et al., 2021). Nė viena iš tirtų PS ir PVC dalelių koncentracijų (1, 5, 10 ir 50 µg/ml) nesukėlė reikšmingų DNR pažeidimų pokyčio, nedidelis, bet statistiškai reikšmingas pažeidimų padidėjimas nustatytas ląstelėse, paveiktose 50 µg/ml PS-NH₂ dalelėmis.

Hu ir Palic (2020) tyrime, 50 nm PS-ND genotoksiškumas vertintas THP-1 ląstelių linijoje ne tik skirtingomis koncentracijomis (10, 100 ir 500 µg/ml), bet ir skirtingais laiko tarpais (po 4, 8, 12 ir 24 valandų). Atlikti šarminės ir neutralios kometos metodai, parodė, kad tirtos dalelių koncentracijos indukuoja DNR pažaidas. Šarminių kometos metodu statistiškai reikšmingi rezultatai gauti, kai ląstelės buvo veikiamos 10 µg/ml PS-ND 24 valandas ir 100 µg/ml po 12 ir 24 valandų poveikio. Tuo tarpu neutraliu kometos metodu statistiškai reikšmingas DNR pažaidų kiekio padidėjimas nustatytas visais poveikio laiko tarpais su 500 µg/ml koncentracija ir su 100 µg/ml koncentracija praėjus 24 valandoms.

1.2 lentelė. Kometos metodu atlikti plastiko nanodalelių genotoksiškumo tyrimai

Tiriamos nanodalelės	Tyrimų objektas	Eksperimento tipas	Genotoksiškumo įvertinimas	Šaltinis
PET (40 nm)	Žmogaus monocitinių ląstelių linija THP-1	Šarminis ir fermentu papildytas kometos metodas (<i>in vitro</i>)	Neigiamas	Villacorta et al., 2022
PET (136–167 nm)	Žmogaus plaučių epitelio ląstelių linija A549	Šarminis kometos metodas (<i>in vitro</i>)	Teigiamas	Alzaben et al., 2023
PS (50, 200 ir 500 nm)	Drosophila melanogaster lervų hemocitai	Šarminis kometos metodas (<i>in vivo</i>)	Teigiamas	Alaraby et al., 2022
PP (158 nm), skaidrus PET (252 nm) ir juodos spalvos PET (107 nm)	Žmogaus hepatomos ląstelių linija HepG2 ir kolorektalinės adenokarcinomos ląstelių linija Caco-2.	Šarminis kometos metodas (<i>in vitro</i>)	Teigiamas (skaidrus ir juodos spalvos PET – 1, 2, 4, 8, 16, 32, 63 ng/ml)	Roursgaard et al., 2022
PS (50 nm), PS-NH ₂ (50 nm) ir PVC (<50 µm)	Kolorektalinės adenokarcinomos ląstelių linija Caco-2 ir žarnyno ląstelių linija HT29-MTX-E12	Šarminis kometos metodas (<i>in vitro</i>)	Teigiamas (PS-NH ₂ – 50 µg/ml)	Busch et al., 2021

PS (50 nm)	Žmogaus monocitinių ląstelių linija THP-1	Šarminis ir neutralus kometos metodai (<i>in vitro</i>)	Teigiamas (10 µg/ml po 24 val., 100 µg/ml po 12 ir 24 val. ir 500 µg/ml po 4, 8, 12 ir 24 val.)	Hu and Palic, 2020
------------	---	---	---	--------------------

Plastiko nanodalelių genotoksiškumui įvertinti dažnai pasitelkiamas kometos metodas, o gauti rezultatai priklauso nuo tiriamų nanodalelių dydžio, paviršiaus savybių, naudojamų koncentracijų ir naudojamos ląstelių linijos.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Tiriamoji medžiaga

Šiame darbe tirtos polistireno nanodalelės, išgytos iš Spherotech^{Inc.} (JAV). Gamintojų teigimu, šių nanodalelių dydis yra 70 nm. Prieš kiekvieną tyrimą paruošiamas naujas, 0,1 % (1 mg/ml) polistireno nanodalelių koloidinis tirpalas ląstelių mitybinėje terpėje DMEM.

Kadangi nanodalelės yra linkę aglomeruoti, prieš kiekvieną eksperimentą nanodalelių bazinis tirpalas (angl. *stock solution*) yra sonikuojamas apie 30 min., 35 kHz dažnio bangomis, sonikatoriumi SONOREX DIGITEC DT (BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Vokietija).

Nanodalelių aglomeracijos ir hidrodinaminio dydžio analizė ląstelių mitybinėje terpėje įvertinta dviem metodais: dinaminio šviesos sklaidymo metodu – DLS (angl. *dynamic light scattering*) ir NanoSight analizatoriumi (NanoSight Ltd, JK). Analizė atlikta VU biotechnologijos institute, Eukariotų genų inžinerijos skyriuje su Andriaus Burdulio pagalba.

Ląstelių linija:

Polistireno nanodalelių genotoksiškumo tyrimams buvo naudojama žmogaus hepatomos ląstelių linija HepG2, išgyta iš Leibniz Instituto DSMZ. Ši ląstelių linija pasižymi geru prieinamumu, paprasta priežiūra, dideliu jautrumu ir specifiškumu, todėl yra tinkama genotoksiškumo tyrimams (Pinter et al., 2021).

2.2 Reagentai ir tirpalai

Naudoti reagentai:

1. AlamarBlueTM (Invitrogen, JAV)
2. Agarozė (LMP, Low Melting Point) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija)
3. Agarozė (NMP, Normal Melting Point) (MBI Fermentas, JAV)
4. Galvijų serumo albuminas (BSA, Bovine Serum Albumine) (Gibco, JAV)
5. 2',7' – dichlorofluoresceindiacetatas (DCFDA) (bcam, JK)
6. Dimetilsulfoksidas (DMSO) (Sigma-Aldrich Co., JAV)
7. Distiliuotas vanduo
8. Dulbeko modifikuota Eagle terpė (DMEM) (Gibco, JAV)
9. Embrioninis veršiukų serumas (FBS, Fetal Bovine Serum) (Gibco, JAV)
10. Endonukleazė III (EndoIII) (New England Biolabs, JAV)
11. Etidžio bromidas (Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija)
12. Fosfatinis buferis (PBS), pH 7,4 (Gibco, JAV)
13. Formamido pirimidino DNR glikozilazė (Fpg) (New England Biolabs, JAV)

14. 4-(2-hidroksietil)-1-piperazinetanosulfoninė rūgštis (HEPES) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija)
15. Kalio chloridas (KCl) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija)
16. Natrio chloridas (NaCl) (milteliai) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija)
17. Natrio etilendiamintetraacetatas (Na₂EDTA) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija)
18. Natrio hidroksidas (NaOH) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija)
19. Penicilino/streptomicino antibiotikų mišinys (PEST) (Biowest, Prancūzija)
20. Polistireno nanodalelės (PS-ND) (tirpalas) (Spherotech^{Inc.}, JAV)
21. Tripano mėlio tirpalas (0,4 % vandeninis tirpalas) (Sigma-Aldrich Co., JAV)
22. Tripsino/ EDTA mišinys (TE) (Gibco, JAV)
23. Tris hidrochloridas (Tris HCl) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija)
24. Triton X – 100 (Carl Roth GmbH + Co. KG, Vokietija)
25. Vandenilio peroksidas 3 % (Gemi, Przedsiębiorstwo Produkcji Farmaceutycznej, Lenkija)

Tyrimuose naudoti tirpalai ir jų sudėtinės dalys pateiktos 2.2 lentelėje. Tirpalams, kurių tirpiklis nenurodytas, kaip tirpiklis buvo naudotas dejonizuotas vanduo.

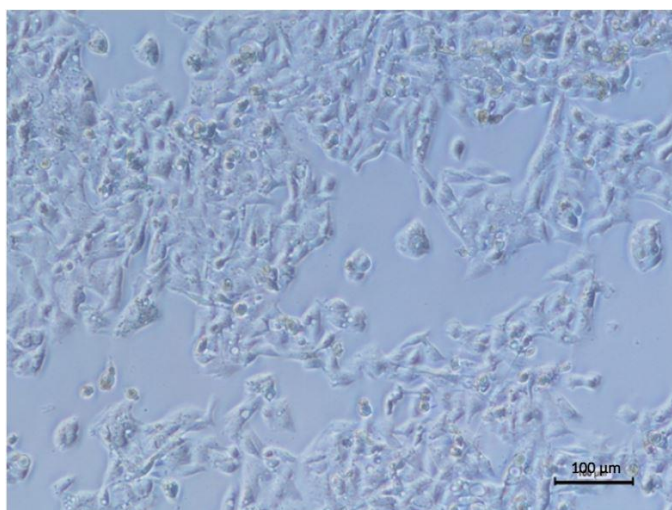
2.2 lentelė. Naudoti tirpalai

Tirpalo pavadinimas	Paruošimas
Agarozė (1 %)	
NMP (angl. <i>normal melting point</i>) agarozė – normalios lydymosi temperatūros agarozė	1 g agarozės/ 100 ml H ₂ O
LMP (angl. <i>low melting point</i>) agarozė – žemos lydymosi temperatūros agarozė	0,5 g agarozės/ 50 ml PBS
Lizės buferis	
NaCl	145 g/l
Na ₂ EDTA	37,2 g/l
Tris HCl	1,58 g/l
DMSO*	111,11 ml/l
Triton X – 100*	11,11 ml/l
Neutralizacijos buferis	
Tris HCl	63,03 g/l
Šarminis buferis	
Na ₂ EDTA	0,367 g/l
NaOH	12 g/l
Fermento reakcijos buferis (FRB)	

HEPES	9,53 g/l
KCl	7,47 g/l
Na ₂ EDTA	0,37 g/l

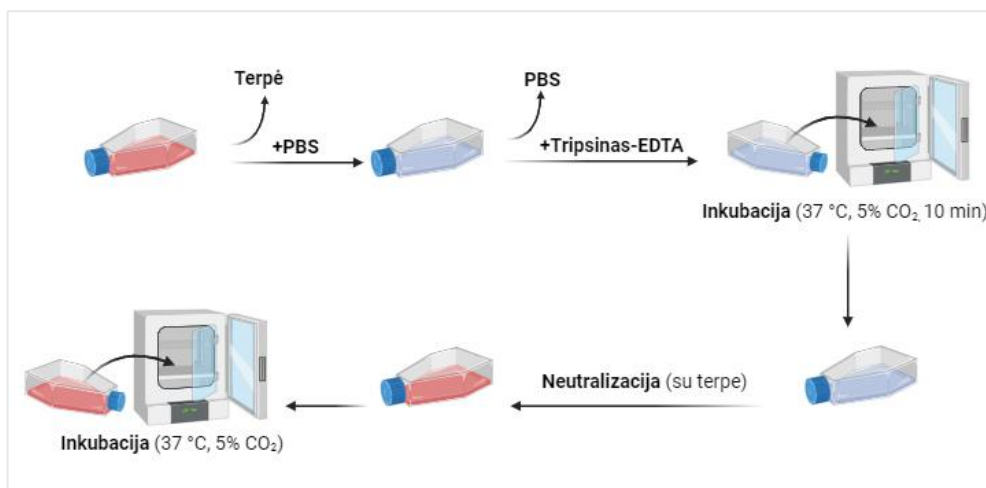
2.3 Ląstelių kultivavimas

Tyrime naudotos adherentinės HepG2 ląstelės, kultivuojamos proliferacinėje ląstelių mitybinėje terpėje DMEM, praturtintoje embrioniniu veršiukų serumu (10 %) ir antibiotikų (penicilino ir streptomicino) mišiniu (1 %). Ląstelės auginamos 25–75 cm² flakonuose, 37 °C temperatūroje drėkinamame inkubatoriuje, 5 % CO₂ atmosferos sąlygomis. Monosluoksnio tankis buvo periodiškai tikrinamas invertuotu šviesiniu mikroskopu (Nikon ECLIPSE Ti-S), ir pasiekus 70–80 % tankį, ląstelės buvo persėjamos – retinamos (2.1 pav.).



2.1 pav. HepG2 ląstelės (100×). Originali mikrofotografija

Ląstelių persėjimu reikalingi keli etapai (2.2 pav.):



2.2 pav. HepG2 ląstelių kultivavimo žingsniai (sukurta su BioRender)

Pirmiausiai buvo išpilama sena proliferacinė terpė, ląstelės praplaunamos fosfatinu buferiu (PBS) ir priklausomai nuo flakono dydžio (25 arba 75 cm²), paveikiamos, atitinkamai, 1 arba 2 ml EDTA-tripsino mišiniu. Ląstelės inkubuojamos 10 minučių, 37 °C temperatūroje, 5 % CO₂. Ląstelių monosluoksniu disociacija buvo vertinama šviesiniu mikroskopu – stebimi ląstelių morfologijos pasikeitimai: nuo flakono paviršiaus atkibusios ląstelės suapvalėja ir laisvai plaukioja skystoje terpėje. Naudojant, atitinkamai, 25 arba 75 cm² talpą, tripsinas neutralizuojamas 4 arba 8 ml proliferacinės terpės. Iš čia, dalis ląstelių (atitinkamai, 4 arba 8 ml) yra perkeliama į naują, sterilią talpą ir naudojamos genotoksiškumo tyrimuose, o likusi dalis (atitinkamai, 1 arba 2 ml) ląstelių yra užpilama 4 arba 8 ml šviežios ląstelių mitybinės terpės ir paliekamos tolimesniam augimui, 37 °C temperatūros inkubatoriuje, 5 % CO₂ atmosferoje iki kito persėjimo.

2.4 Ląstelių veikimas tiriamąja medžiaga

Polistireno nanodalelių citotoksiškumo ir genotoksiškumo tyrimams atlikti, po persėjimo procedūros, ląstelės perkeliama į 96 arba 12 šulinėlių plokšteles. Priklausomai nuo naudojamos plokštelės (96 arba 12 šulinėlių), į kiekvieną šulinėlį užsėjama, atitinkamai, po 100 μl arba 1 ml ląstelių. Ląstelės 24 val. paliekamos inkubatoriuje (37 °C, 5 % CO₂), kad prisitvirtintų prie plokštelių paviršiaus. Optimalus ląstelių tankis užsėjant – 2×10^4 – 2×10^5 ląst./ml. Praėjus 24 valandoms, ląstelės veikiamos skirtingomis 0,1 % polistireno nanodalelių koloidinio tirpalo koncentracijomis. Siekiant įvertinti nanodalelių patekimo į ląsteles efektyvumą ir ROS formavimąsi, HepG2 ląstelės veikiamos 10, 40, 80 ir 100 μg/ml ND koncentracijomis. Analizuojant polistireno nanodalelių citotoksiškumą ir genotoksiškumą, ląstelės veikiamos 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μg/ml dozėmis. Su nanodalelėmis ląstelės inkubuojamos 37 °C temperatūroje, 5 % CO₂, 24 valandas. Tyrimo metu buvo naudota neigiama kontrolė (0 μg/ml), kurią sudarė ląstelės mitybinėje terpėje ir teigiama kontrolė, kuriai naudojamas 1 val. poveikis 3 % vandenilio peroksido tirpalu (galutinė koncentracija – 1,875 μg/ml).

2.5 Ląstelių gyvybingumo įvertinimas

Ląstelių gyvybingumas po 24 val. poveikio PS-ND buvo įvertintas dviem metodais. Pirmasis naudotas metodas – AlamarBlue (AB) testas, paremtas fluorimetriniu redokso indikatoriumi resazurinu – mėlynos spalvos nefluorescuojančiu junginiu. Gyvoje ląstelėse resazurinas redukuojamas iki fluorescuojančio rezorufino, kuris sukuria ryškiai raudoną fluorescenciją, kurią galima kiekybiškai vertinti ir naudoti kaip gyvybingumo rodiklį (Longhn et al., 2022).

Šiam tyrimui ląstelės buvo užsėtos 96 šulinėlių plokštelėje, auginamos ir paveikiamos nanodalelių tirpalo koncentracijomis nurodytomis 2.4 skyriuje. Po 24 val. inkubacijos su nanodalelėmis, poveikio terpė nupilama, ląstelės praplaunamos 100 μl PBS, ir į kiekvieną šulinėlį

įvedama po 100 µl AB dažo (paruoštas AlamarBlue dažo mišinys, kad galutinė koncentracija šulinėlyje būtų 10 %). Su dažu ląstelės inkubuojamos 3 valandas 37 °C, 5 % CO₂, kol pasikeis AB spalva. Po inkubacijos, plokštelių skaitytuvu „FLUOstar Omega“ (BMG LABTECH, Vokietija) matuojamas fluorescencijos intensyvumas. Remiantis Longhin ir kitų (2022) protokole pateikta formule, apskaičiuojami galutiniai ląstelių gyvybingumo rezultatai.

Ląstelių gyvybingumas taip pat įvertintas panaudojant tripano mėlio dažų tirpalą. Tai metodas, paremtas plazminės membranos integralumu – gyvos ląstelės nenusidažo, nes turi nepažeistą membraną, o negyvos nusidažo mėlyna spalva, nes jų plazminė membrana yra pažeista (Strober, 2015). Gyvų ir negyvų ląstelių skaičiavimui naudotas Countess 3 automatinis ląstelių skaičiuotuvus (ThermoFisher Scientific, JAV). Po 24 val. inkubacijos, sena ląstelių mitybinė terpė nupilama, ląstelės praplaunamos PBS ir atkabinamos nuo flakono paviršiaus, panaudojant EDTA-tripsino mišinį (3 min., 37 °C, 5 % CO₂). Po atkabinimo, tripsinas neutralizuojamas šviežia mitybine terpe, ląstelės surenkamos į sterilius mėgintuvėlius ir centrifuguojamos 8 min. 1500 rpm. Viršnuosėdinis sluoksnis nupilamas, o likusios ląstelės suspenduojamos 1 ml PBS. Ant vienkartinio stiklelio lašinama 10 µl 0,4 % tripano mėlio ir skirtingomis nanodalelių koncentracijomis paveiktų ląstelių mišinys (1:1). Stiklelis įstatomas į ląstelių skaičiuotuvą ir stebimi rezultatai. Gaunama procentinė gyvų ir negyvų ląstelių išraiška.

2.6 Nanodalelių patekimo į ląstelę analizė

Nanodalelių patekimas į ląstelę įvertintas tėkmės citometru, analizuojant priekinės ir šoninės išsklaidytos šviesos (atitinkamai, angl. *forward scattering light* (FS) ir *side scattering light* (SSC)) intensyvumą, pagal (Toduka et al., 2012). Teigiama, kad FS intensyvumas nurodo ląstelės dydį, o SSC – ląstelės granuliuotumą, kurio pokyčiai be FS pokyčių, prilyginami nanodalelių patekimui į ląstelės vidų (Toduka et al., 2012).

Tyrimo metu, ląstelės buvo užsėjamos 12 šulinėlių plokštelėje, auginamos ir 24 valandas veikiamos skirtingomis PS-ND koncentracijomis, nurodytomis 2.4 skyriuje. Po poveikio, sena ląstelių mitybinė terpė nupilama, ląstelės praplaunamos PBS ir atkabinamos nuo flakono paviršiaus, panaudojant EDTA-tripsino mišinį (3 min., 37 °C, 5 % CO₂). Po atkabinimo, tripsinas neutralizuojamas šviežia mitybine terpe, ląstelės surenkamos į sterilius mėgintuvėlius ir centrifuguojamos 8 min. 1500 rpm. Viršnuosėdinis sluoksnis nupilamas, likę ląstelės suspenduojamos 1 ml PBS ir matuojamos tėkmės citometru „BD Bioscience FACS Canto II“ (Vokietija) VU Biomokslų institute, Biochemijos ir molekulinės biologijos katedroje, su docentės dr. Violetos Jonušienės pagalba.

2.7 Sukeliamų reaktyvių deguonies formų lygio įvertinimas

Reaktyvių deguonies formų (angl. *reactive oxygen species* – ROS) lygis buvo matuojamas tėkmės citometru, panaudojant ląstelėms pralaidų fluorogeninį dažą – 2',7'-dichlorofluoresceindiacetata (DCFDA). Šis dažas, patekęs į ląstelės vidų gali būti oksiduojamas įvairių viduląstelinių ROS iki fluorescuojančio 2',7'-dichlorofluoresceino (DCF).

ROS lygio analizei, ląstelės užsėtos 12 šulinėlių plokštelėje, auginamos ir 24 val. veikiamos skirtingomis nanodalelių koncentracijomis, nurodytomis 2.4 skyriuje. Po inkubacijos, sena terpė nupilama, ląstelės praplaunamos PBS ir atkabinamos nuo flakono paviršiaus, panaudojant EDTA-tripsino mišinį (3 min., 37 °C, 5 % CO₂). Tripsinas neutralizuojamas 1 ml ląstelių mitybinės terpės ir atkibusios ląstelės surenkamos į 1,5 ml Eppendorf mėgintuvėlius. Ląstelės centrifuguojamos 8 minutes, 1500 rpm. Viršnuosėdinis sluoksnis nusiurbiamas, o likusios ląstelės resuspenduojamos 500 µl DCFDA dažo tirpale ir inkubuojamos 30 minučių, 37 °C temperatūroje, 5 % CO₂. Po inkubacijos, ląstelės matuojamos tėkmės citometru VU Biomokslų institute, Biochemijos ir molekulinės biologijos katedroje, su docentės dr. Violetos Jonušienės pagalba.

2.8 Šarminis kometų metodas

Iš vakaro pasiruošiami objektiniai stikleliai ir reikalingi buferiai. Pirmiausiai, objektiniai stikleliai nuriebalinami ir merkami į 1 % normalios lydymosi temperatūros (angl. *normal melting point* – NMP) agarozės tirpalą. Ištraukus stiklėlį, apatinė pusė nuvaloma ir stiklis paliekamas džiūti horizontalioje padėtyje. Vėliau, ruošiami reikalingi buferiai – lizės, šarminis, neutralizacijos ir fermento reakcijos buferis (pastarasis naudojamas fermentine reakcija papildytame kometos metode (2.9 skyrius)). Buferių sudėtis ir paruošimo būdas nurodytas 2.2 lentelėje.

Polistireno nanodalelių genotoksiškumo tyrimo metu, HepG2 ląstelės užsėjamos 12 šulinėlių plokštelėje, auginamos ir 24 val. paveikiamos skirtingomis nanodalelių koncentracijomis, nurodytomis 2.4 skyriuje. Po inkubacijos, sena terpė nupilama, ląstelės praplaunamos PBS ir atkabinamos nuo flakono paviršiaus, panaudojant EDTA-tripsino mišinį (3 min., 37 °C, 5 % CO₂). Tripsinas neutralizuojamas šviežia ląstelių mitybine terpe ir atkibusios ląstelės surenkamos į 1,5 ml Eppendorf mėgintuvėlius. Ląstelės centrifuguojamos 8 minutes, 1500 rpm. Supernatantas nupilamas, o ląstelės resuspenduojamos 1 ml PBS. Ant stiklelių, iš vakaro padengtų NMP agaroze, sumaišoma 40 µl ląstelių, paveiktų tiriamąja medžiaga, su 40 µl 1 % žemos lydymosi temperatūros (angl. *low melting point* – LMP) agaroze. Mišinys uždengiamas dengiamuoju stikleliu ir šaldoma 4 °C temperatūroje 8 min. arba kol sukietės agarozė. Tuomet dengiamieji stikleliai atsargiai nuimami.

Nuėmus dengiamuosius stiklelius, preparatai patalpinami į vonelę, su atšaldytu (4 °C) lizės tirpalu ir laikomi šaldytuve 4 °C temperatūroje, 1,5 val. Vėliau objektiniai stikleliai patalpinami į elektroforezės kamerą (COMET-20, Scie Plas, JK) ir užpilami atšaldytu (4 °C) šarminiu tirpalu, kuriame laikomi 20 min., kad atsipalaiduotų šarmui jautrios vietos. Praėjus poveikio šarmu laikui, tame pačiame tirpale ir vonelėje, 30 minučių vykdoma elektroforezė (1,1 V/cm). Po elektroforezės, objektiniai stikleliai išimami iš elektroforezės vonelės ir patalpinami į neutralizacijos tirpalą ir jame laikomi 4 °C temperatūroje 30 min.

Praėjus neutralizacijos laikui, mėginiai 5 minutes, prieblandoje dažomi etidžio bromido tirpalu (20 µg/ml). Vėliau, preparatai 5 minutes plaunami distiliuotu vandeniu, uždengiami dengiamaisiais stikleliais ir laikomi tamsoje, 4 °C temperatūroje.

Preparatai analizuojami sekančią dieną, Nikon Eclipse 80i mikroskopu (Nikon, Japonija), vaizdą padidinus 400 kartų, naudojant 3 filtrą. Kometų analizei naudojama kompiuterinė vaizdų analizės programa LUCIA (Čekija). Analizuojama po 50 kometų iš kiekvieno gelio (kiekvienai nanodalelių koncentracijai po 2 gelius). Įvertinamas DNR kiekis kometos uodegoje bei kometos galvoje procentais.

2.9 Fermentine reakcija papildytas kometos metodas

Fermentais modifikuota kometų analizė buvo taikyta, siekiant aptikti specifines DNR pažaidas – oksiduotus purinus ir pirimidinus, taikant pažaidoms specifines endonukleazes, atitinkamai, formamido pirimidino DNR glikozilazę (Fpg) ir endonukleazę III (Endo III). Nuo šarminio metodo, fermentine reakcija papildyto kometos metodo eiga skiriasi vienu žingsniu – pasibaigus lizės etapui, stikleliai 3 kartus po 5 minutes plaunami fermento reakcijos buferiu (papildomas kontrolinis mėginys plaunamas atskirai fosfatiname buferyje). Tuomet, ant kiekvieno mėginio gelio lašinamas fermentas: po 100 µL Fpg (20 U/ml) arba Endo III (33,3 U/ml). Geliai uždengiami dengiamaisiais stikleliais ir patalpinami į padidintos drėgmės inkubatorių, 37 °C temperatūroje, esant 5 % CO₂ ir laikomi 30 minučių. Po inkubacijos su fermentais, dengiamieji stikleliai nuimami, mėginiai talpinami į elektroforezės vonelę ir toliau eksperimentas vyksta kaip aprašyta 2.8 skyriuje.

2.10 Statistinė duomenų analizė

Kometos metodu gauti rezultatai analizuoti naudojant Microsoft Excel (2019) XRealStats paketą. Statistinis duomenų reikšmingumas tarp dviejų grupių buvo vertinamas neparimetriniu Mann-Whitney *U* testu. Polistireno nanodalelėmis paveiktose ląstelėse susidaręs DNR pažaidų kiekis lygintas su neigiama kontrole, kurią sudarė tik ląstelės, o skirtumas laikytas reikšmingu, kai $\rho < 0,05$. Taip pat apskaičiuoti ir Pirsono koreliacijos koeficientai.

Analizuojant citotoksiškumo rezultatus gautus tripano mėlio testu, ląstelių paveiktų skirtingomis PS-ND koncentracijomis gyvybingumas lygintas su neigiama kontrole. Rezultatų patikimumas buvo vertinamas atliekant porinį t -testą.

3. REZULTATAI

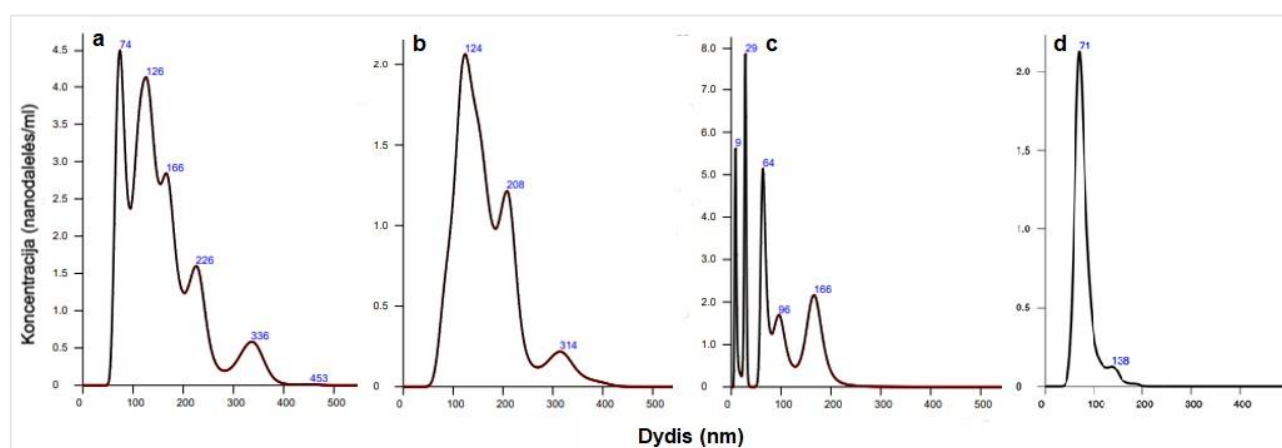
3.1 Polistireno (PS) nanodalelių charakterizavimas

Polistireno nanodalelių hidrodinaminis dydis ir aglomeracijos lygis įvertintas vandenyje, iškart po dalelių sonikavimo, ir ląstelių mitybinėje terpėje (DMEM) po 24 valandų inkubacijos. Šiam vertinimui pasitelktas dalelių sekimo analizės metodas (angl. *nanoparticle tracking analysis* – NTA), paremtas dalelių Brauno judėjimu. Matavimai atlikti NanoSight analizatoriumi.

Nanodalelių hidrodinaminis dydis vandenyje, iškart po sonikavimo, atitinka gamintojų (Spherotech^{Inc.}) nurodymus. Nustatytas vidutinis nanodalelių dydis yra 70,5 nm, kur didžiausią kiekį sudarė 71 nm dydžio nanodalelės (3.1 lentelė, 3.1 pav. d). Po ilgalaikės (24 val.) inkubacijos ląstelių mitybinėje terpėje (DMEM), nustatytas netolygus nanodalelių dydžio pasiskirstymas (3.1 pav. a-c). Trijų, nepriklausomų matavimų metu, nustatytas 153, 164,7 ir 96,2 nm vidutinis nanodalelių dydis DMEM terpėje (3.1 lentelė). Skirtumai gali būti paaiškinami didesnių nanodalelių aglomeratų nusėdimu į mėgintuvėlio dugną.

3.1 lentelė. Polistireno nanodalelių hidrodinaminio dydžio pasiskirstymas vandenyje (iškart po sonikavimo) ir ląstelių mitybinėje terpėje DMEM (24 val. po sonikavimo). SD – standartinis nuokrypis, įvertintas NTA programinės įrangos

Tirpalas	Laikas po sonikavimo	Didžiausias pikas, nm	Vidutinis dydis, nm (SD)
Dejonizuotas vanduo (H ₂ O)	0 val.	71	70,5 (22,4)
(I) DMEM + 10 % FBS	24 val.	74	153 (71,7)
(II) DMEM + 10 % FBS	24 val.	124	164,7 (61,8)
(III) DMEM + 10% FBS	24 val.	29	96,2 (59,3)



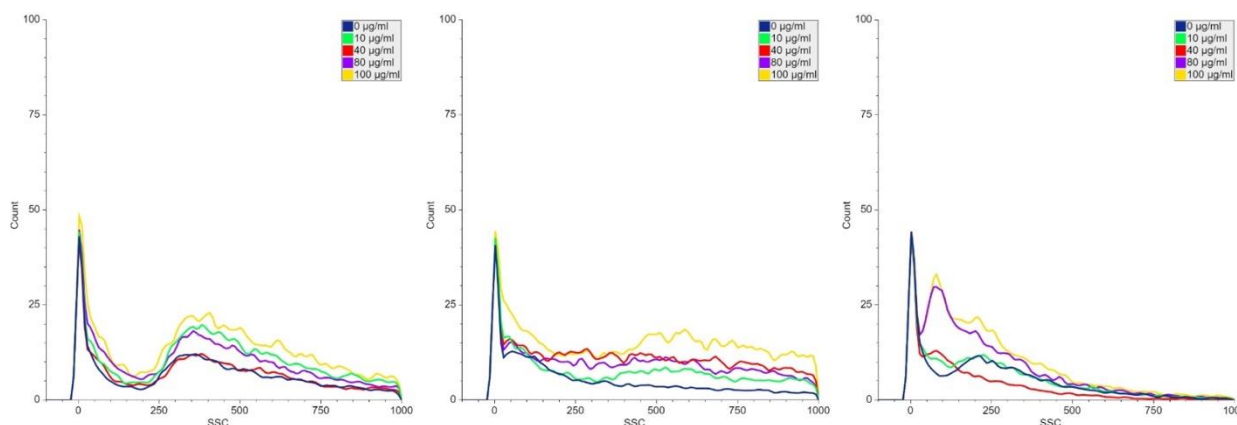
3.1 pav. Polistireno nanodalelių hidrodinaminio dydžio pasiskirstymas a-c) ląstelių mitybinėje terpėje DMEM, praėjus 24 valandoms po sonikavimo; d) vandenyje iškart po sonikavimo. Matavimai atlikti NanoSight analizatoriumi

Panaudojant dinaminį šviesos sklaidymo metodą (angl. *dynamic light scattering* – DLS), įvertintas nanodalelių tirpalo polidispersiškumo indeksas (Pdi) DMEM terpėje. Nustatyta, kad $Pdi = 0,862$, kas indikuoja, kad polistireno nanodalelių populiacija DMEM mitybinėje terpėje po 24 valandų inkubacijos yra nevienalytė, gali būti stebimas platus dydžių pasiskirstymas, kas ir buvo stebėta NTA matavimų metu.

3.2 Polistireno (PS) nanodalelių patekimo į ląstelę ir ROS lygio matavimai

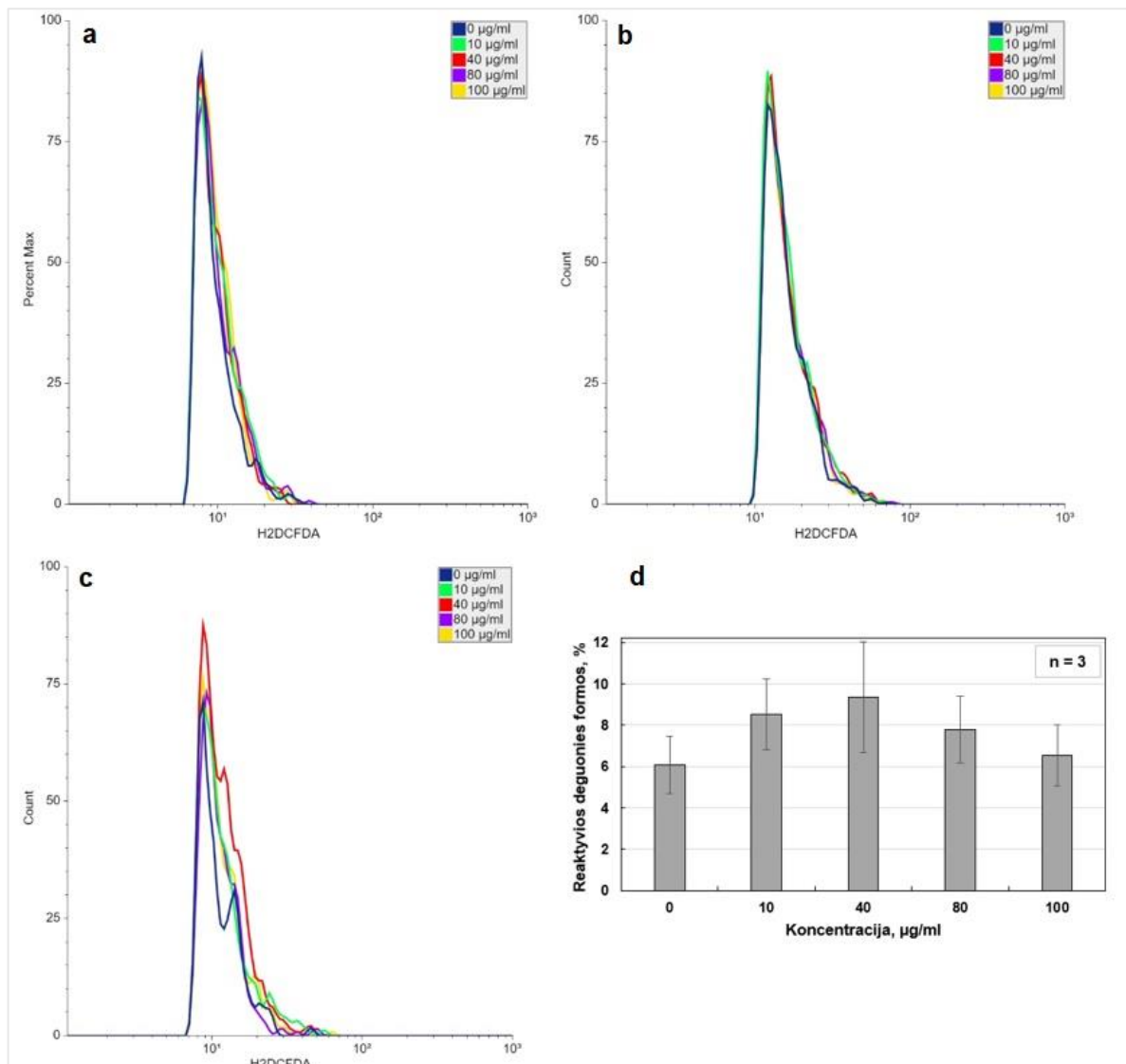
HepG2 ląstelės 24 valandas buvo veikiamos skirtingomis PS-ND koncentracijomis (10, 40, 80 ir 100 $\mu\text{g/ml}$) ir panaudojant tėkmės citometrijos metodą buvo įvertintas šių nanodalelių patekimas į ląsteles ir gebėjimas sukelti reaktyvias deguonies formas.

PS nanodalelių patekimo į ląstelę įvertinimo metu, matuojamas šoninės išsklaidytos šviesos (SSC) intensyvumas, kuris parodo ląstelių granuliuotumą. Visų atliktų matavimų atveju, ląstelėse paveiktose PS nanodalelių koncentracijomis matomas šoninės sklaidos signalo padidėjimas, lyginant su kontroliniu mėginiu, kas parodo, kad PS-ND gali efektyviai patekti į HepG2 ląsteles (3.2 pav.).



3.2 pav. Polistireno nanodalelių patekimo į ląstelę įvertinimas tėkmės citometrijos metodu. Trys nepriklausomi pakartojimai. SSC – šoninė išsklaidyta šviesa (angl. *side scattering light*)

Reaktyvių deguonies formų susidarymas buvo matuojamas naudojant 20 μM H_2DCFDA dažą. Pastebėta, kad dažo intensyvumas yra labiau išreikštas ląstelėse, paveiktose visomis tirtomis polistireno nanodalelių koncentracijomis, lyginant su neigiamą kontrole (3.3 pav. a-c).



3.3 pav. H2DCFDA dažo intensyvumas HepG2 ląstelėse, 24 valandas paveiktose polistireno nanodalelėmis. (a-c) ROS susidarymo histogramos (3 nepriklausomi matavimai), (d) Procentinė ROS susidarymo išraiška, pateikta vidurkių forma

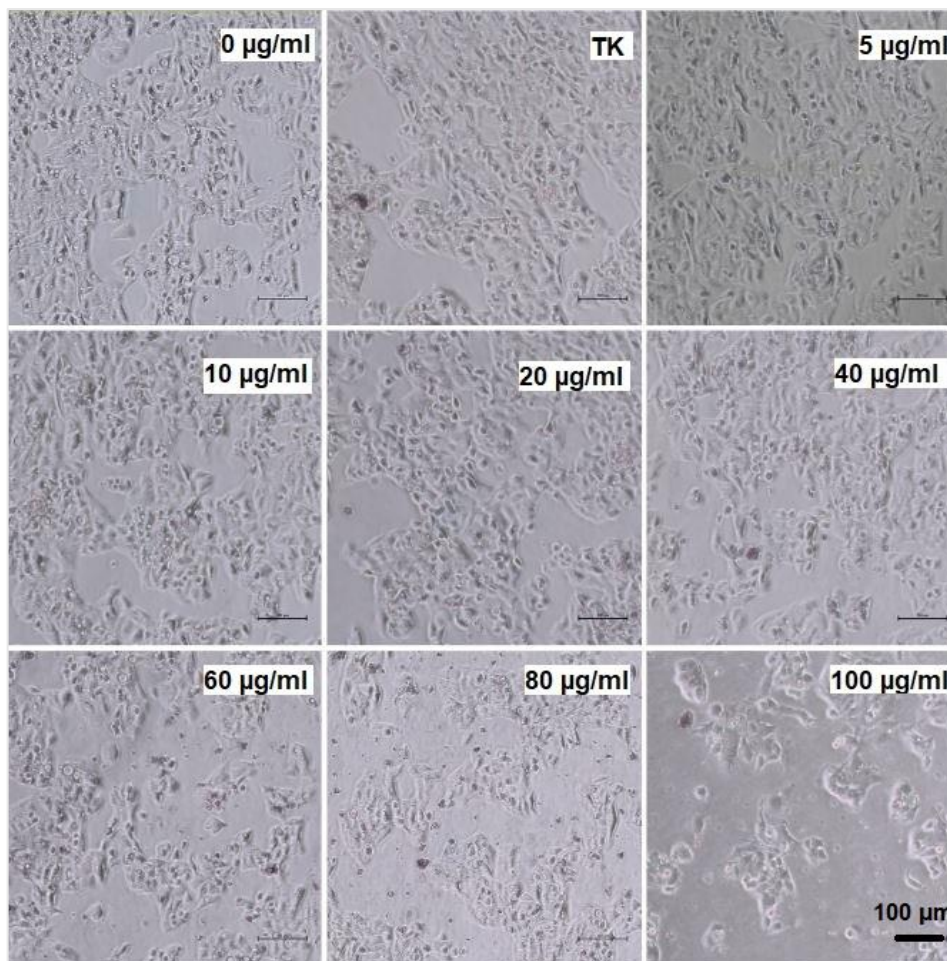
3.3 pav. d grafike matoma, kad didžiausias ROS lygis stebimas ląstelėse, paveiktose 10 ir 40 µg/ml ND koncentracijomis, kur ROS procentinė išraiška, atitinkamai, 8,52 % ir 9,36 %. Tuo tarpu, kontroliniame mėginyje ROS procentinė išraiška yra 6,07 % (žr. 1 priedą).

3.3 Polistireno (PS) nanodalelių citotoksiškumo tyrimo rezultatai

Remiantis rekomendacijomis, prieš kiekvieną nanodalelių genotoksiškumo tyrimą kometas metodu, turi būti įvertinamas tiriamosios medžiagos citotoksiškumas. Pirmiausiai, po 24 valandų poveikio PS-ND buvo vertinama ląstelių morfologija. Vėliau buvo naudojami du citotoksiškumo tyrimai – ląstelių metabolizmo efektyvumu (Alamar Blue – AB) ir ląstelės plazminės membranos integralumu (tripano mėlio testas) pagrįsti metodai.

3.4 paveiksle pavaizduotos HepG2 ląstelės po 24 valandų poveikio skirtingomis polistireno nanodalelių koncentracijomis ir vandenilio peroksidu (TK). Paveiksle matoma, kad be sumažėjusio

ląstelių kiekio didėjant PS-ND koncentracijai, taip pat stebimas nežymus ląstelių morfologinis pokytis ties didžiausia 100 µg/ml koncentracija (ląstelės nebėra tokios pailgos).



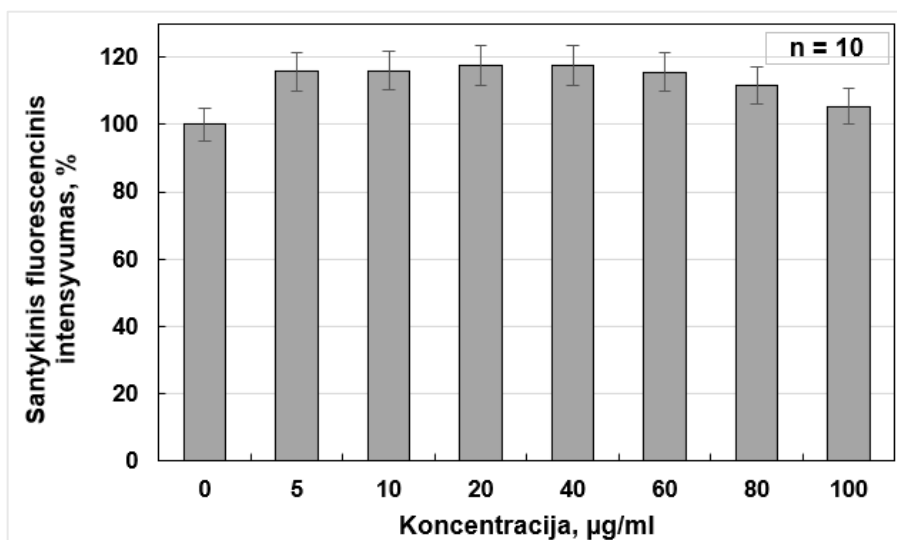
3.4 pav. HepG2 ląstelės po 24 valandų poveikio su skirtingomis PS-ND koncentracijomis. TK – teigiama kontrolė (100×)

Alamar Blue tyrimo rezultatai pateikti kaip santykinis fluorescencijos intensyvumas procentais (3.5 pav.). Analizuojant AB tyrimo metu gautus duomenis, rezultatai yra normalizuojami pagal neigiamą kontrolę, todėl jos santykinis fluorescencijos intensyvumas yra 100 %. Remiantis Loghin ir kt., (2022) protokolu, tiriamos nanodalelės yra citotoksiškos, kai:

1. Fluorescencijos intensyvumo signalas paveiktose ląstelėse yra sumažėjęs ne mažiau kaip 20 %, palyginti su neigiama kontrole;
2. Stebimas nuo koncentracijos priklausantis sumažėjęs intensyvumo signalas;
3. Rezultatai yra atkuriami, t.y. atlikti bent trys nepriklausomi eksperimentai, patvirtinantys rezultatus.

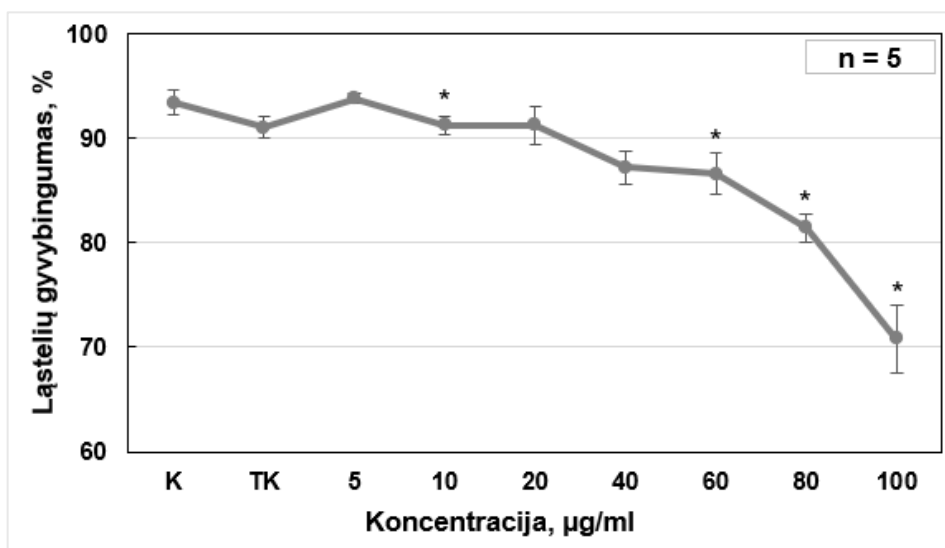
Nors 3.5 pav. matomas nuo koncentracijos priklausomas santykinio fluorescencinio signalo intensyvumo sumažėjimas, tačiau jis nėra sumažėjęs 20 % ar daugiau. Remiantis aukščiau

išvardintais kriterijais galima teigti, kad nei viena tirta polistireno nanodalelių koncentracija nėra citotoksiška HepG2 ląstelėse.



3.5 pav. Alamar Blue tyrimas su HepG2 ląstelėmis, paveiktomis skirtingomis PS nanodalelių koncentracijomis. Duomenys pateikti vidurkių forma

Ląstelių citotoksiškumo tyrimo rezultatai naudojant tripano mėlio tirpalą pateikti 3.6 paveiksle. Daugiau negu pusė tirtų polistireno nanodalelių koncentracijų statistiškai reikšmingai sumažino gyvybingų ląstelių skaičių (10, 60, 80 ir 100 µg/ml). Tačiau, nei viena tirta nanodalelių koncentracija nesumažino ląstelių gyvybingumo daugiau negu 40 %, todėl visos koncentracijos buvo naudojamos tolimesniuose genotoksiškumo tyrimuose (žr. 2 priedą) (Kohl et al., 2020).



3.6 pav. Gyvybingų ląstelių kiekis, HepG2 ląsteles paveikus skirtingomis PS nanodalelių koncentracijomis ir vandenilio peroksido (TK) tirpalu. Duomenys pateikti vidurkių forma. * $p < 0,05$, lyginant su kontrole

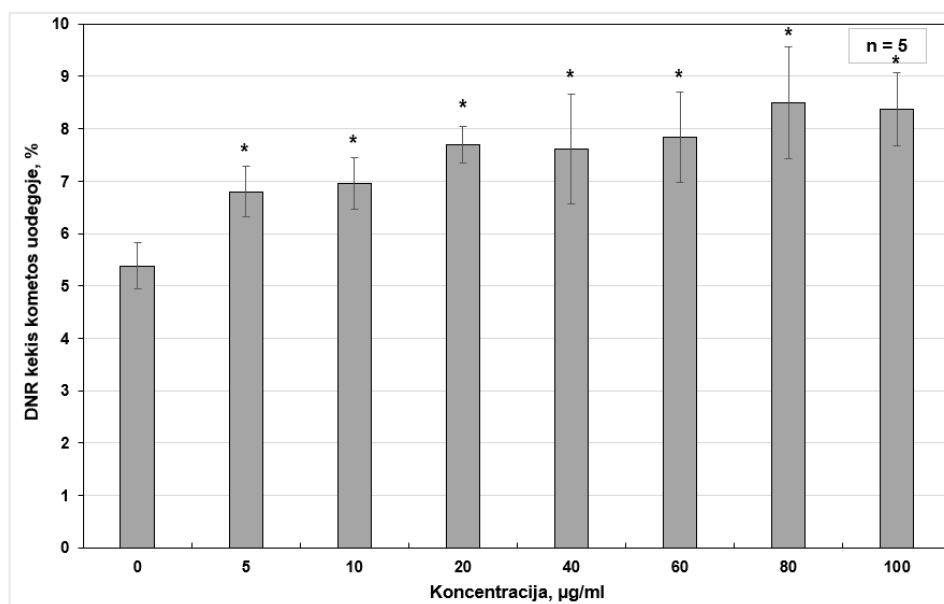
Įvertinus HepG2 ląstelių gyvybingumą po PS-ND poveikio skirtingomis koncentracijomis dviem metodais, statistiškai reikšmingas gyvybingumo sumažėjimas buvo stebimas tik tripano

mėlio testo rezultatuose. Tai gali būti dėl skirtingų dviejų dažų veikimo mechanizmo. AlamarBlue metodas leidžia nustatyti tik gyvų ląstelių medžiagų apykaitos aktyvumą, o tripano mėlis nudažo visas negyvas ląsteles, net ir tas, kurios vis dar gali būti šiek tiek metaboliškai aktyvios, todėl šiuo testu galima pervertinti negyvų ląstelių skaičių mėginyje (Damiani et al., 2019).

3.4 Polistireno (PS) nanodalelių genotoksiškumo įvertinimas šarminiu kometos metodu

Įvertinus ląstelių gyvybingumą, buvo tiriamas pirminių DNR pažeidimų, tokių kaip viengrandžiai, dvigrandžiai trūkiai, apurininės ir apirimidininės vietos, kiekis šarminiu kometos metodu.

Šarminio kometos tyrimo metu nustatyta, kad po 24 valandų poveikio, visos tirtos polistireno nanodalelių koncentracijos (5–100 $\mu\text{g/ml}$), sukėlė statistiškai reikšmingą ($p = 0,0001$) DNR pažeidimų kiekį HepG2 ląstelėse, lyginant su neigiama kontrole (3.7 pav.)



3.7 pav. DNR kiekis kometos uodegoje (%), HepG2 paveikus skirtingomis PS nanodalelių koncentracijomis. Duomenys pateikti kaip vidurkių reikšmės. Statistiškai reikšmingas DNR pažeidimų kiekis, lyginant su kontrole, žymimas žvaigždute

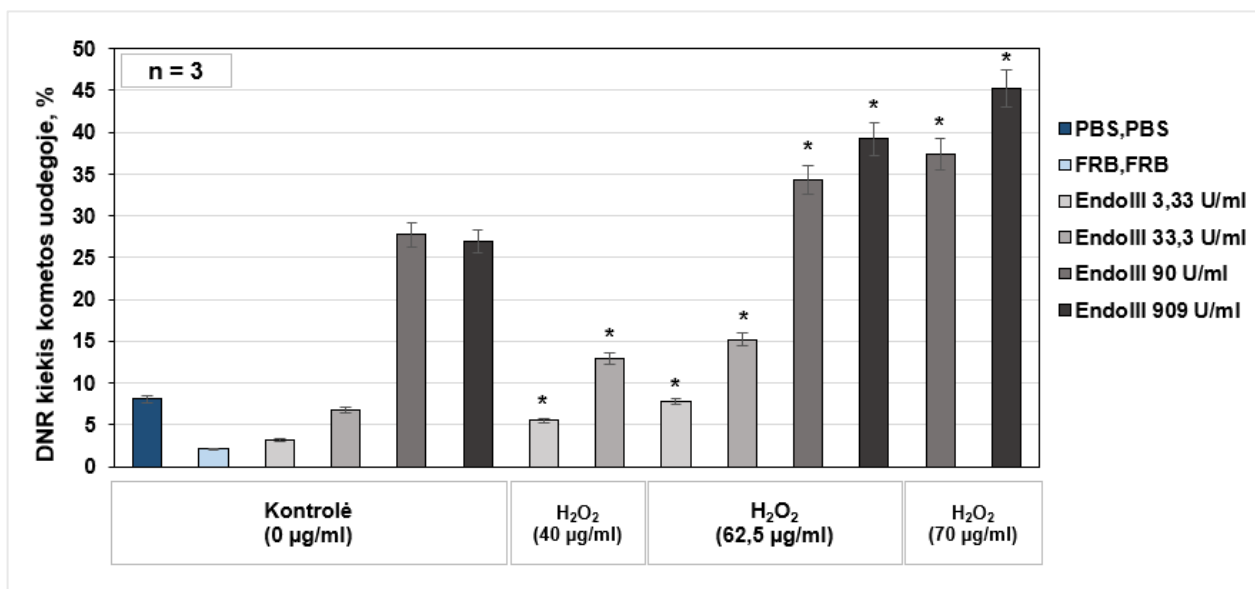
Apskaičiuota koreliacija (R) lygi 0,8383, rodo, kad yra stiprus tiesioginis ryšys tarp tiriamų polistireno nanodalelių koncentracijų ir DNR kiekio kometos uodegoje procentinės dalies ($p = 0,009$).

3.5 Polistireno (PS) nanodalelių genotoksiškumo įvertinimas fermentine reakcija papildytu kometos metodu

Siekiant padidinti metodo jautrumą buvo panaudoti fermentai. Oksidacinės DNR pažeidimos buvo matuojamos naudojant pažeidoms būdingas endonukleazes – endonukleazę III ir formamido

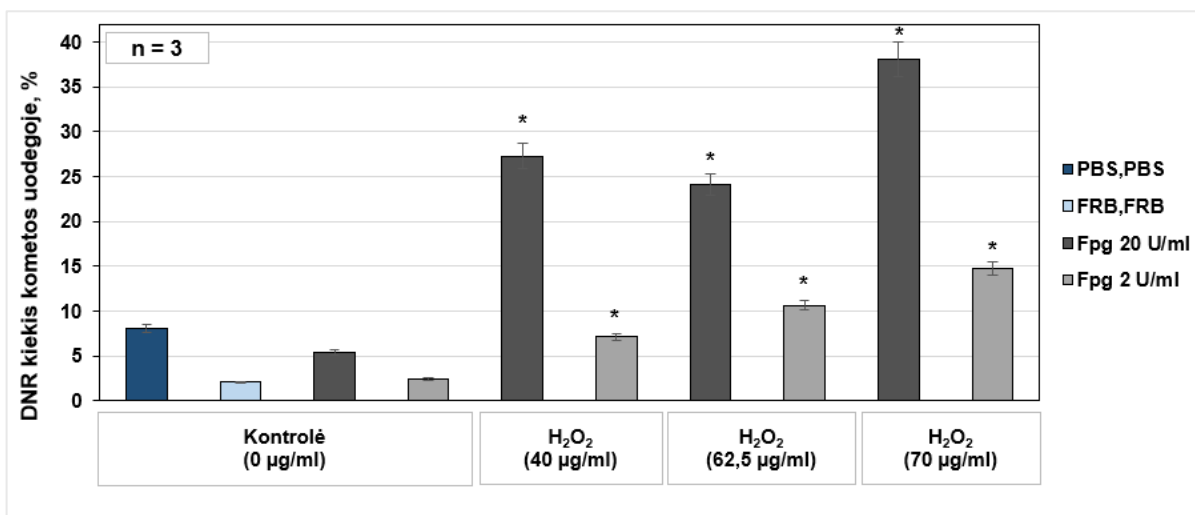
pirimidino DNR glikozilazę. Prieš vertinant nanodalelių gebėjimą sukelti oksidacines DNR pažeidas, pirmiausiai buvo įvertinta tinkama endonukleazių koncentracija.

HepG2 ląstelės 1 valandą buvo veikiamos skirtingomis vandenilio peroksido koncentracijomis (40, 62,5 ir 70 µg/ml). Endonukleazė III – leidžia aptikti oksiduotus pirimidinus, jos tikslingai koncentracijai nustatyti buvo naudojamos keturios koncentracijos (3,33, 33,3, 90 ir 909 U/ml) (3.8 pav.). Naudojant mažiausią, 3,33 U/ml koncentraciją, H₂O₂ sukeltų DNR pažeidų kiekis buvo statistiškai reikšmingas, tačiau nedaug skyrėsi nuo nepaveiktų, kontrolinių mėginių. Dėl to, ši fermento koncentracija nebuvo naudojama tolimesniuose tyrimuose. Priešingai, 90 ir 909 U/ml koncentracijos sukėlė itin didelį statistiškai patikimą DNR pažeidų kiekį ląstelėse, paveiktose H₂O₂. Kadangi kontroliniuose mėginiuose buvo sukeltos nespecifinės pažeidos, šios koncentracijos buvo atmestos ir tolimesniems tyrimams buvo naudojama 33,3 U/ml koncentracija, kuri nesukėlė reikšmingo kiekio nespecifinių pažeidų kontrolinėje grupėje, tačiau jautriai reagavo į didėjančią H₂O₂ koncentraciją.



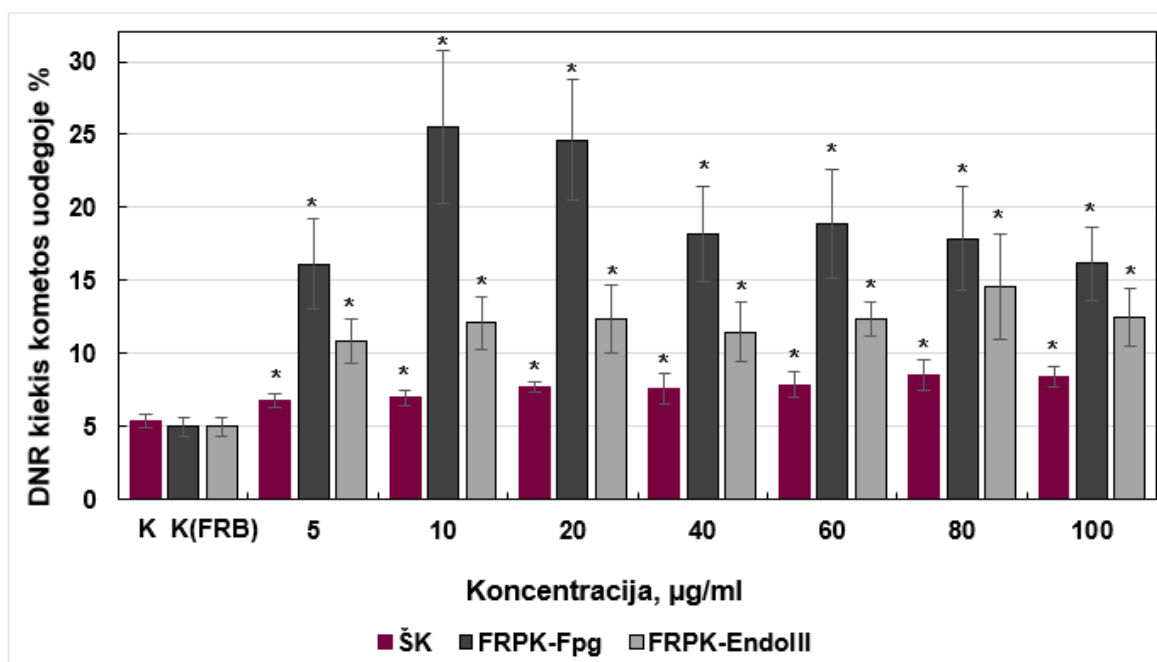
3.8 pav. Endonukleazės III (EndoIII) poveikis oksidacinėms DNR pažeidoms HepG2 ląstelėse, veikiamose skirtingos koncentracijos vandenilio peroksidu, atliekant fermento reakcija papildytą kometos metodą. Statistiškai reikšmingas DNR pažeidų kiekis, lyginant su kontrole, žymimas žvaigždute. PBS – fosfatinis buferis; FRB – fermento reakcijos buferis

Formamido pirimidino DNR glikozilazės (Fpg), aptinkančios oksiduotus purinus, koncentracijai nustatyti buvo tirtos dvi koncentracijos – 2 ir 20 U/ml (3.9 pav.). Abiem atvejais, fermentas kontrolinėje grupėje nesukėlė reikšmingo kiekio nespecifinių DNR pažeidų, bet ląstelėse paveiktose vandenilio peroksido koncentracijomis, susidarė statistiškai reikšmingas DNR pažeidų kiekis. Jautresnė oksiduotų purinų detekcija buvo stebima panaudojant 20 U/ml koncentraciją.



3.9 pav. Formamido pirimidino DNR glikozilazės (Fpg) poveikis oksidacinėms DNR pažeidimams HepG2 ląstelėse, veikiamose skirtingos koncentracijos vandenilio peroksidu, atliekant fermento reakcija papildytą kometos metodą. Statistiškai reikšmingas DNR pažeidimų kiekis, lyginant su kontrole, žymimas žvaigždute. PBS – fosfatinis buferis; FRB – fermento reakcijos buferis

Identifikavus optimalias fermentų koncentracijas, buvo tiriamos polistireno nanodalelių sukeltos specifinės DNR pažeidimos. Po 24 valandų poveikio skirtingomis polistireno nanodalelių koncentracijomis (5–100 µg/ml) buvo atliktas Fpg- ir EndoIII-papildytas kometos metodas. Fermentinėmis reakcijomis papildyto kometos tyrimo rezultatai pateikti 3.10 paveiksle. Visos tirtos nanodalelių koncentracijos (5–100 µg/ml) statistiškai reikšmingai padidino DNR kiekį kometos uodegoje ($\rho = 0,0001$), nepriklausomai nuo naudoto fermento.

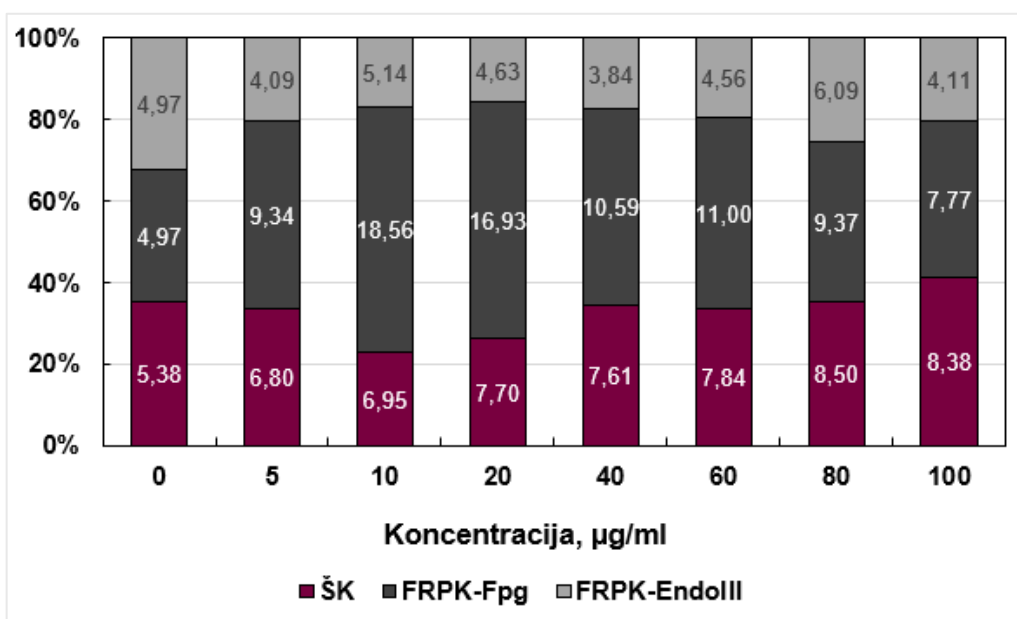


3.10 pav. DNR kiekis kometos uodegoje (%), HepG2 paveikus skirtingomis PS nanodalelių koncentracijomis. Duomenys pateikti kaip vidurkių reikšmės. Statistiškai reikšmingas DNR pažeidimų kiekis, lyginant su kontrole, žymimas žvaigždute. ŠK – šarminės kometos, FRPK–

Fpg – Fpg fermentu papildytas kometos metodas, FRPK–EndoIII – EndoIII fermentu papildytas kometos metodas

DNR pažaidų, oksiduotų purinų formoje, aptikta daugiau nei šarminių kometų metu, tiriant skirtingas polistireno nanodalelių koncentracijas (3.10 pav., tamsiai pilka spalva). Dvigubai didesnis oksiduotų purinų pažaidų kiekis lyginant su pirminėmis pažaidomis stebimas 10 ir 20 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijų atveju. Oksiduotų pirimidinų pažaidų kiekis visų koncentracijų atveju buvo nustatytas mažesnis lyginant su oksiduotų purinų pažaidų kiekiais (3.10 pav., šviesiai pilka spalva).

Apskaičiavus pirminių DNR pažaidų ir specifinių DNR bazių pažaidų santykį, nustatyta, kad oksiduotų purinų pažaidų sukelta daugiausiai (3.11 pav.).



3.11 pav. Pirminių DNR pažaidų ir specifinių DNR bazių pažaidų santykis. Duomenys pateikti kaip vidurkių reikšmės. FRPK–Fpg – Fpg fermentu papildytas kometos metodas; FRPK–EndoIII – EndoIII fermentu papildytas kometos metodas

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Šiame darbe buvo vertinamas polistireno nanodalelių (PS-ND) poveikis žmogaus hepatomos ląstelėms HepG2. Tyrimo metu buvo vertintas PS-ND gebėjimas patekti į ląsteles ir sukelti reaktyvių deguonies rūšių (ROS) formavimąsi, panaudojant tėkmės citometriją. Taip pat ištirtas galimas nanodalelių citotoksiškumas ir genotoksiškumas. Citotoksiškumui įvertinti pasirinkti AlamarBlue ir tripano mėlio testai, o genotoksiškumui – šarminis ir fermentinėmis reakcijomis papildytas kometos metodas.

Siekiant įvertinti polistireno nanodalelių patekimo lygį į HepG2 ląsteles, ląstelės 24 valandas buvo veiktos 10, 40, 80 ir 100 µg/ml PS-ND koncentracijomis ir panaudojant tėkmės citometrą įvertintas šoninės išsklaidytos šviesos intensyvumas. Ląstelėse paveiktose PS nanodalelių koncentracijomis šoninės sklaidos signalas buvo stebimas intensyvesnis, lyginant su kontroliniu mėginiu, o tai rodo PS-ND efektyvų patekimą į HepG2 ląsteles. Salvati su kolegomis (2018) tirdami fluorescuojančias 40 nm dydžio PS-ND (100 µg/ml) plaučių epitelio karcinomos ląstelėse A549, nustatė, kad ląstelės paveiktos nanodalelėmis taip pat pasižymėjo didesniu fluorescenciniu intensyvumu dėl nanodalelių pasisavinimo. Kiti tyrėjai, tokias pat ląsteles veikdami 80 nm nefunkcionalizuotomis, aminintomis ir karboksilintomis polistireno nanodalelėmis, nustatė, kad nepriklausomai nuo dalelių paviršiaus, paveiktose ląstelėse, stebimas intensyvesnis fluorescencijos signalas (Shi et al., 2022).

Reaktyvių deguonies rūšių formavimasis dėl susidariusių laisvųjų radikalų, gali sukelti DNR pažeidimus, ypač dvigrandinės DNR trūkius, todėl svarbu įvertinti jų susidarymo lygį prieš genotoksiškumo įvertinimą. Tyrimo metu nustatytas aukštesnis ROS lygis ląstelėse, veiktose nanodalelėmis, lyginant su neigiama kontrole. Didžiausias ROS lygis pastebėtas ląstelėse, veiktose 10 ir 40 µg/ml nanodalelių koncentracijomis (atitinkamai, 8,52 % ir 9,36 %). Tirdami panašaus dydžio (80 nm) PS-ND, Fan su kolegomis (2022) ištyrė, kad ilgalaikis PS-ND poveikis sukelia ROS perprodukciją (angl. *overproduction*) ir kepenų funkcijos pažeidimus pelėse. Poma ir kiti (2019) tirdami 100 nm dydžio PS-ND 5, 25 ir 75 µg/ml koncentracijas žmogaus odos fibroblastų ląstelių linijoje Hs27, nustatė, kad mažiausia, 5 µg/ml, koncentracija sukėlė reikšmingą ($p < 0,0005$) ROS lygio padidėjimą. Tyrime, kur HepG2 ląstelės buvo veikiamos 21,5±2,7 nm dydžio PS-ND 6,2, 12,5, 25 ir 50 µg/ml koncentracijomis, teigiama, kad visos tirtos koncentracijos ne tik sukėlė reaktyvių deguonies formų susidarymą, bet ir sumažino ląstelių gyvybingumą priklausomai nuo koncentracijos (Li et al., 2023), kas iš dalies atitinka ir mūsų tyrime gautus rezultatus. Polistireno nanodalelės ne tik sukelia reaktyvių deguonies formų susidarymą, bet ir slopina ląstelių augimą bei dauginimąsi.

Nanodalelių citotoksiškumas buvo įvertintas dviem testais – AlamarBlue ir panaudojant tripano mėlio dažus. Abiem metodais nustatyta, kad 70 nm dydžio polistireno nanodalelės nors ir sumažino ląstelių gyvybingumą, tačiau nebuvo citotoksiškos. Soto-Bielicka ir kitų (2024) darbe buvo tiriamos 40 nm dydžio PS-ND žmogaus storosios žarnos vėžio ląstelių linijos Caco-2 ir HT29-MTX ląstelėse, jas veikiant 0,1–200 µg/ml ND koncentracijomis. Tyrėjai, atlikę AlamarBlue testą nustatė, kad Caco-2 ląstelių gyvybingumas reikšmingai sumažėjo esant <100 µg/ml koncentracijai, o HT29-MTX – 125 µg/ml koncentracijai. Priešingai, Paget su kolegomis (2018) tyrė nefunkcionalizuotų PS-NF (51 nm), karboksilintų PS-COOH (48 nm) ir aminintų PS-NH₂ (52 nm) nanodalelių poveikį žmogaus epitelio ląstelėms Calu-3 ir THP-1 monocitinėms ląstelėms, ir nenustatė jokių reikšmingų gyvybingumo pokyčių tarp kontrolinių ir PS-NF arba PS-COOH paveiktų ląstelių. Tačiau, PS-NH₂ sukėlė nuo dozės priklausomą Calu-3 ir THP-1 ląstelių gyvybingumo mažėjimą. Analizuojant mūsų tyrimo metu AlamarBlue testu gautus rezultatus, reikšmingas poveikis ląstelių gyvybingumui nenustatytas (remiantis Longhin ir kiti (2022) kriterijais). Tai iš dalies atitinka kitų tyrėjų darbus, tačiau tiesioginio palyginimo daryti negalime, nes aukščiau paminėtuose tyrimuose buvo naudojamos skirtingos ląstelių linijos, kurios gali turėti skirtingą jautrumo lygį tiriamosioms nanodalelėms. Banerjee ir kolegos (2022) ištyrė HepG2 ląstelių, paveiktų skirtingų dydžių (50, 100, 200, 500, 1000 ir 5000 nm) nefunkcionalizuotomis, karboksilintomis ir aminintomis polistireno nanodalelėmis (0,1, 1, 10 ir 100 µg/ml), gyvybingumą. Aminintų PS-ND atveju, ląstelių gyvybingumas reikšmingai sumažėjo tik su 50 nm dydžio dalelių poveikiu. Karboksilintos ir nefunkcionalizuotos dalelės nepasižymėjo citotoksiškumu, visais tirtais koncentracijų ir dydžių atvejais. Kadangi mūsų darbe buvo naudojamos nefunkcionalizuotos polistireno nanodalelės, galime teigti, kad gauti rezultatai tiesiogiai atitinka Banerjee ir kolegų atlikto tyrimo rezultatus. Siekiant padidinti rezultatų patikimumą, papildomai atliktas ir membranos integralumu pagrįstas ląstelių gyvybingumo metodas. Analizuojant tripano mėlio testo rezultatus nustatytas statistiškai reikšmingas gyvybingumo sumažėjimas, tačiau citotoksiškumas neviršijo 40 %. Tyrime su odos fibroblastų linija Hs27 (Poma et al., 2019), ląstelių gyvybingumas taip pat vertintas tripano mėlio testu. Nustatyta, kad mažiausios koncentracijos neturėjo jokios įtakos ląstelių gyvybingumui, tačiau didžiausia 75 µg/ml PS-ND koncentracija gyvybingumą sumažino iki 50 %. Priešingai, kitų tyrėjų darbuose, kur ląstelių gyvybingumas buvo vertintas, panaudojant tripano mėlio dažų tirpalą, 50 nm dydžio PS-ND nesumažino ląstelių gyvybingumo daugiau nei 40 %, nepriklausomai nuo tiriamos ląstelių linijos (Rubio et al., 2020, Hu & Palic, 2020, Sarma et al., 2022).

Polistireno nanodalelių gebėjimas indukuoti pirmines DNR pažaidas (DNR trūkia ir šarmui jautrios vietos) buvo įvertintas šarminiu kometos metodu, o oksidacinių pažaidų lygis nustatytas Fpg ir EndoIII reakcijomis papildytu kometos metodu. Tyrimo metu nustatyta, kad po 24 valandų

inkubacijos, visos tirtos nanodalelių koncentracijos reikšmingai padidino pirminių ir oksidacinių DNR pažeidimų kiekį, kur didžiausią pažeidimų dalį sudarė oksiduoti purinai. Rubio ir kolegoms (2020) tyrė PS-ND genotoksiškumą šarminiu ir Fpg papildytu kometos metodu Raji-B ir TK6 ląstelėse. Reikšmingas pirminių DNR pažeidimų kiekis nustatytas Raji-B ląsteles veikiant 25 ir 50 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijų atveju, o oksidacinių – 50 $\mu\text{g/ml}$. Priešingai, TK6 ląstelių, veikiamų PS-ND, DNR kiekis kometos uodegoje nesiskyrė nuo kontrolinių ląstelių, tačiau oksidacinių pažeidimų kiekio padidėjimas fiksuotas visų tirtų koncentracijų atveju, kas atitinka ir mūsų tyrime gautus rezultatus. Panašų oksidacinių DNR pažeidimų susidarymą nustatė ir Corter su kolegomis (2020), tirdami Caco-2 ląsteles paveikus 0, 25, 50, 100, 125, 150, 175 ir 200 $\mu\text{g/ml}$ PS-ND (50 nm) koncentracijomis. Atlikus Fpg fermentu papildytą kometos metodą, buvo stebimas didesnis pažeidimų kiekis lyginant su šarminiu kometos tyrimu. Taip pat nustatyta ir tiesioginė poveikio priklausomybė nuo tirtos koncentracijos. Malinowska su kolegomis (2022) tyrė 29, 44 ir 72 nm PS-ND genotoksiškumą žmogaus periferinio kraujo limfocituose. Beveik visos tirtos ND koncentracijos sukėlė statistiškai reikšmingą pirminių DNR pažeidimų kiekio padidėjimą, nepriklausomai nuo ND dydžio. Taip pat nustatyta, kad visos tirtos nanodalelės sukėlė daugiau oksiduotų purinų (fermentinė reakcija su Fpg) nei oksiduotų pirimidinų (fermentinė reakcija EndoIII). Mūsų tyrimo rezultatai atitinka šių tyrėjų darbo metu gautus rezultatus, nes oksiduotų purinų mūsų tyrimo atveju taip pat susidarė daugiau nei oksiduotų pirimidinų, o rezultatų patikimumas taip pat įvertintas kaip reikšmingas. Ferraro ir kitų (2016) tyrime, kur HeLa linijos ląstelės paveiktos 24 nm dydžio 10, 50 ir 100 $\mu\text{g/ml}$ polistireno nanodalelių koncentracijomis, gauti priešingi rezultatai. Mažiausia tirta koncentracija lyginant su kontrole nesukėlė DNR pažeidimų, kai 50 ir 100 $\mu\text{g/ml}$ koncentracijos sukėlė mažą pažeidimų lygį, tačiau statistiškai nereikšmingą. Panašios PS-ND koncentracijos (0, 1, 10, 25, 50 ir 100 $\mu\text{g/ml}$) tirtos dar viename darbe, kur ~70 nm PS-ND poveikis buvo matuojamas limfocituose, monocituose ir granulocituose. Tirtos PS-ND koncentracijos limfocituose, DNR pažeidimų nesukėlė, o tuo tarpu monocituose, nustatytas statistiškai reikšmingas DNR kiekio kometos uodegoje padidėjimas ties 100 $\mu\text{g/ml}$ koncentracija. Granulocituose procentinis DNR pažeidimų kiekis statistiškai reikšmingai padidėjo visų tirtų koncentracijų atvejais (Ballesteros et al., 2020). Mūsų darbe gauti rezultatai iš dalies skiriasi nuo kitų autorių gautų rezultatų. Tačiau svarbu pabrėžti, kad šie skirtumai gali būti susiję su skirtingomis darbuose naudojamomis ląstelių linijomis, nanodalelių dydžiais ir koncentracijomis.

Apibendrinant, šiame darbe nustatyta, kad 70 nm polistireno nanodalelių koncentracijos sumažino HepG2 ląstelių gyvybingumą, tačiau nepasiekė kritinės 60 % gyvybingumo ribos, todėl padaryta išvada, kad šios nanodalelės nėra citotoksiškos HepG2 ląstelėse. Atlikus genotoksiškumo tyrimus šarminės kometos metodu, nustatyta, kad visos tirtos koncentracijos 5–100 $\mu\text{g/ml}$ statistiškai reikšmingai padidino DNR kiekį kometos uodegoje. Papildžius kometos metodą Fpg ir

EndoIII fermentais, pastebėta, kad visos tirtos PS-ND koncentracijos statistiškai reikšmingai indukavo oksiduotų purinų ir pirimidinų susidarymą. Lyginant su kitais autoriais, prieštaringi rezultatai gali būti dėl tyrimams naudojamų skirtingų ląstelių linijų, kurios gali turėti skirtingą genetinį foną (angl. *genetic background*) ir turėti įtakos DNR pažeidimų lygiams (Zheng et al., 2023).

IŠVADOS

1. Polistireno nanodalelės efektyviai patenka į HepG2 ląsteles.
2. Reaktyvių deguonies formų susidarymas stebėtas visų tirtų koncentracijų atveju (10, 40, 80 ir 100 $\mu\text{g/ml}$). Didžiausia reaktyvių deguonies formų procentinė išraiška buvo stebėta 40 $\mu\text{g/ml}$ koncentracija paveiktose ląstelėse (9,36 %).
3. Tirtos PS nanodalelių koncentracijos (5–100 $\mu\text{g/ml}$) nesukėlė citotoksinio poveikio HepG2 ląstelėms.
4. Visos tirtos PS nanodalelių koncentracijos (5–100 $\mu\text{g/ml}$) indukavo statistiškai reikšmingą pirminių ir oksidacinių DNR pažeidimų kiekį HepG2 ląstelėse.
5. Didžiausią DNR pažeidimų dalį sudarė oksiduoti purinai.

ASMENINIO INDĖLIO APRAŠYMAS

Tyrimo metu atlikau visus laboratorinius darbus, išskyrus nanodalelių hidrodinaminio dydžio analizę ir tĕkmės citometrijos matavimus, tačiau gautus duomenis analizavau pati. Atlikau tyrimo metu gautų rezultatų statistinę analizę bei prisidėjau prie darbo tikslo, tyrimo plano ir išvadų formulavimo.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju savo darbo vadovei Mildai Babonaitei už motyvaciją ir palaikymą ruošiant šį darbą, nuolatinį skatinimą tobulėti ir sukurta pozityvią aplinką darbų metu. Taip pat dėkoju Andriui Burduliui už atliktą nanodalelių charakterizavimą ir docentei dr. Violetai Jonušienei už pagalbą atliekant matavimus tĕkmĕs citometru.

Baigiamasis darbas dalinai finansuotas Lietuvos mokslo tarybos skirtomis lĕšomis studentų tyrimams semestrų metu. Projekto Nr. P-ST-23-142.

LITERATŪROS ŠALTINIAI

- Adeniyi, A. G., Abdulkareem, S. A., Ighalo, J. O., Onifade, D. V., Adeoye, S. A., & Sampson, A. E. (2022). Morphological and thermal properties of polystyrene composite reinforced with biochar from elephant grass (*pennisetum purpureum*). *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, 35(10), 1532–1547. <https://doi.org/10.1177/0892705720939169>
- Alaraby, M., Abass, D., Domenech, J., Hernández, A., & Marcos, R. (2022). Hazard assessment of ingested polystyrene nanoplastics in *Drosophila* larvae. *Environmental Science: Nano*, 9(5), 1845–1857. <https://doi.org/10.1039/D1EN01199E>
- Alzaben, M., Burve, R., Loeschner, K., Møller, P., & Roursgaard, M. (2023). Nanoplastics from ground polyethylene terephthalate food containers: Genotoxicity in human lung epithelial A549 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 892, 503705. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2023.503705>
- Augustine, R., Hasan, A., Primavera, R., Wilson, R. J., Thakor, A. S., & Kevadiya, B. D. (2020). Cellular uptake and retention of nanoparticles: Insights on particle properties and interaction with cellular components. *Materials Today Communications*, 25, 101692. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101692>
- Awashra, M., & Młynarz, P. (2023). The toxicity of nanoparticles and their interaction with cells: An in vitro metabolomic perspective. *Nanoscale Advances*, 5(10), 2674–2723. <https://doi.org/10.1039/D2NA00534D>
- Ballesteros, S., Domenech, J., Barguilla, I., Cortés, C., Marcos, R., & Hernández, A. (2020). Genotoxic and immunomodulatory effects in human white blood cells after ex vivo exposure to polystyrene nanoplastics. *Environmental Science: Nano*, 7(11), 3431–3446. <https://doi.org/10.1039/D0EN00748J>
- Banerjee, A., Billey, L. O., McGarvey, A. M., & Shelver, W. L. (2022). Effects of polystyrene micro/nanoplastics on liver cells based on particle size, surface functionalization, concentration and exposure period. *Science of The Total Environment*, 836, 155621. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155621>
- Barabadi, H., Najafi, M., Samadian, H., Azarnezhad, A., Vahidi, H., Mahjoub, M., Koohiyan, M., & Ahmadi, A. (2019). A systematic review of the genotoxicity and antigenotoxicity of biologically synthesized metallic nanomaterials: Are green nanoparticles safe enough for clinical marketing? *Medicina*, 55(8), 439. <https://doi.org/10.3390/medicina55080439>

- Bhat, M. A., Gedik, K., & Gaga, E. O. (2023). Atmospheric micro (Nano) plastics: Future growing concerns for human health. *Air Quality, Atmosphere & Health*, 16(2), 233–262. <https://doi.org/10.1007/s11869-022-01272-2>
- Bher, A., Mayekar, P. C., Auras, R. A., & Schvezov, C. E. (2022). Biodegradation of biodegradable polymers in mesophilic aerobic environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), 12165. <https://doi.org/10.3390/ijms232012165>
- Busch, M., Bredeck, G., Kämpfer, A. A. M., & Schins, R. P. F. (2021). Investigations of acute effects of polystyrene and polyvinyl chloride micro- and nanoplastics in an advanced in vitro triple culture model of the healthy and inflamed intestine. *Environmental Research*, 193, 110536. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110536>
- Cannan, W. J., & Pederson, D. S. (2016). Mechanisms and consequences of double-strand dna break formation in chromatin. *Journal of Cellular Physiology*, 231(1), 3–14. <https://doi.org/10.1002/jcp.25048>
- Cortés, C., Domenech, J., Salazar, M., Pastor, S., Marcos, R., & Hernández, A. (2020). Nanoplastics as a potential environmental health factor: Effects of polystyrene nanoparticles on human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Environmental Science: Nano*, 7(1), 272–285. <https://doi.org/10.1039/C9EN00523D>
- Costa, S., Pires, J., & Teixeira-Gomes, A. (2024). Comet assay. *Encyclopedia of Toxicology* (p. 183–190). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824315-2.01072-1>
- Damiani, E., Solorio, J. A., Doyle, A. P., & Wallace, H. M. (2019). How reliable are in vitro IC50 values? Values vary with cytotoxicity assays in human glioblastoma cells. *Toxicology Letters*, 302, 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.12.004>
- Domenech, J., De Britto, M., Velázquez, A., Pastor, S., Hernández, A., Marcos, R., & Cortés, C. (2021). Long-term effects of polystyrene nanoplastics in human intestinal caco-2 cells. *Biomolecules*, 11(10), 1442. <https://doi.org/10.3390/biom11101442>
- Elespuru, R., Pfuhler, S., Aardema, M. J., Chen, T., Doak, S. H., Doherty, A., Farabaugh, C. S., Kenny, J., Manjanatha, M., Mahadevan, B., Moore, M. M., Ouédraogo, G., Stankowski, L. F., & Tanir, J. Y. (2018). Genotoxicity assessment of nanomaterials: Recommendations on best practices, assays, and methods. *Toxicological Sciences*, 164(2), 391–416. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy100>
- European Environment Agency. (2021). Plastics, the circular economy and Europe’s environment: A priority for action. *Publications Office*. <https://data.europa.eu/doi/10.2800/5847>

- Fan, X., Wei, X., Hu, H., Zhang, B., Yang, D., Du, H., Zhu, R., Sun, X., Oh, Y., & Gu, N. (2022). Effects of oral administration of polystyrene nanoplastics on plasma glucose metabolism in mice. *Chemosphere*, 288, 132607. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132607>
- Ferraro, D., Anselmi-Tamburini, U., Tredici, I. G., Ricci, V., & Sommi, P. (2016). Overestimation of nanoparticles-induced DNA damage determined by the comet assay. *Nanotoxicology*, 10(7), 861–870. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1130274>
- Fiorentino, I., Gualtieri, R., Barbato, V., Mollo, V., Braun, S., Angrisani, A., Turano, M., Furia, M., Netti, P. A., Guarnieri, D., Fusco, S., & Talevi, R. (2015). Energy independent uptake and release of polystyrene nanoparticles in primary mammalian cell cultures. *Experimental Cell Research*, 330(2), 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.09.017>
- Friedman, N., Dagan, A., Elia, J., Merims, S., & Benny, O. (2021). Physical properties of gold nanoparticles affect skin penetration via hair follicles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 36, 102414. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102414>
- Gaidhani, A., Tribe, L., & Charpentier, P. (2023). Polystyrene carbon composite foam with enhanced insulation and fire retardancy for a sustainable future: Critical review. *Journal of Cellular Plastics*, 59(5–6), 419–453. <https://doi.org/10.1177/0021955X231215753>
- Geremia, E., Muscari Tomajoli, M. T., Murano, C., Petito, A., & Fasciolo, G. (2023). The impact of micro- and nanoplastics on aquatic organisms: Mechanisms of oxidative stress and implications for human health—a review. *Environments*, 10(9), 161. <https://doi.org/10.3390/environments10090161>
- Ghosh, S., Sinha, J. K., Ghosh, S., Vashisth, K., Han, S., & Bhaskar, R. (2023). Microplastics as an emerging threat to the global environment and human health. *Sustainability*, 15(14), 10821. <https://doi.org/10.3390/su151410821>
- Giorgetti, L., Spanò, C., Muccifora, S., Bottega, S., Barbieri, F., Bellani, L., & Ruffini Castiglione, M. (2020). Exploring the interaction between polystyrene nanoplastics and *Allium cepa* during germination: Internalization in root cells, induction of toxicity and oxidative stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 149, 170–177. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.02.014>
- Grote, K., Brüstle, F., & Vlacil, A.-K. (2023). Cellular and systemic effects of micro- and nanoplastics in mammals—What we know so far. *Materials*, 16(8), 3123. <https://doi.org/10.3390/ma16083123>
- Halimu, G., Zhang, Q., Liu, L., Zhang, Z., Wang, X., Gu, W., Zhang, B., Dai, Y., Zhang, H., Zhang, C., & Xu, M. (2022). Toxic effects of nanoplastics with different sizes and surface charges on

- epithelial-to-mesenchymal transition in A549 cells and the potential toxicological mechanism. *Journal of Hazardous Materials*, 430, 128485.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128485>
- Ho, B. T., Roberts, T. K., & Lucas, S. (2018). An overview on biodegradation of polystyrene and modified polystyrene: The microbial approach. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(2), 308–320. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1355293>
- Hu, M., & Palić, D. (2020). Role of MicroRNAs in regulation of DNA damage in monocytes exposed to polystyrene and TiO₂ nanoparticles. *Toxicology Reports*, 7, 743–751.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.05.007>
- Yang, Y., Muhich, C. L., & Green, M. D. (2020). Kinetics and mechanisms of polycondensation reactions between aryl halides and bisphenol A. *Polymer Chemistry*, 11(31), 5078–5087.
<https://doi.org/10.1039/D0PY00740D>
- Yang, S., Zhang, T., Ge, Y., Yin, L., Pu, Y., & Liang, G. (2024). Inhalation exposure to polystyrene nanoplastics induces chronic obstructive pulmonary disease-like lung injury in mice through multi-dimensional assessment. *Environmental Pollution*, 347, 123633.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123633>
- Yee, M. S.-L., Hii, L.-W., Looi, C. K., Lim, W.-M., Wong, S.-F., Kok, Y.-Y., Tan, B.-K., Wong, C.-Y., & Leong, C.-O. (2021). Impact of microplastics and nanoplastics on human health. *Nanomaterials*, 11(2), 496. <https://doi.org/10.3390/nano11020496>
- Yousif, E., & Haddad, R. (2013). Photodegradation and photostabilization of polymers, especially polystyrene: Review. *SpringerPlus*, 2(1), 398. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-398>
- Isidoro, C., Maneerat, E., Giovia, A., Follo Carlo, & Caputo, G. (2012). Biocompatibility, endocytosis, and intracellular trafficking of mesoporous silica and polystyrene nanoparticles in ovarian cancer cells: Effects of size and surface charge groups. *International Journal of Nanomedicine*, 4147. <https://doi.org/10.2147/IJN.S33803>
- Jeong, H., Kim, W., Choi, D., Heo, J., Han, U., Jung, S. Y., Park, H. H., Hong, S.-T., Park, J. H., & Hong, J. (2022). Potential threats of nanoplastic accumulation in human induced pluripotent stem cells. *Chemical Engineering Journal*, 427, 131841.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.131841>
- Jiang, X., Chen, H., Liao, Y., Ye, Z., Li, M., & Klobučar, G. (2019). Ecotoxicity and genotoxicity of polystyrene microplastics on higher plant *Vicia faba*. *Environmental Pollution*, 250, 831–838.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.055>

- Kantha, P., Liu, S.-T., Horng, J.-L., & Lin, L.-Y. (2022). Acute exposure to polystyrene nanoplastics impairs skin cells and ion regulation in zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, 248, 106203. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106203>
- Karbaschi, M., Ji, Y., Abdulwahed, A. M. S., Alohal, A., Bedoya, J. F., Burke, S. L., Boulos, T. M., Tempest, H. G., & Cooke, M. S. (2019). Evaluation of the major steps in the conventional protocol for the alkaline comet assay. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 6072. <https://doi.org/10.3390/ijms20236072>
- Khan, A., & Jia, Z. (2023). Recent insights into uptake, toxicity, and molecular targets of microplastics and nanoplastics relevant to human health impacts. *iScience*, 26(2), 106061. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2023.106061>
- Kibria, Md. G., Masuk, N. I., Safayet, R., Nguyen, H. Q., & Mourshed, M. (2023). Plastic waste: Challenges and opportunities to mitigate pollution and effective management. *International Journal of Environmental Research*, 17(1), 20. <https://doi.org/10.1007/s41742-023-00507-z>
- Kik, K., Bukowska, B., & Sicińska, P. (2020a). Polystyrene nanoparticles: Sources, occurrence in the environment, distribution in tissues, accumulation and toxicity to various organisms. *Environmental Pollution*, 262, 114297. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114297>
- Kohl, Y., Rundén-Pran, E., Mariussen, E., Hesler, M., El Yamani, N., Longhin, E. M., & Dusinska, M. (2020). Genotoxicity of nanomaterials: Advanced in vitro models and high throughput methods for human hazard assessment—a review. *Nanomaterials*, 10(10), 1911. <https://doi.org/10.3390/nano10101911>
- Laskar, N., & Kumar, U. (2019). Plastics and microplastics: A threat to environment. *Environmental Technology & Innovation*, 14, 100352. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100352>
- Li, Y., Guo, M., Niu, S., Shang, M., Chang, X., Sun, Z., Zhang, R., Shen, X., & Xue, Y. (2023). ROS and DRP1 interactions accelerate the mitochondrial injury induced by polystyrene nanoplastics in human liver HepG2 cells. *Chemico-Biological Interactions*, 379, 110502. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2023.110502>
- Li, M., Pan, Y., Hou, Z., Wu, Z., Zeng, Z., & Wang, B. (2023). Plastic or plastic-free life: From formation to removal. *Science of The Total Environment*, 890, 164359. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164359>
- Lin, Y., Kouznetsova, T. B., Chang, C.-C., & Craig, S. L. (2020). Enhanced polymer mechanical degradation through mechanochemically unveiled lactonization. *Nature Communications*, 11(1), 4987. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18809-7>

- Lin, S., Zhang, H., Wang, C., Su, X.-L., Song, Y., Wu, P., Yang, Z., Wong, M.-H., Cai, Z., & Zheng, C. (2022). Metabolomics reveal nanoplastic-induced mitochondrial damage in human liver and lung cells. *Environmental Science & Technology*, 56(17), 12483–12493.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.2c03980>
- Liu, Y.-Y., Liu, J., Wu, H., Zhang, Q., Tang, X.-R., Li, D., Li, C.-S., Liu, Y., Cao, A., & Wang, H. (2022). Endocytosis, distribution, and exocytosis of polystyrene nanoparticles in human lung cells. *Nanomaterials*, 13(1), 84. <https://doi.org/10.3390/nano13010084>
- Liu, L., Liu, B., Zhang, B., Ye, Y., & Jiang, W. (2022). Polystyrene micro(Nano)plastics damage the organelles of RBL-2H3 cells and promote MOAP-1 to induce apoptosis. *Journal of Hazardous Materials*, 438, 129550. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129550>
- Longhin, E. M., El Yamani, N., Rundén-Pran, E., & Dusinska, M. (2022). The alamar blue assay in the context of safety testing of nanomaterials. *Frontiers in Toxicology*, 4, 981701.
<https://doi.org/10.3389/ftox.2022.981701>
- Lu, X., Zhu, T., Chen, C., & Liu, Y. (2014). Right or left: The role of nanoparticles in pulmonary diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 17577–17600.
<https://doi.org/10.3390/ijms151017577>
- Lundquist, P., & Artursson, P. (2016). Oral absorption of peptides and nanoparticles across the human intestine: Opportunities, limitations and studies in human tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 106, 256–276. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.07.007>
- Malinowska, K., Bukowska, B., Piwoński, I., Foksiński, M., Kisielewska, A., Zarakowska, E., Gackowski, D., & Sicińska, P. (2022). Polystyrene nanoparticles: The mechanism of their genotoxicity in human peripheral blood mononuclear cells. *Nanotoxicology*, 16(6–8), 791–811.
<https://doi.org/10.1080/17435390.2022.2149360>
- Mandal, M., Roy, A., Popek, R., & Sarkar, A. (2024). Micro- and nano- plastic degradation by bacterial enzymes: A solution to „white pollution“. *The Microbe*, 100072.
<https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100072>
- Manickam, V., Velusamy, R. K., Lochana, R., Amiti, Rajendran, B., & Tamizhselvi, R. (2017). Applications and genotoxicity of nanomaterials in the food industry. *Environmental Chemistry Letters*, 15(3), 399–412. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0633-3>
- Manzanares, D., & Ceña, V. (2020). Endocytosis: The nanoparticle and submicron nanocompounds gateway into the cell. *Pharmaceutics*, 12(4), 371.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040371>

- Means, N., Elechalawar, C. K., Chen, W. R., Bhattacharya, R., & Mukherjee, P. (2022). Revealing macropinocytosis using nanoparticles. *Molecular Aspects of Medicine*, 83, 100993. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.100993>
- Moore, T. L., Urban, D. A., Rodriguez-Lorenzo, L., Milosevic, A., Crippa, F., Spuch-Calvar, M., Balog, S., Rothen-Rutishauser, B., Lattuada, M., & Petri-Fink, A. (2019). Nanoparticle administration method in cell culture alters particle-cell interaction. *Scientific Reports*, 9(1), 900. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36954-4>
- Moshiran, V. A., Karimi, A., Golbabaee, F., Yarandi, M. S., Sajedian, A. A., & Koozekonan, A. G. (2021). Quantitative and semiquantitative health risk assessment of occupational exposure to styrene in a petrochemical industry. *Safety and Health at Work*, 12(3), 396–402. <https://doi.org/10.1016/j.shaw.2021.01.009>
- Muruzabal, D., Collins, A., & Azqueta, A. (2021). The enzyme-modified comet assay: Past, present and future. *Food and Chemical Toxicology*, 147, 111865. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111865>
- Naderi Kalali, E., Lotfian, S., Entezar Shabestari, M., Khayatzadeh, S., Zhao, C., & Yazdani Nezhad, H. (2023). A critical review of the current progress of plastic waste recycling technology in structural materials. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 40, 100763. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2023.100763>
- Niu, H., Liu, S., Jiang, Y., Hu, Y., Li, Y., He, L., Xing, M., Li, X., Wu, L., Chen, Z., Wang, X., & Lou, X. (2023). Are microplastics toxic? A review from eco-toxicity to effects on the gut microbiota. *Metabolites*, 13(6), 739. <https://doi.org/10.3390/metabo13060739>
- OECD. (2022). Global plastics outlook: Policy scenarios to 2060. *OECD*. <https://doi.org/10.1787/aa1edf33-en>
- Okunola A, A., Kehinde I, O., Oluwaseun, A., & Olufiropo E, A. (2019). Public and environmental health effects of plastic wastes disposal: A review. *Journal of Toxicology and Risk Assessment*, 5(2). <https://doi.org/10.23937/2572-4061.1510021>
- Paget, V., Dekali, S., Kortulewski, T., Grall, R., Gamez, C., Blazy, K., Aguerre-Chariol, O., Chevillard, S., Braun, A., Rat, P., & Lacroix, G. (2015). Specific uptake and genotoxicity induced by polystyrene nanobeads with distinct surface chemistry on human lung epithelial cells and macrophages. *PLOS ONE*, 10(4), e0123297. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123297>

- Pinter, E., Friedl, C., Irnesberger, A., Czerny, T., Piwonka, T., Peñarroya, A., Tacker, M., & Riegel, E. (2021). HepGentox: A novel promising HepG2 reportergene-assay for the detection of genotoxic substances in complex mixtures. *PeerJ*, 9, e11883. <https://doi.org/10.7717/peerj.11883>
- Poma, A., Vecchiotti, G., Colafarina, S., Zarivi, O., Aloisi, M., Arrizza, L., Chichiriccò, G., & Di Carlo, P. (2019). In vitro genotoxicity of polystyrene nanoparticles on the human fibroblast hs27 cell line. *Nanomaterials*, 9(9), 1299. <https://doi.org/10.3390/nano9091299>
- Proshad, R., Kormoker, T., Islam, Md. S., Haque, M. A., Rahman, Md. M., & Mithu, Md. M. R. (2017). Toxic effects of plastic on human health and environment: A consequences of health risk assessment in Bangladesh. *International Journal of Health*, 6(1), 1–5. <https://doi.org/10.14419/ijh.v6i1.8655>
- Pu, X., Wang, Z., & Klaunig, J. E. (2015). Alkaline comet assay for assessing dna damage in individual cells. *Current Protocols in Toxicology*, 65(1). <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0312s65>
- Rennick, J. J., Johnston, A. P. R., & Parton, R. G. (2021). Key principles and methods for studying the endocytosis of biological and nanoparticle therapeutics. *Nature Nanotechnology*, 16(3), 266–276. <https://doi.org/10.1038/s41565-021-00858-8>
- Roy, I., Nadar, P., & Khurana, S. (2021). Neutral comet assay to detect and quantitate dna double strand breaks in hematopoietic stem cells. *BIO-PROTOCOL*, 11(16). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4130>
- Roursgaard, M., Hezareh Rothmann, M., Schulte, J., Karadimou, I., Marinelli, E., & Møller, P. (2022). Genotoxicity of particles from grinded plastic items in caco-2 and hepg2 cells. *Frontiers in Public Health*, 10. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.906430>
- Rubio, L., Barguilla, I., Domenech, J., Marcos, R., & Hernández, A. (2020). Biological effects, including oxidative stress and genotoxic damage, of polystyrene nanoparticles in different human hematopoietic cell lines. *Journal of Hazardous Materials*, 398, 122900. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122900>
- Salvati, A., Nelissen, I., Haase, A., Åberg, C., Moya, S., Jacobs, A., Alnasser, F., Bewersdorff, T., Deville, S., Luch, A., & Dawson, K. A. (2018). Quantitative measurement of nanoparticle uptake by flow cytometry illustrated by an interlaboratory comparison of the uptake of labelled polystyrene nanoparticles. *NanoImpact*, 9, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.10.004>

- Sarma, D. K., Dubey, R., Samarth, R. M., Shubham, S., Chowdhury, P., Kumawat, M., Verma, V., Tiwari, R. R., & Kumar, M. (2022). The biological effects of polystyrene nanoplastics on human peripheral blood lymphocytes. *Nanomaterials*, 12(10), 1632.
<https://doi.org/10.3390/nano12101632>
- Shi X., Wang X., Huang R., Tang C., Hu C., Ning P. & Wang F. (2022). Cytotoxicity and Genotoxicity of Polystyrene Micro- and Nanoplastics with Different Size and Surface Modification in A549 Cells. *Int J Nanomedicine*. 17:4509-4523
<https://doi.org/10.2147/IJN.S381776>
- Shrivastava, A. (2018). Polymerization. Introduction to Plastics Engineering (p. 17–48). *Elsevier*.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39500-7.00002-2>
- Shukla, R. K., Badiye, A., Vajpayee, K., & Kapoor, N. (2021). Genotoxic potential of nanoparticles: Structural and functional modifications in dna. *Frontiers in Genetics*, 12, 728250.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2021.728250>
- Siddiqui, S. A., Singh, S., Bahmid, N. A., Shyu, D. J. H., Domínguez, R., Lorenzo, J. M., Pereira, J. A. M., & Câmara, J. S. (2023). Polystyrene microplastic particles in the food chain: Characteristics and toxicity - A review. *Science of The Total Environment*, 892, 164531.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164531>
- Silva, R. R. A., Marques, C. S., Arruda, T. R., Teixeira, S. C., & De Oliveira, T. V. (2023). Biodegradation of polymers: Stages, measurement, standards and prospects. *Macromol*, 3(2), 371–399. <https://doi.org/10.3390/macromol3020023>
- Soto-Bielicka, P., Peropadre, A., Sanz-Alferez, S., Hazen, M. J., & Fernández Freire, P. (2024). Influence of polystyrene nanoparticles on the toxicity of tetrabromobisphenol A in human intestinal cell lines. *Toxicology*, 503, 153769. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2024.153769>
- Sousa De Almeida, M., Susnik, E., Drasler, B., Taladriz-Blanco, P., Petri-Fink, A., & Rothen-Rutishauser, B. (2021). Understanding nanoparticle endocytosis to improve targeting strategies in nanomedicine. *Chemical Society Reviews*, 50(9), 5397–5434.
<https://doi.org/10.1039/D0CS01127D>
- Stater, E.P., Sonay, A.Y., Hart, C. et al. The ancillary effects of nanoparticles and their implications for nanomedicine. *Nat. Nanotechnol.* **16**, 1180–1194 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41565-021-01017-9>
- Strober, W. (2015). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current Protocols in Immunology*, 111(1). <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>

- Tamara, B., & Elke, R. (2015). Comparison of different DNA staining methods in the comet assay. *Frontiers in Genetics*, 6. <https://doi.org/10.3389/conf.fgene.2015.01.00007>
- Toduka, Y., Toyooka, T., & Ibuki, Y. (2012). Flow cytometric evaluation of nanoparticles using side-scattered light and reactive oxygen species-mediated fluorescence—correlation with genotoxicity. *Environmental Science & Technology*, 46(14), 7629–7636. <https://doi.org/10.1021/es300433x>
- Uzhytchak, M., Smolková, B., Lunova, M., Frtús, A., Jirsa, M., Dejneka, A., & Lunov, O. (2023). Lysosomal nanotoxicity: Impact of nanomedicines on lysosomal function. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 197, 114828. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2023.114828>
- Vallabani, N. V. S., & Karlsson, H. L. (2022). Primary and secondary genotoxicity of nanoparticles: Establishing a co-culture protocol for assessing micronucleus using flow cytometry. *Frontiers in Toxicology*, 4, 845987. <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.845987>
- Villacorta, A., Rubio, L., Alaraby, M., López-Mesas, M., Fuentes-Cebrian, V., Moriones, O. H., Marcos, R., & Hernández, A. (2022). A new source of representative secondary PET nanoplastics. Obtention, characterization, and hazard evaluation. *Journal of Hazardous Materials*, 439, 129593. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129593>
- Zeenat, Elahi, A., Bukhari, D. A., Shamim, S., & Rehman, A. (2021). Plastics degradation by microbes: A sustainable approach. *Journal of King Saud University - Science*, 33(6), 101538. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101538>
- Zhang, K., & Wu, C. (2023). Formation of airborne microplastics. *Comprehensive Analytical Chemistry* (T. 100, p. 1–16). *Elsevier*. <https://doi.org/10.1016/bs.coac.2022.07.001>
- Zheng, C., Collins, A., Brunborg, G., Van Schooten, F.-J., Nordengen, A. L., Shaposhnikov, S., & Godschalk, R. (2023). Assay conditions for estimating differences in base excision repair activity with Fpg-modified comet assay. *Cell Biology and Toxicology*, 39(6), 2775–2786. <https://doi.org/10.1007/s10565-023-09801-0>
- Ziani, K., Ioniță-Mîndrican, C.-B., Mititelu, M., Neacșu, S. M., Negrei, C., Moroșan, E., Drăgănescu, D., & Preda, O.-T. (2023). Microplastics: A real global threat for environment and food safety: a state of the art review. *Nutrients*, 15(3), 617. <https://doi.org/10.3390/nu15030617>

PRIEDAI

1 priedas

1 lentelė. Reaktyvių deguonies formų procentinė išraiška (%), HepG2 ląsteles paveikus polistireno nanodalelėmis 24 valandas

Koncentracijos	0 µg/ml	10 µg/ml	40 µg/ml	80 µg/ml	100 µg/ml
I matavimas	3,41	6,60	6,21	5,01	5,00
II matavimas	8,97	12,47	15,51	11,31	9,96
III matavimas	5,82	6,5	6,36	6,99	4,70
Vidurkis	6,07	8,52	9,36	7,77	6,55
Standartinis nuokrypis	2,79	3,42	5,33	3,22	2,95

1 lentelė. HepG2 ląstelių, paveiktų PS nanodalelėmis 24 valandas, gyvybingumas (%). Duomenys pateikti kaip vidurkių reikšmės. K – neigiama kontrolė; TK – teigiama kontrolė

Koncentracija, $\mu\text{g/ml}$	Gyvybingumas (%)
K	93
TK	91
5	94
10	91
20	91
40	87
60	87
80	81
100	71