

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Látky extrahovatelné z plastů**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor: **Anna Kašparová**

Studijní program: B1501 Experimentální biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: **Mgr. Jiří Grúz, Ph.D.**

Termín odevzdání: 2020

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Anna Kašparová
Název práce	Látky extrahovatelné z plastů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Jirí Grúz, Ph D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	<p>Bakalářská práce se zabývala extrahovatelnými látkami z plastových materiálů a jejich účinkem na životaschopnost buněk. Testována byla také prozánětlivá aktivita. Byly vybrány vzorky plastů (pneumatika, tartan, elektrický kabel, brčko, haribo sáček, polystyren, psí hračka, houbička, bublinková fólie, zubní kartáček, dudlík a teflonová páska), které byly homogenizovány a následně extrahovány do dimethylsulfoxidu.</p> <p>K testování viability byly použity buňky BJ (lidské fibroblasty), ke kterým byly přidány extrakty plastů. Pomocí resazurinu byla měřena viabilita buněk. Za netoxické vzorky můžeme považovat extrakty dudlíku (viabilita 102,3 %) a haribo sáčku (viabilita 96 %). Za mírně cytotoxické vzorky ovlivňující viabilitu buněk v rozmezí 80-65 % vzorky pneumatiky, tartanu elektrického kabelu, brčka, polystyrenu, psí hračky, bublinkové fólie, zubního kartáčku a teflonové pásky. Vzorek houbičky snížil viabilitu buněk na 46,7 %. U testu ELAM vykazoval největší prozánětlivý efekt také vzorek houbičky (131,1 %) a částečný vzorek polystyrenu (110,8 %). U ostatních vzorků nebyl pozorován prozánětlivý účinek. Vzorek houbičky na mytí nádobí byl analyzován pomocí UHPLC-MS. Test potvrdil přítomnost extrahovatelných látek ze vzorku houbičky a předběžně byla identifikována část molekuly s elementárním složením <math>C_7H_{10}N_2</math>. Možná struktura odpovídá 2,4-diaminotoluenu (4-methylbenzen-1,3-diamin), který je meziproduktem při výrobě isokyanátů používající se při výrobě polyurethanu.</p>
Klíčová slova	Plasty, mikroplasty, aditiva, cytotoxicita, zánět, resazurin, ELAM test, životní prostředí
Počet stran	50
Počet příloh	0
Jazyk	český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Anna Kašparová
Title of thesis	Substances extractable from plastics
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Jiří Grúz, Ph D.
The year of presentation	2020
Abstract	<p>This bachelor thesis dealt with the extractable substances from plastics and their effect on cell viability. The proinflammatory activity has been also tested. Selected plastic samples: tire, tartan, electric cable, straw, Haribo bag, polystyrene, dog toy, dishwashing sponge, bubble wrap, toothbrush, pacifier and teflon tape. Samples have been homogenized and then extracted into dimethyl sulfoxide.</p> <p>The cytotoxicity was determined using BJ cells (human fibroblasts) treated with extracts from plastics. Cell viability was measured with resazurin. Extracts of pacifier (102,3 %) and Haribo bag (96 %) can be considered as non-toxic samples. Extracts of tire, tartan, electric cable, straw, polystyren, dog toy, bubble wrap, toothbrush and teflon tape slightly affected cell viability in the range 80-65% were considered as slightly cytotoxic. Extract of dishwashing sponge decreased cell viability to 46,7 %. The ELAM test results also shown that the highest pro - inflammatory effect exhibited extracts of dishwashing sponge (131,1 %) and polystyrene (110,8 %). No pro-inflammantory effect was observed in other samples. A sample of the dishwashing sponge was analyzed with UHPLC-MS. The results of the analysis confirmed the presence of extractable substances from the dishwashing sponge sample and part of the molecule with elementary composition <math>C_7H_{10}N_2</math> was preliminary identified. Possible structure corresponds to 2,4-diaminotoluene (4 - methylbenzene-1,3-diamine), which is the intermediate in the production of isocyanates used in the production of polyurethanes.</p>
Keywords	Plastics, microplastics, additives, cytotoxicity, inflammation, resazurin, ELAM test, environment
Number of pages	50
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Jiřího Grúze, Ph.D., za použití citované literatury.

V Olomouci dne .....

.....

Anna Kašparová

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Jiřímu Grúzovi, Ph.D. za trpělivost, odborné vedení a cenné rady, které mi pomohly v průběhu psaní práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Lucii Slobodianové za osvojení si základních návyků při práci ve sterilním prostředí, dále za pomoc v průběhu experimentu.

V neposlední řadě, bych ráda poděkovala Mgr. Lucii Rárové, Ph.D. za provedení testu ELAM a vysvětlení podrobností.

Děkuji Laboratoři růstových regulátorů za poskytnutí IGA grantu: IGA\_PrF\_2020\_021.

## OBSAH

SEZNAM ZKRATEK .....	8
<b>1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE</b> .....	<b>9</b>
1.1 Úvod .....	9
1.2 Cíle práce .....	9
<b>2. TEORIE</b> .....	<b>10</b>
2.1 Degradace plastových materiálů .....	10
2.1.1 Mechanismus fotodegradace .....	11
2.1.2 Biodegradace .....	12
2.2 Mikroplasty a jejich rozdělení .....	12
2.3 Vliv mikroplastů na živé organismy .....	14
2.3.1 Plankton .....	14
2.3.2 Larvy ryb, sladkovodní a mořské ryby .....	15
2.3.3 Medúzy .....	16
2.3.4 Mořské mušle .....	17
2.3.5 Kytovci .....	17
2.3.6 Hmyz .....	18
2.3.7 Savci .....	18
2.4. Vliv mikroplastů na člověka a lidské zdraví .....	20
2.5 Vliv mikroplastů v zemědělství .....	20
2.6 Riziko přítomných aditiv v plastových materiálech .....	21
2.6.1 Bisphenol A a jiná aditiva .....	21
2.7 Metody – Test cytotoxicity a test ELAM .....	22
2.7.1 Test cytotoxicity .....	22
2.7.2 Test ELAM .....	23
<b>3. MATERIÁL A METODY</b> .....	<b>24</b>
3.1 Plastový materiál .....	24

3.2 Buněčný materiál.....	24
3.3 Chemikálie .....	24
3.4 Přístrojové vybavení.....	25
3.5 Extrakce plastových materiálů .....	25
3.5.1 Homogenizace .....	25
3.5.2 Extrakce pomocí DMSO .....	26
3.6 Kultivace BJ buněčné linie .....	26
3.6.1 Pasážování .....	27
3.7 Test cytotoxicity .....	27
3.7.1 Den 1 – vysazení buněk do 96 jamkové desky.....	27
3.7.2 Den 2 – Expozice vysazených buněk extrakty plastů .....	28
3.7.3 Den 3 – Test viability buněk pomocí resazurinu .....	31
3.8 ELAM test.....	31
3.9 Vyhodnocení dat .....	31
3.9.1 Vyhodnocení testu cytotoxicity.....	31
3.9.2 Vyhodnocení testu ELAM .....	32
<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>32</b>
4.1 Schéma extrakčního postupu .....	32
4.2 Výsledky testu cytotoxicity.....	34
4.3 Výsledky ELAM testu .....	36
4.4 Analýza vzorku houbičky pomocí UHPLC-MS .....	37
<b>5. DISKUZE .....</b>	<b>39</b>
<b>6. ZÁVĚR.....</b>	<b>42</b>
<b>7. POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>43</b>

## SEZNAM ZKRATEK

ATCC	American Type Culture Collection
Bisphenol A	4,4'-(propan-2,2-diyl)difenol
BSA	bovinní sérová albumin
C-C backbone	vazba "uhlík-uhlík"
DEHP	bis(ethylhexyl)-phalát
2,4-diaminotoluen	4-methylbenzen-1,3-diamin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EIC	Extracted ion chromatogram
ELAM	endothelial-leukocyte adhesion molecule
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ES+	ionizace elektrosprejem v pozitivním módu
GESAMP	Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection
MPs	mikroplasty
NPs	nanoplasty
MS	hmotnostní spektrometrie
Lip A	kyselina lipoová (lipoic acid)
PBAT	polybutylenadipát-terephthalát
PBS	phosphate Buffered Saline, fosfátový pufr
PE	polyethylen
PEN-STREP	antibiotikum penicillin-streptomycin
PET	polyethylenterephthalát
PP	polypropylen
PS	polystyren
PVC	polyvinylchlorid
PU	polyurethan
RPM	revolutions per minute, otáčky za minutu
RT	retenční čas
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
TOF	průletový analyzátor (Time Of Flight)
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie



# 1. ÚVOD A CÍLE PRÁCE

## 1.1 Úvod

Plasty jsou klíčovým vynálezem 20. století. Používáme je dennodenně, jejich produkce neustále stoupá, a proto můžeme i s nadsázkou říci, že žijeme v “Době plastové“. Od běžných plastů očekáváme stálost, odolnost a zdravotní nezávadnost.

S nárůstem výroby plastů souvisí množství vyprodukovaného odpadu pocházející z produktů osobní potřeby, domácností, stavebnictví či průmyslu. Použité plasty často končí v přírodě, kde vlivem abiotických a biotických faktorů degradují. Varujícím příkladem může být tzv. kontinent plastů nacházející se v Tichém oceánu.

Nebezpečím při rozkladu plastů pro organismy je uvolňování malých fragmentů-mikroplastů a přítomné rozkladné nízkomolekulární látky. Rizikem požití mikroplastů je jejich akumulace v organismu (např. v žaludku). Oproti tomu aditiva s nízkou molekulovou hmotností pronikají do buněk, kde mohou interagovat s buněčnými organely a ovlivňovat tak přirozený metabolismus. Například polystyrénové mikroplasty testované na myších ovlivňovaly prostředí zažívacího traktu (Lu et al., 2018). Bisphenol A (4,4' (propan-2,2-diyl)difenol) řadíme mezi xenoestrogenní aditiva ovlivňující endokrinní hormonální systém (Schug et al., 2011).

## 1.2 Cíle práce

Teoretická část práce charakterizuje plasty, jejich degradaci a zaměřuje se na dopady v biosféře. Zabývá se problémem mikroplastů v běžném životě a seskupuje poznatky vlivu mikroplastů na živočichy a člověka. Krátce poukazuje na riziko nízkomolekulárních látek přítomných v plastových materiálech.

V experimentální části bylo cílem vyvinout vhodný extrakční postup a ověřit stálost/nerozpustnost plastů, resp. extrahovatelnost rozpustných nízkomolekulárních látek z plastových materiálů. Dalším cílem bylo ověřit, jestli extrahovatelné látky z plastů mají vliv na růst buněk a zánět.

## 2. TEORIE

Plasty jsou všudypřítomné a celosvětově používané látky již téměř sto let. První syntetický polymer-bakelit vyrobil v roce 1907 Leo Baekeland. Masová výroba plastů započala ve 40. letech 20. století a trvá dodnes. V roce 1950 dosahovala světová produkce plastů 1,5 milionu tuny, zatímco v roce 2017 byla roční produkce více než 348 milionu tun (PlasticsEurope, 2017; Statista.com, 2018).

Plasty jsou makromolekulární organické sloučeniny, které řadíme do skupiny syntetických polymerů. Nejmenší jednotky označujeme jako monomery – ty jsou spojené do dlouhých řetězců. Pokud se polymer skládá pouze z jedné, té samé opakující se jednotky/monomeru, nazýváme takové uskupení jako homopolymer, např. polyethylen (PE). Za kopolymery označujeme plasty, jejichž řetězec je složený z více (dvou, tří atd.) strukturních monomerů, např. butadienstyrenový kaučuk. (Scott, 1999; Carraher, 2017).

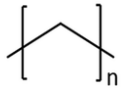
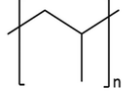
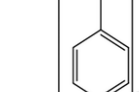
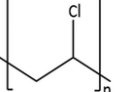
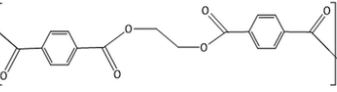
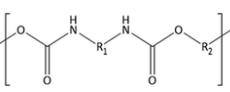
Syntetické polymery dělíme na dvě skupiny: termoplasty a termosety. Termoplasty mohou být opakovaně změkčeny, roztaveny, zpětně zchlazeny a převedeny do jiného tvaru, aniž by se změnila jejich chemická struktura. Důvodem této vlastnosti jsou lineární vazby, které spojují monomery do řetězců. Termosety nemohou být po zahřátí opět převedeny do tekutého stavu, neboť podléhají chemickým změnám a změnou zasíťování struktur (Ebewele, 2000; PlasticsEurope, 2017).

### 2.1 Degradace plastových materiálů

S masivním rozšířením plastových materiálů souvisí problematika jejich následného rozkladu. Rozkladem/degradací plastů označujeme jakékoliv chemické či fyzikální změny, např. ve stavbě a struktuře polymeru, změně barvy a fyzikálních vlastnostech (mechanických, optických, vodivých). Příčinou může být světelné záření, vlhkost, pH prostředí, vysoká teplota, salinita, přítomnost chemických látek nebo biologická aktivita mikroorganismů, např. *Bacillus cereus* (Andrady, 2003; Ebewele, 2000; Smith et al., 2018).

Plasty se z hlediska fyzikálních vlastností vyznačují vysokou rezistencí ke stárnutí a biologické degradaci. Fotodegradace plastů souvisí s absorpcí troposférického záření (UV-A, UV-B), které je pro člověka škodlivé. Záření UV-A (315-400 nm) a UV-B (295- 315 nm) způsobují fotolýzu a fotooxidaci plastů. Jakým způsobem bude fotooxidace probíhat záleží na složení řetězce polymeru. Polymery dělíme dle stavby řetězce na řetězec obsahující pouze vazby „uhlík-uhlík“ a na řetězec obsahující heteroatomy. Do plastů s vazbou „uhlík-uhlík“ řadíme polyethylen (PE), polypropylen (PP), polystyren (PS)

či polyvinylchlorid (PVC). Naopak do druhé skupiny obsahující heteroatomy v hlavním řetězci například polyurethan (PU) a poly(ethyleneterephalát) (PET). Na obrázku 1 jsou zobrazeny vyjmenované druhy plastů, které patří mezi nejběžnější a představují asi 80 % evropské poptávky k roku 2017 (Gewert et al., 2015; Pospíšil a Nešpůrek, 2000; PlasticsEurope, 2012).

Plastics					
C-C backbone				Heteroatoms in backbone	
<b>PE</b> 	<b>PP</b> 	<b>PS</b> 	<b>PVC</b> 	<b>PET</b> 	<b>PU</b> 
17,5 %	19,3 %	6,6 %	10,2 %	7,4 %	7,7 %

**Obr. 1** Rozdělení druhů plastů dle složení řetězce, nákresy struktur a procentuální zastoupení jednotlivých druhů plastů z celkové evropské poptávky roku 2017; zdroj: <https://doi.org/10.1039/C5EM00207A>

### 2.1.1 Mechanismus fotodegradace

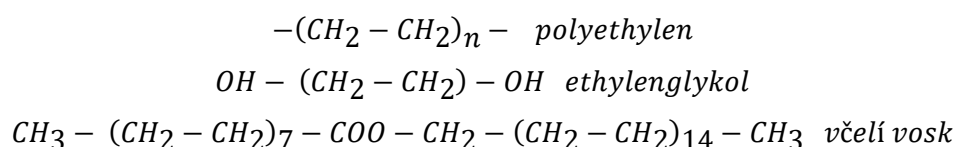
Mechanismus fotodegradace je rozdělen do tří hlavních kroků: iniciaci, propagaci a terminaci (Pritchard, 1998). U iniciace jsou přerušeny vazby v hlavních uhlíkatých řetězcích světelným zářením. Nutná energie k disociaci vazby C-C je 375 kJ/mol a vazby C - H 420 kJ/mol. Tato energie odpovídá svou vlnovou délkou UV-B záření, fotolýza těchto vazeb vede ke vzniku volných radikálů. Aby mohlo tímto způsobem dojít k fotoiniciaci, musí polymer obsahovat chromoforické skupiny, které dokáží absorbovat světelné záření (Gijsman et al., 1999; Singh a Sharma, 2008). Řetězce se stavbou „uhlík - uhlík“ tyto nenasyčené dvojně vazby neobsahují, a tudíž se očekává pomalejší rozklad ve srovnání s polymery obsahující nasycené heteroatomy (Grassie a Scott, 1988). U propagace reaguje vytvořený radikál s kyslíkem za tvorby peroxy radikálů a hydroperoxidů. Tento děj vede k autooxidaci, k náhodnému štěpení nebo zesílení řetězců. Tvoří se funkční skupiny obsahující kyslík. K terminaci dochází, pokud je ze dvou radikálů vytvořen inertní produkt (Pritchard, 1998; Singh a Sharma, 2008). Produkty jsou nejčastěji aldehydy, ketony a olefiny, které ve svých řetězcích obsahují nenasyčené dvojně vazby, a proto se budou

snadněji rozkládat vlivem slunečního záření. Molekulová hmotnost se s časem snižuje, plast se stává křehkým a náchylnějším k okolnímu prostředí (Summers a Rabinovitch, 1999).

Při výrobě plastů se přidávají do směsi různé chemické látky, stabilizátory UV záření a světelného záření, které zajišťují fotostabilizaci a zabraňují degradaci. Nejčastější metodou je absorpce UV záření pomocí antioxidantů vycytávajících vytvořené radikály a tím zastavující proces rozkladu. (Ruoko, 2012).

### 2.1.2 Biodegradace

Jedním z unikátních živočichů, který by mohl pomoci při rozkladu plastů je zavíječ voskový (*Galleria mellonella*) z čeledi zavíječovití (*Pyrallidae*), řádu motýli (*Lepidoptera*). Dospělá můra klade vajíčka do pláství úlu, kde se z vajíček líhnou larvy. Tyto larvy se živí včelím voskem, který dokáže rozložit (Dickman, 1933). Vosk je složen z různých lipidových sloučenin například mastných kyselin, alkanů, alkenů a esterů. Nejčastější vazebnou jednotkou je ve vosku  $\text{CH}_2 - \text{CH}_2$ , tak jako v PE, zobrazeno na obrázku 2 (Maia a Nunes, 2013). Při experimentu bylo zjištěno, že pokud se ponechá 100 larev zavíječe voskového v přítomnosti komerční PE tašky, za 12 hodin ubude 92 mg plastového materiálu. Tato váha odpovídá přibližně 13 % celkové váhy PE tašky. Biodegradaci potvrzuje přítomnost ethylenglykolu (obrázek 2), který vzniká rozkladem PE (Bombelli et al, 2017). Výzkum doplňuje Zhang et al. (2020), který zjistil, že ve střevech zavíječe voskového se nachází houba *Aspergillus flavus* produkující enzymy štěpící PE vazby (Zhang et al, 2020).



**Obr. 2** Chemický vzorec polyethylenu (PE), ethylenglykolu a složky včelího vosku (ester kyseliny palmitové a myricylalkoholu). Obrázek převzat a upraven z: [doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.060](https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.02.060)

## 2.2 Mikroplasty a jejich rozdělení

Plasty se rozpadají na malé částičky označované jako plastové zbytky/fragmenty/mikroplasty (MPs), které dělíme dle jejich velikosti, jak lze vidět v tabulce 1 (Andrady, 2011; GESAMP, 2016).

**Tab. 1** Klasifikace plastových fragmentů dle jejich velikosti. Tabulka převzata z GESAMP (Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection); 2016.

	Velikost částice dle GESAMP	Metoda
Macroplastics	100 cm - 2,5 cm	Vizuálně
Mesoplastics	2,5 cm - 0,1 cm	Vizuálně, světelný mikroskop
Microplastics	0,1 cm - 1 $\mu$ m	Světelný mikroskop
Nanoplastics	< 1 $\mu$ m	Elektronový mikroskop

Samotné MPs jsou děleny na primární a sekundární, dle jejich zdroje/původu. Primární MPs jsou již malé částice, které jsou vypouštěny do životního prostředí (kanalizace). Vznikají například v průběhu výroby plastů, při používání toaletních přípravků, opalovacích krémů a při praní syntetických materiálů (Baucher a Friot 2017; Sundt et al., 2014).

Plastové přísady jsou novodobým trendem v kosmetickém průmyslu. Jejich přítomnost najdeme u zubních past, sprechových gelů či čistících přípravků (tzv. scrub). Jsou součástí očních stínů, deodorantů, pěn na holení a laků na nehty. Příkladem použitých plastových přísad jsou polybutylen terephaláty, polyethylen terephaláty (PET) nebo polypropylen terephaláty. Testy bylo zjištěno, že určité oční stíny obsahovaly ve svém složení 47,27 % PET, neměly však dráždivé účinky. Negativní vliv však mohou mít třpytky vyrobené z PET, které díky svým zoubkovitým okrajům mohou způsobit poškození oka (Cosmetic Ingredient Review, 2012; UNEP, 2015).

Dalším možným zdrojem jsou pneumatiky, které se během jízdy obrušují. Tyto obrušené částice jsou tvořeny syntetickými polymery, přibližně 60 % styren butadienovým kaučukem ve směsi s přírodním kaučukem a dalšími doplňujícími složkami. Částice se ze silnice dostávají vlivy prostředí do přírody (Sundt et al., 2014).

Sekundárními MPs se označují plasty, které se dostaly celé do přírody a jsou vlivem prostředí rozkládány (mechanicky, fotooxidací). Množství částic lze velmi špatně odhadnout, neboť je obtížné sledovat veškeré nakládání s odpady či například počet ztracených rybářských sítí (Boucher a Friot, 2017).

## 2.3 Vliv mikroplastů na živé organismy

Znečištění životního prostředí MPs ovlivňuje všechny suchozemské a vodní organismy. V roce 2014 se odhadovalo, že ve všech oceánech se nachází 15-51 trilionů kusů plastů, což odpovídá váze 93.000-236.000 tun (Sebille et al., 2015).

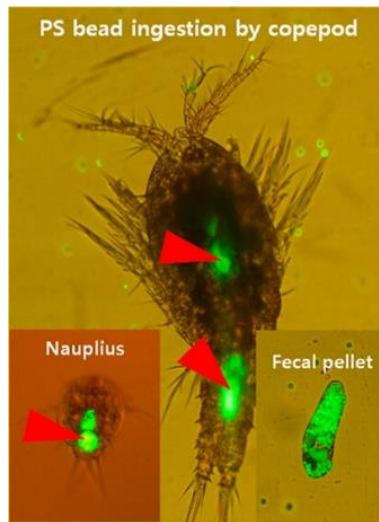
Potenciální rizika pro zdraví organismů můžeme rozdělit do dvou skupin. Jedním z rizik je přítomnost MPs v tělech organismů, které se nejčastěji do těla dostanou nechtěným požitím. Dalším rizikem jsou chemikálie/aditiva obsažená v plastech. Pokud mají chemikálie menší molekulovou hmotnost jak 1000 Da, mohou proniknout do buněk a chemicky interagovat s dalšími biologickými molekulami, a tak ovlivnit celý systém.

Přítomnost a kontaminace oceánů MPs souvisí s jejich hustotou a hmotností. Nízkohustotní MPs se bude nacházet ve vrchních vrstvách, oproti vysokohustotnímu, který bude padat k mořskému dnu (Cole et al., 2016). Každý vodní organismus bude tedy vystaven jiným podmínkám kontaktu s MPs.

### 2.3.1 Plankton

Plankton je nedílnou součástí potravního řetězce, biomasy a bentosu. V oceánech se podílí na udržování uhlíkové pumpy, tedy transportu fotosynteticky produkováných organických látek a fixovaného uhlíku z vrchních vrstev hladiny do hlubších částí (Turner, 2002). Do těla fytoplanktonu se MPs mohou dostat skrze buněčnou membránu a mohou způsobit snížení koncentrace chlorofylu v tělech zelených řas (Nerland et al., 2014). Některé heterotrofické druhy pohlcují částice pomocí fagocytózy (Laist, 1987). Mikročástice se dostanou do zažívacího traktu planktonu, kde se hromadí a tím narušují příjem a trávení potravy. Dalším z důsledků je ovlivňování reprodukčních schopností, výměna oxidu uhličitého a míra ponoru organismu. Fekální pelet je důležitým zdrojem uhlíku a živin pro organismy hlubokých vod a mořského dna. Pokud plankton vyloučí odpadní látky navázané na MPs, změní se rychlost potápění fekálního peletu. Tato změna má za následek snížení potravy pro bentické organismy a remineralizaci organických látek (Cole et al, 2016; Turner, 2002).

Většina druhů zooplanktonu přijímá potravu nasáváním a následným filtrováním vody, jedná se o neselektivní výběr potravy (Moore et al., 2001). Studiemi byla dokázána přítomnost MPs v tělech korýšů (u druhů *Calanus helgolandicus* (Coppock et al., 2019), *Tigriopus japonicus* – zobrazen na obrázku 3 (Lee et al., 2013), krillu, medúz a larev ryb (Desforges et al., 2015; Macali et al., 2018; Steer et al., 2017).



**Obr. 3** Fluorescenčně značené polystyrénové kuličky (šipky) požití korýšem *Tigriopus japonicus*. Viditelné u dospělého jedince, nauplia a fekálního peletu. Zdroj: <https://doi.org/10.1021/es401932b>

### 2.3.2 Larvy ryb, sladkovodní a mořské ryby

Ze studie (Steer et al., 2017), která probíhala v Lamanšském průlivu vyplývá, že i larvy ryb mohou být ovlivněny MPs. Z celkového vyšetřovaného počtu 347 volně žijících larev ryb z 23 druhů, byly nalezeny plastové částice u 10 larev (2,9 %) v jejich zažívacím traktu. Odhalené MPs byly v 17 % fragmenty modré barvy a v 83 % červená a modrá vlákna. Pomocí FTIR analýzy bylo zjištěno, že MPs byly původem z polyester-polyamidu, nylonu a syntetického bioplastu (Steer et al, 2017).

MPs jsou problémem i ve sladkovodním prostředí. V jihozápadním Polsku na řece Widawě byly loveny a následně zkoumány dva druhy kaprovitých ryb. Hrouzek obecný (*Gobio gobio*) představující bentický druh a plotice obecná (*Rutilus rutilus*) představující pelagický druh živící se ve vodním sloupci. Z celkového počtu 389 ryb bylo zaznamenáno 212 (54,5 %) ryb obsahujících MPs. Významné rozdíly požití MPs mezi druhy nebyly zaznamenány. MPs byly nalezeny v zažívacím traktu, žábrech a také přilepené hlenem k povrchu těla (Kuśmierek a Popiołek, 2020).

Plastové částice způsobují blokádu trávicího systému či jaterní stres díky akumulaci organických látek. Dále bylo pozorováno snížení koncentrace glykogenu v játrech, vakuolizace a nekróza buněk (Derraik, 2002; Rochman et al., 2013).

Rychlost vylučování požitých MPs závisí také na tvaru těla ryby. Ryby s přímým tělem vylučovaly MPs rychleji než ryby s ohnutým tělem, kterým tyto částice zůstaly ve střevech (Hoang a Felix-Kim, 2020).

Organismus tilápie nilské (*Oreochromis niloticus*) vystavené 15denní expozici roztoku MPs, vykazoval zesílenou činnost antioxidačního systému – enzymů superoxidázy dismutázy, katalázy, peroxidázy a indexu oxidativního stresu oproti kontrolní skupině ryb. Po expozici docházelo ke zvýšené peroxidaci lipidů, fragmentaci DNA ve srovnání s kontrolní skupinou ryb. Po dalších 15 zotavovacích dnech (bez expozice) se peroxidace lipidů a fragmentace DNA vrátily k fyziologickým hodnotám. Díky elektroforetické analýze bylo zjištěno, že dochází k modifikaci svalových proteinů (Hamed et al., 2020).

### 2.3.3 Medúzy

Medúzy jsou nedílnou součástí pelagických a hlubinných společenstev. Jsou významnou součástí potravinového řetězce a jsou také nazývány želatinovým planktonem. V případě zkoumané medúzy *Pelagia noctiluca* žijící ve Středozemním moři, je hlavním zdrojem potravy zooplankton (Larson, 1897). V jejích gastrovaskulárních dutinách byly však nalezeny plastové fragmenty, které mohly medúzy špatně rozpoznat jako potravu, názorně ukazuje obrázek 3. Je to důsledek nesprávné identifikace z hlediska vizuálního, hmatového či přitahování aromatizací organických sloučenin (Mrosofsky et al., 2009; Moore C. J., 2008; Brillant a MacDonald, 2002). Části plastových materiálů způsobovaly blokádu střev s následným hladověním a snížením energetických rezerv (Gall a Thomson, 2015).



**Obr. 3** Důkaz požití plastového předmětu medúzou *P. noctiluca*. Na levé straně *P. noctiluca* při pohledu z ústního otvoru a na pravé straně z aborálního pohledu, viditelný



polyethylenový fragment o délce 1,7 cm nacházející se v klobouku medúzy. Obrázek převzat z doi.org/10.1038/s41598-018-24427-7

### 2.3.4 Mořské mušle

V mořské mušli *Mytilus edulis* (L.) byla prokázána akumulace polystyrénových mikročástic ve střevní dutině, z níž se fagocyticky dostaly do hemolymfy a následně do hemocytů (Browne et al., 2008). Toxicita polystyrenu a jeho monomeru styrenu, může způsobit poškození DNA u měkkýšů a ryb (Mamaca et al., 2005). Možným mechanismem toxicity styrenu je tvorba volných radikálů, které mohou poškodit biomolekuly včetně DNA, lipidů a proteinů. (Regoli et al., 2004).

### 2.3.5 Kytovci

Větší mořští obyvatelé jsou ohroženi plasty více způsoby. Plastové částice se mohou dostat požitím do jejich zažívacího traktu, který může být zablokovan a živočich nedostatkem potravy vyhladoví. Dalším nebezpečím je zapletení těla například do sítí, což může mít za následek uškrcení a utonutí (Laist, 1997). Z dosavadních záznamů byla většina případů tohoto typu způsobena opuštěným lovným zařízením. Důvodem je struktura, velikost, rezistence rozkladu lovných zařízení a také stanoviště, kde se s velkou mírou živočichové nachází (Baulch a Perry, 2014). Také se předpokládá, že druhy MPs a jejich množství, nalézané v zažívací soustavě mořských savců souvisí s jejich krmicí strategií. Například ze studie Lusher et al. z roku 2014 vyplývá, že v severním Atlantiku se nachází 2,46 MPs na m<sup>-3</sup> a přibližně u 11 % (84 jedinců) mesopelagických ryb (ze 761 kusů ve studii) byly nalezeny MPs v trávicím traktu. Mesopelagické ryby jsou hlavní potravou delfína pruhovaného (*Stenella coeruleoalba*) patřícího do podřádu ozubených. Z výpočtů následně vyplývá, že každý jedinec může zkonzumovat až 463 milionům MPs v potravě (Lusher et al., 2014; Lusher et al., 2015).

Oproti tomu druhy podřádu kosticovců, živící se filtrací vody, jsou ohroženi i většími rozměry plastů. Například u hlubokomořských velryb, jejichž hlavní potravou jsou hlavonožci, byly nejčastěji nalezeny plastové sáčky v trávicím traktu. Pro tyto druhy je záměna potravy z dlouhodobého hlediska smrtelná (Lusher et al., 2018). U středomořského plejtváka myšoka (*Balaenoptera physalus*) byla zjištěna přítomnost vyluhovaných aditiv v tukové tkáni. Pravděpodobným zdrojem jsou požitá plastové částice

(Fossi et al., 2012) a dále bylo nalezeno modré nylonové lano jak v kosticích, tak v zažívacím traktu (Lusher et al., 2018).

### 2.3.6 Hmyz

Jedinci druhu *Chironomus riparius* z čeledi pakomárovití (*Chironomidea*), řádu dvoukřídlí (*Diptera*) byly vystaveni expozici PE částicemi (Silva et al., 2019). Jejich životní cyklus zahrnuje stádium vajíčka, larvy zavrtané v sedimentu pod vodou, kukly a imaga. Jsou důležitou součástí ekologických společenstev sladkovodních i mořských vod (Rábová, 2008). Ve stádiu larvy byly jedinci uloženy do sedimentu obsahující PE MPs o různých velikostech částic. Po deseti dnech byla část larev usmrcena a zkoumána. V jejich střevech se našly částice, převážně o velikosti 32–63  $\mu\text{m}$ . Účinky požití částic byly viditelné také u živých larev, neboť se významně snížil jejich růst oproti kontrolní skupině. Zpoždění dospělosti u samic oproti samečkům je u kontrolní skupiny ~ 1 den. V případě imágů exponovanými PE MPs bylo zpoždění dospělosti samic oproti samečkům ~ 2-4 dny. Tato časová odchylka by mohla mít dopad při reprodukci potomstva (Silva et al., 2019).

Ve studii Al-Jaibachi et al. (2019) se zabývali možností přenosu MPs během ontogenetického vývoje komára pisklavého (*Culex pipiens*). Larva je schopná při krmení požit MPs a pokud ho nevytloučí, zůstává v těle i do dospělosti, tedy do stádia bez krmení. Zároveň studie ukázala, že MPs neměly vliv na úmrtnost a růst komárů (Al - Jaibachi et al., 2019).

### 2.3.7 Savci

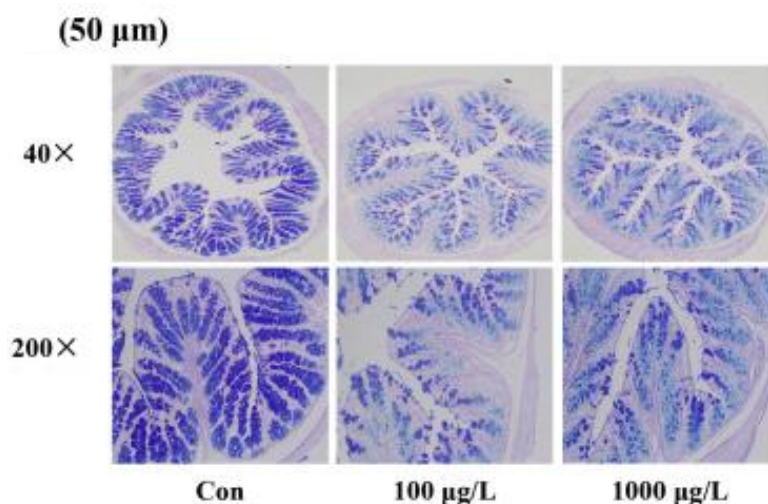
V důsledku rozkladu plastů a potravního řetězce představují mikroplasty nebezpečí pro suchozemské savce, potažmo i pro člověka. Zde uvádím studie, které se zabývali účinkem polyethylenovými a polystyrenovými MPs na myši.

Expozice myši PE MPs vedla ke zvětšení podílu neutrofilů v krvi, a naopak snížení podílu lymfocytů a hmotnosti jedinců. Maturace dendritických buněk byla inhibována. V žaludcích myši byla pozorována odolnost plastových částic vůči natrávení. Zároveň byly výrazně rozšířeny vejcovody a břišní aorta. Při reprodukci se snížil počet narozených mláďat a také jejich hmotnost (Park et al., 2020).

Ve studii Lu et al. (2018) se zabývali vlivem polystyrénových MPs na zažívací trakt a mikrobiální flóru myši. MPs po požití ovlivňují vnitřní prostředí zažívacího traktu a mohou působit jako mikrobiální stanoviště. Samci myši byly vystaveni PS MPs o dvou různých

velikostech (0,5 a 50  $\mu\text{m}$ ) a dvou koncentracích (100 a 1000  $\mu\text{g/l}$ ), lze vidět na obrázku 4. Částice byly přidávány do pitné vody po dobu 5 týdnů. Kontrolní skupině myši nebyly přidávány částice do pitné vody. Z pozorování myši vyplývá, že po třetím týdnu expozice se začala snižovat jaterní a tělesná hmotnost. Byl zaznamenán celkový úbytek tuku. Také byly sniženy koncentrace triacylglycerolů a celkového cholesterolu v séru. Hladiny glukózy a celkové žlučové kyseliny nebyly významně ovlivněny. Sekrece mucinu v tenkém střevu a hlenu v oblasti tlustého střeva byla významně snižena. Ve slepém střevě se snížil se počet bakterií rodu *Firmicutes* a  *$\alpha$ -Proteobacteria*.

Dále byla zjišťována přítomnost transkripčních faktorů, které souvisejí s metabolismem lipidů a glukózy. U exponovaných myši se v játrech snížila koncentrace mRNA a některých genů, které zajišťují lipogenezi a syntézu triacylglycerolů oproti kontrolním myším. Hladina mRNA glukózové kinázy nebyla ovlivněna (Lu et al., 2018).



**Obr. 4** Účinek polystyrénových MPs o velikosti 50  $\mu\text{m}$  na sekreci hlenu v oblasti tlustého střeva, zvětšeno 40x a 200x. První obrázek zleva střevo kontrolní myši, prostřední obrázek střevo myši vystavené koncentraci 100  $\mu\text{g/l}$  PS MPs a zprava střevo myši vystavené koncentraci 1000  $\mu\text{g/l}$ . Střevo byla barveno AB-PAS (alcian blue/periodic acid-Shiff). Obrázek převzat z [doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.051](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.051)

Dále byl testován vliv PS MPs u mateřských myši na potomstvo F1. Těhotné samice myši byly krmeny PS MPs a jejich potomstvo F1 bylo následně zkoumáno. Důsledkem expozice byla metabolická porucha mastných kyselin, a nižší koncentrace triacylglycerolů

a cholesterol-lipoproteinů s vysokou hustotou u samců. U samic nedošlo k významným změnám (Luo et al., 2019).

## **2.4. Vliv mikroplastů na člověka a lidské zdraví**

Do lidského těla se plastové částice mohou dostat různými způsoby, nejčastěji příjmem potravy a vdechnutím. Lidské tělo nedokáže zpracovat mikro nebo nanoplasty, a proto je tento problém potenciální riziko pro zdraví člověka.

Možnost vstoupení MPs do dýchací soustavy souvisí s velikostí částic a jejich bioperzistencí. Částici můžeme inhalovat nebo vdechnout. Vdechnutá částice putuje do plic, zatímco inhalovaná částice se usazuje v horních cestách dýchacích. Tělo dokáže ve většině případů takovou částici odstranit pomocí mukociliární „clearance“ dýchacího aparátu. Ochranu zajišťují pohyblivé řasinky se sekreční činností, které vylučují hlen s případnými z dýchací do trávicí soustavy. Na této očistě se také podílejí alveolární makrofágy a fagocytózní částice (Gasperi et al., 2018; Donaldson a Tran, 2002). Bioperzistence vdechnuté částice souvisí s její odolností vůči vnitřnímu prostředí. Testy *in vitro* prokázaly, že pokud byly PP částice, PE částice a polykarbonátové částice umístěny do fyziologického roztoku (Gamble's solution) po dobu 180 dnů, nevykazovaly prakticky žádné stupně rozkladu (Law et al., 1990).

## **2.5 Vliv mikroplastů v zemědělství**

MPs se dostávají do zemědělské půdy vlivem činností člověka. Může to být například používáním odpadní vody a splašků ke hnojení a zalévání půdy. Zdrojem mohou být skládky nebo zemědělské plasty jako například silážní filmy, mulčovací plasty, fóliovníky a pásy (Huang et al., 2020; Hussain a Hamid, 2003).

Ve studii Huang et al. (2020) se zabývali rozpadem plastových mulčovacích plastů. Odstraňování těchto fólií je pracovně i časově náročné, a proto jsou někdy vědomě fólie ponechány v půdě. Vlivem prostředí se materiál rozpadá na menší částice a znehodnocuje tak půdu (Astner et al., 2019; Huang et al., 2020).

Vyskytují se obavy o udržitelnost kvalitní zemědělské půdy, její produktivity a akumulaci MPs či nanoplastů (NPs) v potravinách. Mohou být nevratně zničeny půdní ekosystémy a ovlivněna hospodářská zvířata (Nizzetto et al., 2016).

Ve studii Boag et al. (1999) byla provedena histologická analýza plic pracovníků textilního průmyslu pracujících s nylonem. Bylo zjištěno, že vdechování plastových částic

způsobuje onemocnění plic. Pracovníci trpěli dušností, kašlem, obstrukcí dýchacích cest, celková a difúzní kapacita plic byly výrazně sniženy. Pomocí biopsie bylo zjištěno, že v plicích byl přítomný mírný až středně těžký lymfatický zánět bronchiolové stěny. Dále byla diagnostikována lymfocytární bronchiolitida a peribronchiolitida s lymfoidní hyperplazií. (Boag et al., 1999).

## **2.6 Riziko přítomných aditiv v plastových materiálech**

Potenciální zdravotní riziko v plastech nespočívá pouze v akumulaci MPs/NPs v organismu, ale také v jejich primární struktuře a aditivech, která se postupně uvolňují. Aditiva tvoří přibližně 4 % z celkové váhy MPs (EFSA, 2016). Přidáním různých druhů změkčovadel, antioxidantů, plniv, barviv či zpomalovačů hoření, jsme schopni vyrobit nespočet druhů plastů s rozdílnými vlastnostmi a funkcemi. Aditiva můžeme rozdělit do 4 hlavních skupin: funkční přísady (stabilizátory, vulkanizační a antistatická činidla), barviva (rozpuštěné azokoloranty, pigmenty), plniva (jíl, uhličitán vápenatý, síran barnatý) a přísady pro zesílení (skleněná a uhlíková vlákna) (Hansen et al., 2013). Plasty se rozkládají a uvolňují do prostředí aditiva, které se mohou dostat díky své nízké molekulové hmotnosti do buněk. Chemické látky následně mohou ovlivnit metabolismus buňky. Příkladem mohou být tzv. xenoestrogenní látky ovlivňující endokrinní hormonální systém (Schug et al., 2011).

### **2.6.1 Bisphenol A a jiná aditiva**

Jednou z xenoestrogenních látek je 4,4'-(propan-2,2-diyl)difenol neboli bisphenol A (BPA). V roce 2003 dosahovala roční produkce BPA 2,2 tun (Burrige, 2003). BPA je velmi používaný polykarbonát k potahu PET lahví, kojeneckých lahví, plechovek, obalových materiálů či úschovných nádob. Pokud je potravinu či nápoj v kontaktu s plastem obsahující BPA, dochází k postupnému uvolňování aditiva. Vymývání je podpořeno vysokým a nízkým pH (Brotons et al., 1995; Halden, 2010, Kang et al., 2003).

Koncentraci BPA v lidském těle můžeme určit z krve, moči a plodové vody. Zvýšená koncentrace BPA může ovlivnit především ženy v plodném věku, těhotné ženy a nenarozené děti ve srovnání s dospělými jedinci. Příčinou obav je průchod BPA placentou (Schönfelder et al., 2002; Vandenberg et al., 2009). Přítomnost BPA byla dokázána v mateřském mléce kojících žen (Kishikawa a Kuroda, 2009). Nízké expozice BPA (50 µg/kg/den) ovlivňují lidské tělo mnoha způsoby jako například sexuální zraní, funkci reprodukčních orgánů, plodnost, hladiny hormonů v krvi, imunitní funkce, enzymatickou aktivitu a strukturu

mozku. Negativní účinky expozice jsou způsobeny především v raném stádiu vývoje a při laktaci. Byly však zaznamenány i u dospělých jedinců (vom Saal a Hughes, 2005). Expozice BPA může ovlivnit časný embryonální vývoj. Aditivum může způsobit apoptózu cytotrofoblastových buněk s následnou nekrotizací a také ohrozit vývoj placenty (Benachour a Aris, 2009).

Negativní účinky BPA byly prokázány také u ryb. U embryí dávná pruhovaná (*Danio rerio*), které byly vystaveny BPA, byly detekovány vysoké koncentrace mozku enzymu cytochromu P450 aromatázy B mRNA. Tento enzym je zodpovědný za přeměnu androgenu na estrogen, který může ovlivnit celou nervovou soustavu a sexuální chování (Kishida et al., 2001; Chung et al., 2011). Dále bylo dokázáno u krokodýlů *Caiman latirostris*, že u *in ovo* expozice s přítomností BPA v čase určování pohlaví, budou všichni výslední potomci samice (Stoker et al., 2003).

Ve studii Kedzierski et al. (2018) bylo předmětem zkoumání rozdílné stárnutí syntetických plastů polyvinylchloridu (PVC), polyethylenterephthalátu (PET) a biologicky rozložitelného polybutylenadipát-terephthalátu (PBAT). Materiál byl umístěn po dobu 502 dní v mořské zátocce ve Francii. Analýzou bylo zjištěno, že PVC stárne rychleji než PET a uvolňuje estrogenní látky. Později adsorbuje k těžkým kovům. V případě PET nebyla zaznamenána estrogenní aktivita. PBAT se rozkládá nejrychleji, povrch byl porušený s dutinami. Studie také uvádí, že plasty mohou mít estrogenní aktivitu, aniž by vykazovaly cytotoxickou aktivitu (Kedzierski et al., 2018).

## **2.7 Metody – Test cytotoxicity a test ELAM**

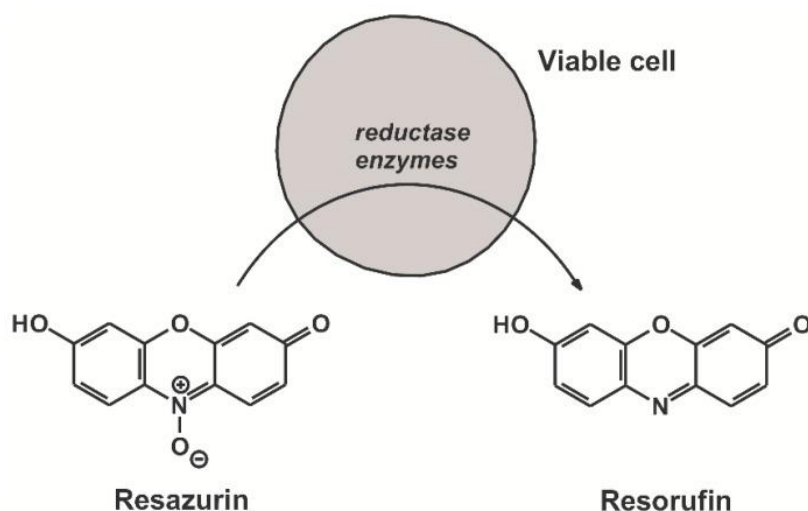
### **2.7.1 Test cytotoxicity**

Pojem cytotoxicita je definována jako vlastnost buněk či chemických látek narušit buněčné procesy a způsobit tak buněčnou smrt (Encyklopedie Diderot, 1999).

V této práci se zaměřuji na cytotoxickou aktivitu extrahovatelných látek ze 12 vzorků plastů, které jsem vyextrahovala do DMSO. Tyto extrakty byly inkubovány s buňkami. Následně byla měřena viabilita (životaschopnost) buněk pomocí indikátoru resazurinu.

Resazurin je fluorescenční barvivo, které má schopnost proniknout skrze neporušenou cytoplasmatickou membránu živých buněk. Živá buňka bude redukovat modrý resazurin na růžový resorufin, reakce je zobrazena na obrázku 5. Fluorescenční maxima excitace/emise 575/585 nm resorufinu jsou měřeny fluorescenčním detektorem. Oproti tomu

u mrtvé buňky nebude docházet k metabolizaci (nemá fluorescenční aktivitu). Míra fluorescence je přímo úměrná metabolizovanému produktu, a tudíž i počtu živých buněk.



**Obr. 5** Chemické struktury resazurinu a resorufinu. Resazurin prochází cytoplasmatickými membránami živých buněk, které ho redukují na vysoce fluorescenčně aktivní produkt resorufin. Absorpční maxima excitace/emise 575/585 nm.

Obrázek převzat z: [doi.org/10.3390/molecules23020382](https://doi.org/10.3390/molecules23020382)

### 2.7.2 Test ELAM

U testu ELAM sledujeme pokles nebo nárůst zánětu po aplikaci testovaných vzorků. Zánět detekujeme pomocí markerů zánětu (ELAM, endothelial-leukocyte adhesion molecule).

Zánět je patologický proces, který je způsoben charakteristickým prasknutím membrány s následným vylitím buněčného obsahu do okolního prostředí. Součástí buněčného obsahu jsou také aktivní enzymy poškozující tkáň a vyvolávající zánět a bolest (Skripta Patofyziologie člověka: Zánik buňky; Ivana Fellnerová; 2020).

K testu ELAM jsou využívány primární endotelové buňky izolované z lidského pupečníku, které mají omezenou životnost. Pomocí TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ) je indukován zánět a tím dochází k vysoké expresi proteinu ELAM na povrchu buňky, který je následně detekován pomocí ELISA testu (enzyme - linked immunosorbent assay). K buňkám jsou přidány primární protilátky proti proteinu ELAM, poté sekundární protilátky s navázanou křenuvou peroxidásou, která

po přidání štěpí přidaný substrát za vzniku žlutého fluorescenčně detekovatelného produktu. Absorbance je měřena při vlnové délce 492 nm. (Morrogh-Bernard et al., 2017; konzultace s Mgr. Lucíí Rárovou, Ph.D.)

### **3. MATERIÁL A METODY**

#### **3.1 Plastový materiál**

Pneumatika (Continental), tartan (Hornbach), ochrana elektrických kabelů (Hornbach), kartáček na zuby (Signal), polystyren (Isover, Saint-Gobain), plastový sáček Haribo cola (Haribo), dudlík (babylove), teflonová páska (Hornbach), bublinková fólie (Globalfol s.r.o.), houbička na mytí nádobí (MELITRADE a.s.), gumová hračka pro psy (Dog Fantasy), brčko (IKEA)

#### **3.2 Buněčný materiál**

Pro cytotoxické stanovení byla použita BJ buněčná linie – nenádorová linie, lidské fibroblasty. Buněčná linie byla získána ze zdroje ATCC (American Type Culture Collection).

#### **3.3 Chemikálie**

K extrakci plastového materiálu byl použit dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck, Darmstadt, Germany). Buněčná linie BJ byla kultivována v živném médiu skládající se z Dulbecco's Modified Eagle Média (DMEM, D5523) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), do kterého bylo přidáno 10% fetální bovinní sérum (ID number: S00D41000B; Biowest, Riverside, USA), 1% antibiotikum penicilin - streptomycin (PEN-STREP) (P4333-100ML; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a 1% L-gluthamin (G7513-100ML; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Takto vytvořené médium bylo uchováváno v lednici při teplotě 4 °C.

K pasážování buněk byl použit roztok trypsinu, který obsahoval sterilní ethylendiamintetraoctovou kyselinu (EDTA) a trypsin, v poměru 1:1. Roztok 1 litru EDTA byl složen z 8 g chloridu sodného, 2 g chloridu draselného, hydrogenuhličitanu sodného (všechny tři Penta s.r.o., Praha, Česká republika), 1 g glukózy a 0,2 g EDTA (obě Sigma - Aldrich, St. Louis, USA). Trypsin byl původem z prasečího pankreasu (T4549-100ML; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

Byl vytvořen zásobní fosfátový pufr (PBS) -v 1 litru destilované vody bylo rozpuštěno 80 g chloridu sodného, 2 g chloridu draselného (obě Penta s.r.o., Praha, Česká republika), 2 g



dihydrogenfosforečnanu draselného a 23,1 g dodekahydrátu fosforečnanu disodného (obě Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), roztok byl sterilizován. V testu cytotoxicity byl použit indikátor rezazurin 6,25 mg/100 ml a jako pozitivní kontrola kyselina lipoová (LipA) v zásobním roztoku 100mM v DMSO.

### **3.4 Přístrojové vybavení**

- Analytické váhy (OHAUS PIONEER, Parsippany, USA)
- Automatické pipety labopette® (Hirschmann-Laborgeräte, Eberstadt, Německo)
- CO<sub>2</sub> Inkubátor (Sanyo Galenkamp, Leicestershire, UK)
- Flowbox (Alpina, Konin, Polsko)
- Hlubokomrazící box New Brunswick Innova (New Brunswick Scientific, Edison, USA)
- Kávový mlýnek KM1310S (Tarrington House-MIP Group, Düsseldorf, Německo)
- Mikrocentrifuga Micro Star 17 (VWR International s.r.o., Radnor, USA)
- Mikroskop Nikon (Nikon, Minato, Japonsko)
- Mikroskop Olympus CK2 (Olympus, Hamburg, Německo)
- Minitrepačka Vortex V-1 plus (bioSan, Riga, Latvia)
- Multidetekční reader infinite M200 PRO (TECAN, Männedorf, Švýcarsko)
- Multikanálová automatická pipeta Eppendorf Xplorer (Eppendorf, Hamburg, Německo)
- Oscilační kulový mlýnek MM400 (Retsch® & Co. KG, Haan, Německo)
- Třepací inkubátor Thermo shaker (Grant-bio, Wiltshire, UK)
- Ultrazvuková lázeň Ultrasonic cleaner (VWR International s.r.o., Radnor, USA)
- UV sterilizátor CL – 1000 (Millipore Sigma, Burlington, USA)

### **3.5 Extrakce plastových materiálů**

#### **3.5.1 Homogenizace**

Dohromady 12 různých druhů plastů bylo opláchnuto destilovanou vodou a následně ethanolem. Postupně byl každý vzorek homogenizován na co nejmenší částice. K homogenizaci bylo použito běžné kuchyňské struhadlo, nůžky a kávový mlýnek.

### 3.5.2 Extrakce pomocí DMSO

Vzorky plastů byly naváženy do mikrozkušavek přibližně po 30 mg (Tab 2) a byla přidána jedna kovová homogenizační kulička. Do mikrozkušavek bylo napipetováno extrakční činidlo DMSO, objemy zapsány v tabulce 2.

**Tab. 2** Hodnoty navážek (mg) a pipetovaných objemů (μl) vzorků plastů.

Vzorek plastu	Navážená hmotnost (mg)	Pipetovaný objem DMSO (μl)
pneumatika	30	200
Tartan	29,8	200
elektrický kabel	32,3	200
zubní kartáček	30,9	200
polystyren	30,1	1000
plastový sáček Haribo	29,9	500
dudlík	29,6	200
teflonová páska	30,8	400
bublinková fólie	29,2	1000
houbička na mytí nádobí	29,3	1000
gumová hračka pro psy	29,3	200
Brčko	29,1	200

Takto připravené vzorky byly umístěny na kulovém oscilačním mlýnu po dobu 5 minut, při frekvenci 27 Hz. Následně byly vzorky sonifikovány v ultrazvukové lázni po dobu 10 minut. Vzorky byly extrahovány na rotatoru 24 hodin při 30 otáčkách za minutu. Vzorky byly 10 minut centrifugovány na centrifuze při 20160g. Následně byly supernatanty odebrány do mikrozkušavek a uchovány při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Extrakt teflonové pásky byl zfiltrován na membránovém 0,45 μl nylonovém mikrofiltru, neboť mikročástice se nacházely i v supernatantu.

### 3.6 Kultivace BJ buněčné linie

Buňky byly inkubovány ve sterilním inkubátoru při  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  s atmosférou obsahující 5 % oxidu uhličitého a relativní vlhkost 90 %. Buňky byly kultivovány ve středně velikých lahvích. Živné DMEM médium s přidaným fetálním sérem, antibiotikem a glutaminem, bylo vyměňováno každé 2 až 3 dny ve sterilním prostředí laminárního boxu. Pokud byla zaznamenána změna barvy média z tmavě růžové na červenou barvu, médium bylo vyměněno.

### **3.6.1 Pasážování**

Pasážování probíhalo ve sterilním prostředí laminárního boxu. Všechny použité roztoky byly předem umístěny do vodní lázně, aby jejich teplota byla 37 °C. Buňky v láhvi byly zkontrolovány vizuálně a také pod mikroskopem. Byl kontrolován tvar buněk, míra zaplnění dna a případná kontaminace jinými organismy.

Z jednoho místa v láhvi bylo odebráno staré médium pomocí Pasteurovy pipety. K buňkám bylo napipetováno 5 ml PBS, které odstranilo zbytky starého média a případné mrtvé buňky. Po jemném promytí buněk bylo PBS odsáno. Následně byly k buňkám přidány 2 ml roztoku trypsinu, který zajistil uvolnění adherentních buněk ze dna. Láhev byla temperována 2-3 minuty při 37 °C. Po stanovené době byly vizuálně zkontrolovány buňky, zdali se již odlepily ze dna. U buněk byl kontrolován jejich tvar, přisedlost ke dnu a případné kontaminace. Trypsin byl inaktivován přidáním 8 ml DMEM média. Buňky byly několikrát opatrně nasáty pipetou. Nakonec byl celý objem s buňkami nasán a bylo ponecháno pouze určité množství, většinou 20 až 30 % (dle situace a počtu buněk). Kultivační láhev byla uzavřena, zkontrolována pod mikroskopem a vrácena do inkubátoru.

## **3.7 Test cytotoxicity**

### **3.7.1 Den 1 – vysazení buněk do 96 jamkové desky**

Buňky byly zpasážovány a celý objem kultivační láhve byl převeden do zkumavky. Bylo nutné vypočítat přibližný počet buněk, neboť cílem bylo vysadit 20 000 buněk do jedné jamky na 96 jamkové desce. Do Bürkerovy komůrky bylo napipetováno 10  $\mu$ l suspenze buněk ze zkumavky. Následně byl spočítán počet buněk v 5 čtvercích a jejich průměr. Výpočty byly zjištěny nutné objemy suspenze buněk a čistého nového média, výpočet znázorněn na obrázku 6. Tyto objemy byly smíchány ve velké Petriho misce a důkladně promíchány opětovným nasátím do pipety. Pomocí multikanálové pipety byly buňky vysazeny do jamek na 96 jamkové desce, objem pipetovaný do každé jamky byl 150  $\mu$ l. Takto byly vysazeny buňky do dvou 96 jamkových desek. Desky byly inkubovány 24 hodin při 37 °C.

$$\text{Objem Suspenze buněk (ml)} = \frac{\text{počet jamek} \times 20\,000}{(\text{počet buněk v Bürkerově komůrce} \div 5) \times 10^4}$$

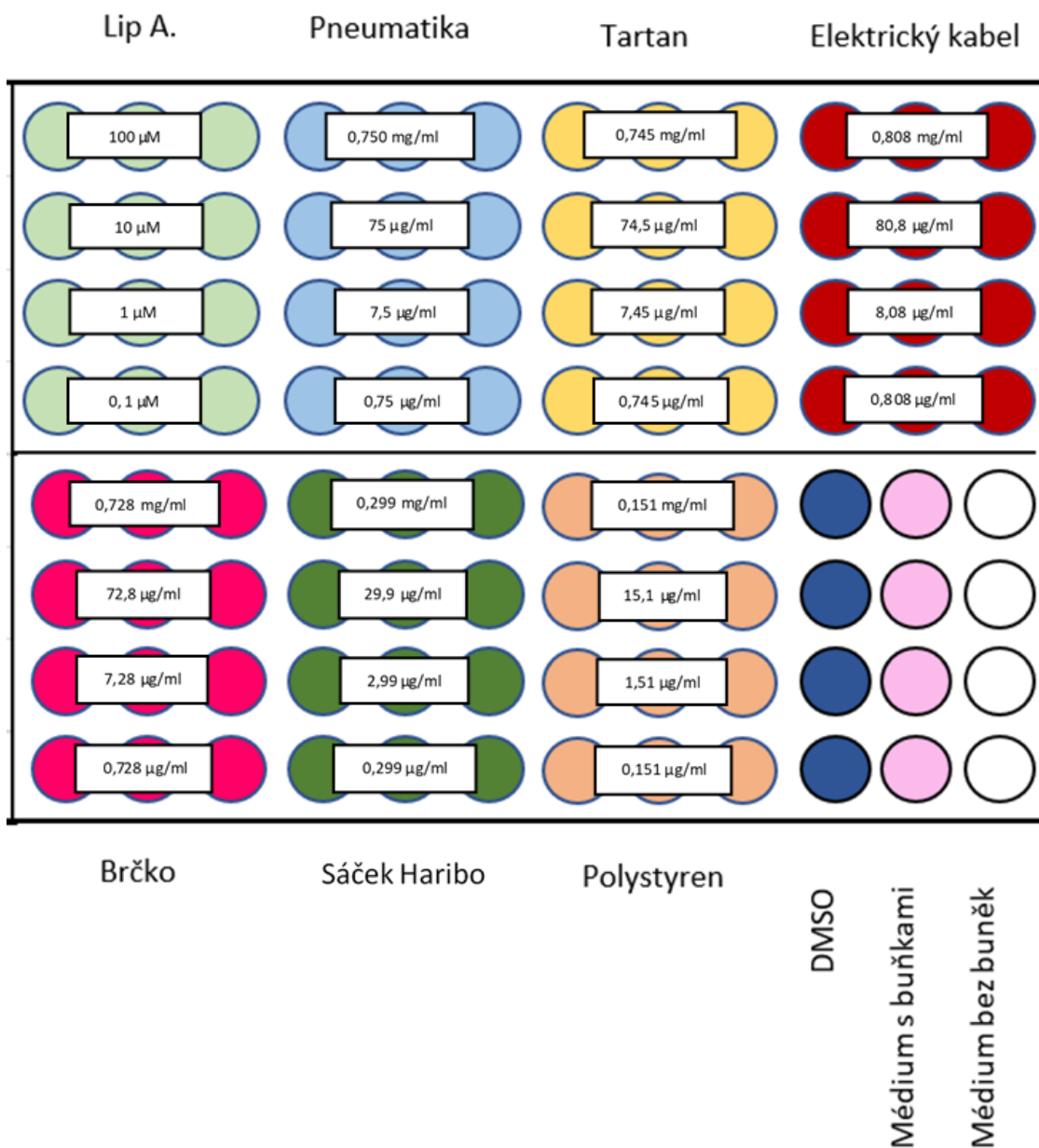
$$\text{Objem média (ml)} = (\text{počet jamek} \times 0,15) - \text{objem suspenze buněk}$$

**Obr. 6** Vzorce pro výpočet přibližného počtu buněk pro zjištění objemu média (ml)

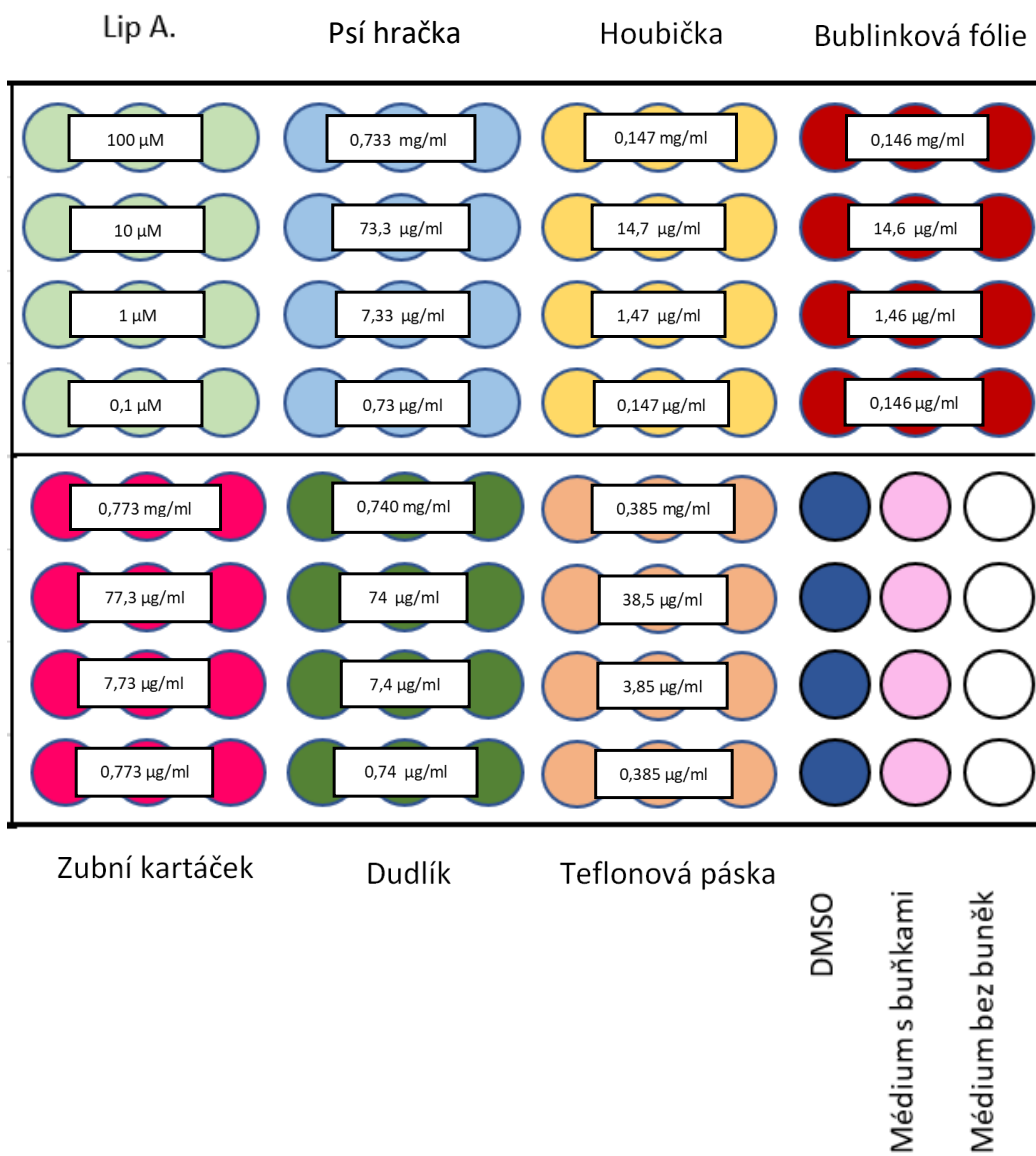
### 3.7.2 Den 2 – Expozice vysazených buněk extrakty plastů

Ve sterilizovaných rezervoárcích byly připraveny roztoky média s testovanou látkou. Rezervoárky byly sterilizované UV světlem po dobu 3000 sekund. Médium bylo složeno z DMEM média a 1 % glutaminu (bez fetálního séra a antibiotik). Za testované látky byly použity vytvořené extrakty plastů, dohromady 12 extraktů. Z extraktů a média byla připravena koncentrační řada, koncentrace jednotlivých extraktů jsou zapsány na obrázku 7 a 8. Za pozitivní kontrolu byla zvolena LipA, byla vytvořena koncentrační řada o koncentracích 100  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  a 0,1  $\mu\text{M}$ .

Po 24 hodinách inkubace byly 96 jamkové desky s nasazenými buňkami vloženy do laminárního boxu. Z jamek bylo opatrně odebráno médium. Pomocí multikanálové pipety byly vytvořené roztoky média a extraktů o čtyřech různých koncentracích a ve třech opakováních napipetovány do jamek, 150  $\mu\text{l}$ /jamka. Obrázek 7 a 8 znázorňují rozložení testovaných látek na deskách. Pozitivní kontrolou byla LipA, negativní kontrolou DMSO a médium s buňkami. Médium bez buněk byl blank. Desky byly inkubovány 24 hodin při 37 °C.



**Obr.7** Rozložení testovaných extraktů na 96 jamkové desce (kyselina lipoová, pneumatika, tartan, elektrický kabel, brčko, sáček Haribo a polystyren), v obdélnících jsou uvedeny jednotlivé koncentrace extraktů. Vpravo dole je přítomen kvartet negativní kontroly DMSO, média s buňkami a média bez buněk



**Obr. 8** Rozložení testovaných extraktů na 96 jamkové desce (kyselina lipová, psí hračka, houbička, bublinková fólie, zubní kartáček, dudlík a teflonová páska), v obdélnících jsou uvedeny jednotlivé koncentrace extraktů. Vpravo dole je přítomen kvartet negativní kontroly DMSO, média s buňkami a média bez buněk

### **3.7.3 Den 3 – Test viability buněk pomocí resazurinu**

Resazurin byl 5x zředěn v připraveném PBS pufru. Po 24 hodinách inkubace byly desky vloženy do prostředí laminárního boxu, bylo odsáto médium z každé jamky. Následně bylo pipetováno pomocí multikanálové pipety 20  $\mu$ l připraveného roztoku resazurinu do jamek. Desky s buňkami byly vloženy do multidetekčního readeru TECAN a byla měřena fluorescence při emisní vlnové délce 598 nm a excitační vlnové délce 535 nm. Viabilita buněk byla testována každých 10 minut po dobu 1 hodiny.

### **3.8 ELAM test**

Lidské primární endotelové buňky izolované z lidského pupečníku byly inkubovány s médiem v inkubátoru při 37 °C v 96 jamkové desce. Následně byly k buňkám přidány extrakty plastů, a to ve třech opakováních. Jako kontrola sloužil triplet jamek s buňkami inkubované pouze s médiem. Duplikát jamek s buňkami byly vystaveny TNF $\alpha$ . Buňky byly inkubovány po dobu 4 hodin.

Po stanovené době následovalo provedení ELAM ELISA testu pro zjištění přítomnosti ELAM proteinu jako prekurzoru zánětu. Buňky byly nejprve jedenkrát promyty PBS puftrem a zafixovány 0,1% glutaraldehydem po dobu 15 minut při pokojové teplotě. Poté byly buňky promyty roztokem PBS pufru obsahující Tween 20 a dále roztokem PBS pufru obsahující bovinní sérový albumin (BSA). Primární anti-ELAM-myší protilátky byly připipetovány do jamek, deska byla takto nechána při pokojové teplotě po 1 hodiny. Následně byly připipetovány sekundární kozí anti-myší protilátky konjugované s křenovou peroxidásou. Deska byla inkubována ve tmě, při pokojové teplotě, po dobu 1 hodiny. Na závěr byl přidán substrát o-fenylendiamin dihydrochlorid, který byl štěpen křenovou peroxidásou za vzniku žlutého produktu. Absorbance byla měřena spektrofotometrem při vlnové délce 492 nm. (Morrogh-Bernard et al., 2017; konzultace s Mgr. Lucií Rárovou Ph.D.)

## **3.9 Vyhodnocení dat**

### **3.9.1 Vyhodnocení testu cytotoxicity**

Data byla vyhodnocena v programu Excel. Každý testovaný vzorek byl testován o čtyřech koncentracích a ve třech opakováních. U každého testovaného vzorku byly spočítány aritmetické průměry a směrodatné odchylky. Hodnota negativní kontroly DMSO

představovala 100 % životaschopnosti buněk. Testované vzorky jsou k této hodnotě vztaženy, vypočteno v procentech. V grafu jsou uvedeny pouze nejvyšší koncentrace extraktů plastů, neboť u nižších koncentracích nebyl pozorován žádný efekt. Výsledky byly zpracované ve spolupráci s vedoucím bakalářské práce.

### **3.9.2 Vyhodnocení testu ELAM**

U testu ELAM byly výsledky vyhodnoceny v programu Excel. Extrakty byly testovány ve třech opakováních. Kontrolou byl triplet jamek s buňkami a médiem. U všech vzorků byly spočítány aritmetické průměry a směrodatné odchyly. Výsledky vzorků jsou vztaženy ke kontrole, vypočítáno v procentech. Zpracování vzorků proběhlo ve spolupráci s vedoucím bakalářské práce a s Mgr. Lucií Rárovou Ph.D.

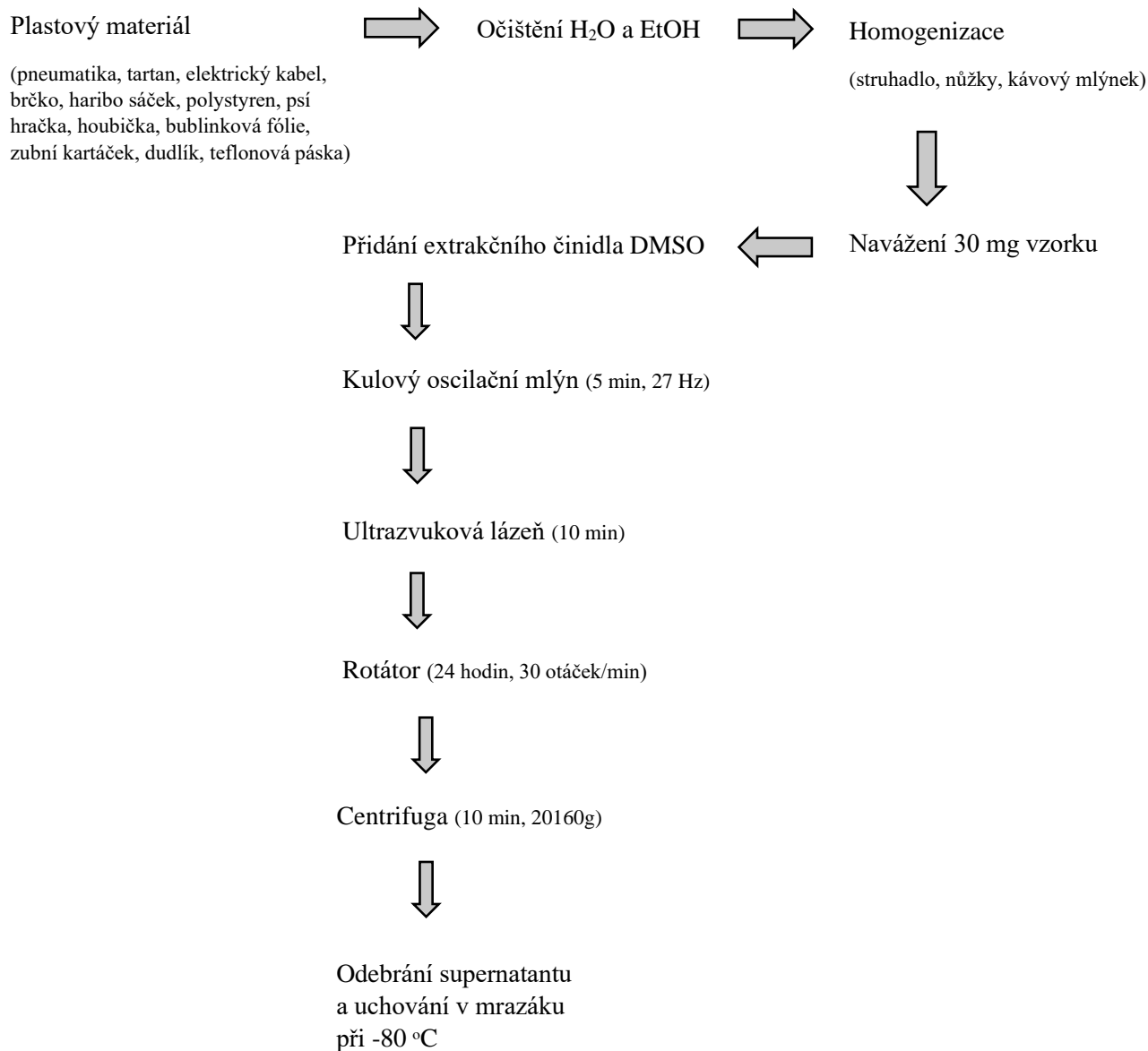
## **4. VÝSLEDKY**

### **4.1 Schéma extrakčního postupu**

Plasty jsou materiály, které se vyznačují odolností a stálostí vůči vnějšímu prostředí. Rozklad plastů bývá často složitý, a proto byly vzorky homogenizovány a muselo být vybráno vhodné rozpouštědlo, aby se ze vzorků plastů vyextrahovalo co nejvíce látek. Homogenizací se zvětšil povrch styku s rozpouštědlem. Také záleželo na tvrdosti a povrchu plastového materiálu. Například velmi tvrdá pneumatika byl homogenizována pomocí struhadla a kávového mlýnku, oproti měkkému polystyrenu. Předběžné pokusy s methanolem a vodou ukázaly, že se do těchto rozpouštědel nevyextrahuje tolik látek. Nakonec bylo zvoleno DMSO, vysoce polární organické rozpouštědlo. Schéma extrakčního postupu je zobrazeno na obrázku 9.



## PŘÍPRAVA EXTRAKTŮ PLASTOVÝCH MATERIÁLŮ



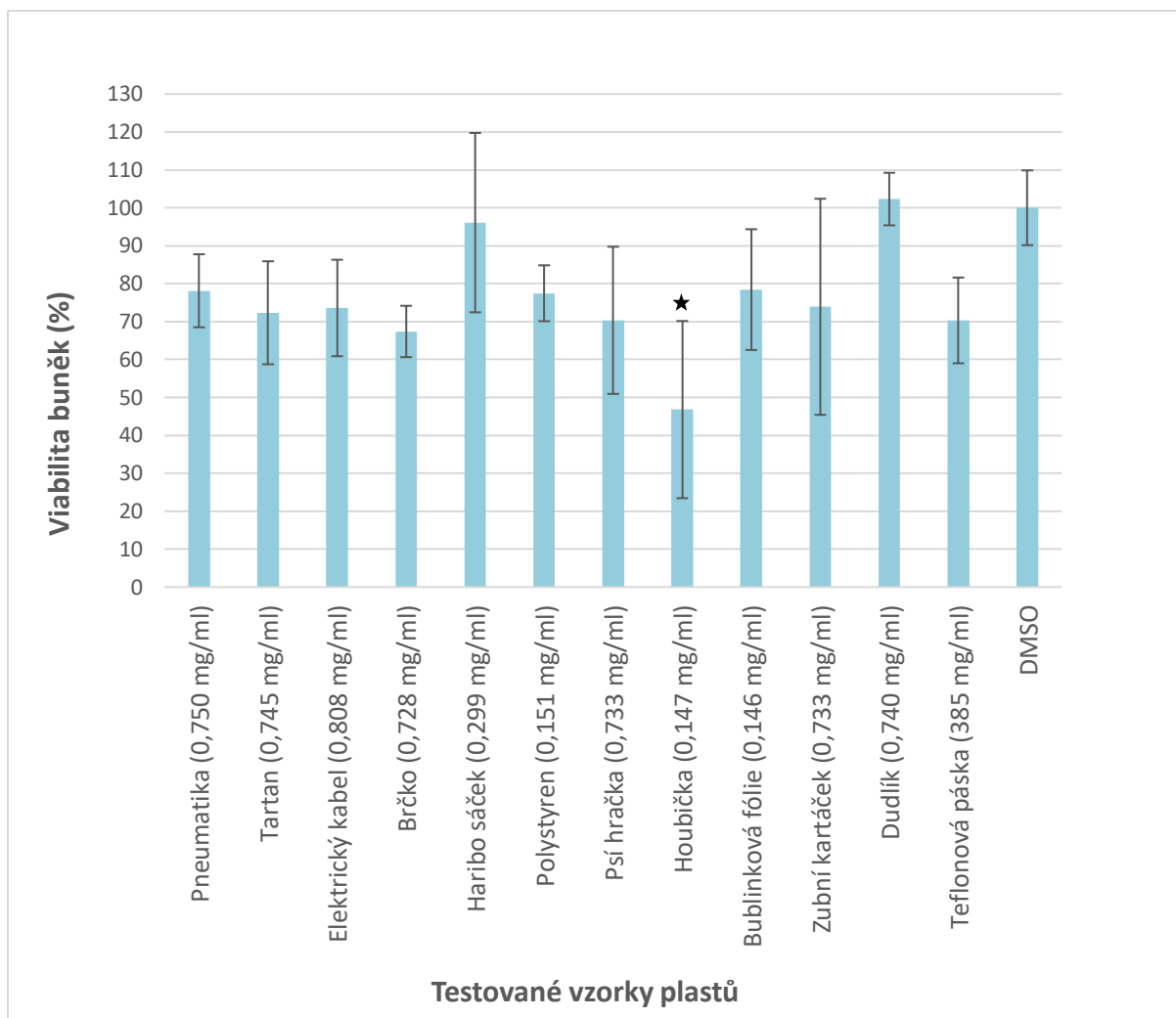
**Obr. 9** Zjednodušené schéma postupu extrakce plastových materiálů, vytvořené extrakty byly testovány v testu cytotoxicity.

## 4.2 Výsledky testu cytotoxicity

Jedním z cílů mé bakalářské práce bylo ověřit, zdali extrahovatelné látky z plastů mají vliv na růst buněk a jejich viabilitu. K experimentu jsem použila BJ buněčnou linii a testovala jsem dohromady 12 vzorků plastů – pneumatiku, tartan, elektrický kabel, brčko, haribo sáček cola, polystyren, psí hračku, houbičku na mytí nádobí, bublinkovou fólii, zubní kartáček, dudlík a teflonovou pásku.

U testu cytotoxicity jsem jako negativní kontrolu použila 0,5% DMSO. Viabilitu buněk jsem detekovala pomocí látky resazurinu, který je živými buňkami metabolizována na resorufin. Resorufin byl měřen pomocí fluorescenčního detektoru při maximech excitace/emise 575/585 nm.

Viabilita buněk je zobrazena na obrázku 10. Za netoxické vzorky můžeme považovat extrakty dudlíku s viabilitou 102,3 % a haribo sáček s viabilitou 96 %. Většina extraktů snižovala mírně viabilitu. Vzhledem k větší variabilitě měření by bylo vhodné experiment zopakovat. Vzorek houbičky vykazoval největší vliv na růst buněk a redukoval viabilitu na 46,7 %. Z hodnot vzorku houbičky byl proveden T-test s výsledkem 0,0156. To znamená, že střední hodnoty viability ve vzorcích kontroly a houbičky se od sebe významně liší na hladině významnosti  $\alpha=0,05$ . Vzorek houbičky byl dále analyzován na hmotnostním spektrometru.



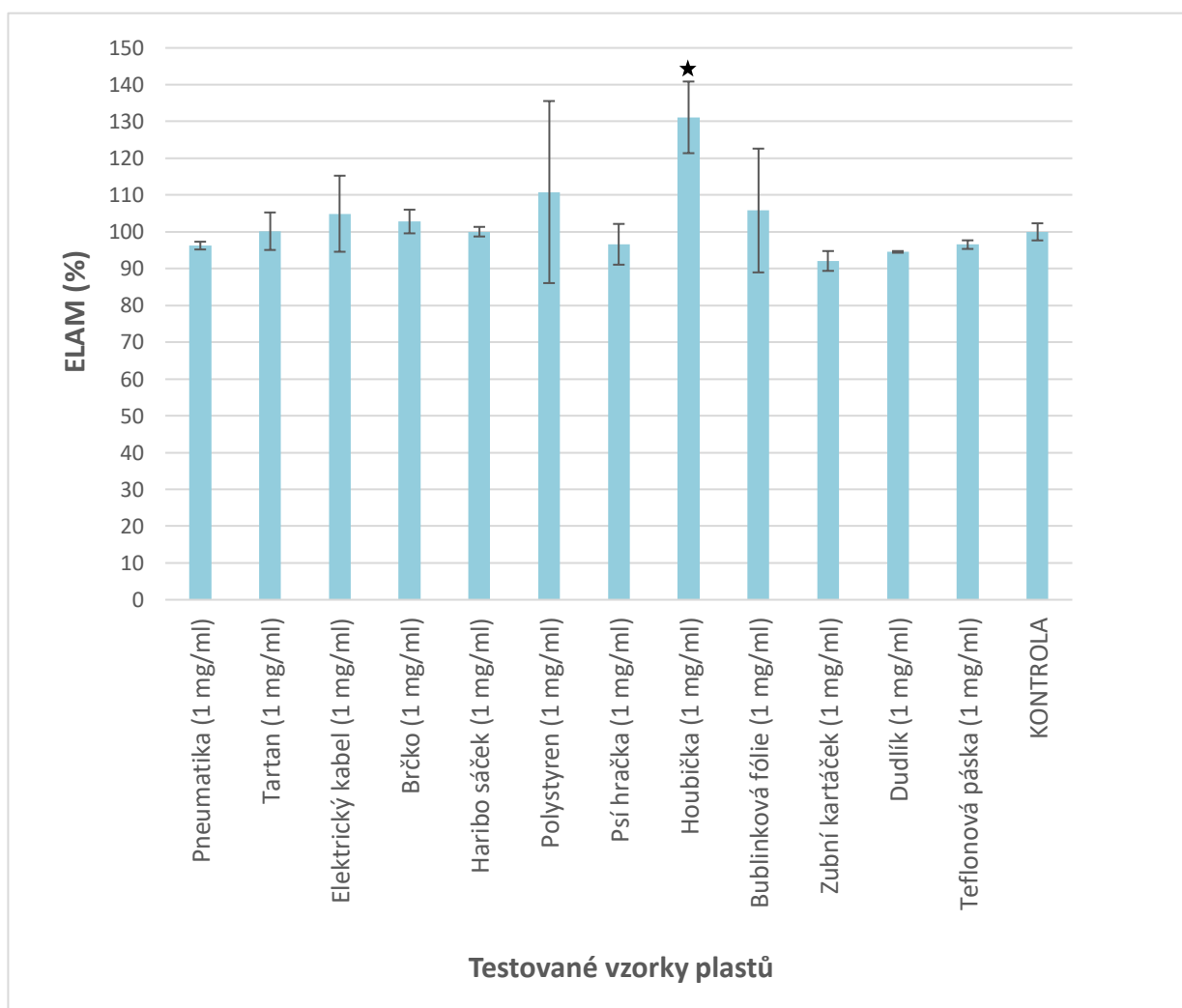
**Obr. 10** Cytotoxicita testovaných extraktů. Buňky byly kultivovány 24 hodin s extrakty plastů [pneumatika (0,750 mg/ml), tartan (0,745 mg/ml), elektrický kabel (0,808 mg/ml), brčko (0,728 mg/ml), haribo sáček (0,299 mg/ml), polystyren (0,151 mg/ml), psí hračka (0,733 mg/ml), houbička (0,147 mg/ml), bublinková fólie (0,146 mg/ml), zubní kartáček (0,733 mg/ml), dudlík (0,740 mg/ml), teflonová páska (0,385 mg/ml)]. K testu byla použita BJ buněčná linie –kožní fibroblasty, nenádorová linie. Viabilita buněk byla testována pomocí resazurinu. Sloupce vyjadřují průměr a chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku (n=3).

★ Rozdíl mezi kontrolou DMSO a vzorkem houbičky je statisticky významný na hladině významnosti  $\alpha=0,05$ .

### 4.3 Výsledky ELAM testu

Největší prozánětlivý efekt vykazoval vzorek houbičky (131,1 %). Částečný efekt byl pozorován taktéž v případě vzorku polystyrenu (110,8 %), měření vykazuje velikou variabilitu, a proto by bylo vhodné provést tento experiment opakovaně. U ostatních vzorků nebyl pozorován prozánětlivý účinek. Výsledky testu ELAM jsou znázorněny na obrázku 11.

U vzorku houbičky byl proveden T-test s výsledkem 0,0057. To znamená, že střední hodnoty viability ve vzorcích kontroly a houbičky se od sebe významně liší na hladině významnosti  $\alpha=0,05$ .



**Obr. 11** Zánětlivost testovaných extraktů. Buňky byly kultivovány 4 hodiny s extrakty plastů (pneumatika, tartan, elektrický kabel, brčko, haribo sáček, polystyren, psí hračka, houbička, bublínková fólie, zubní kartáček, dudlík, teflonová páska; všechny o koncentraci 1 mg/ml). K testu byly použity primární endotelové buňky izolované z lidského pupečníku.

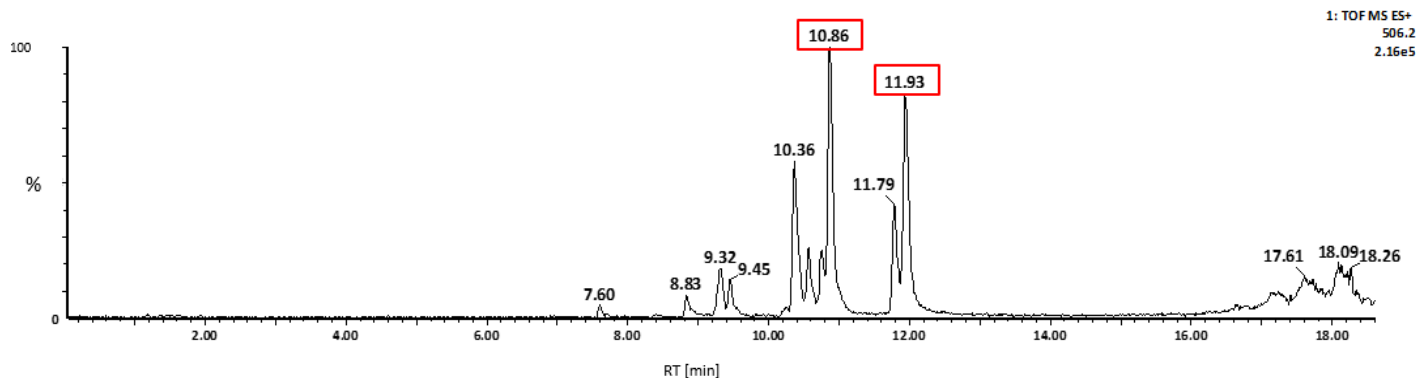
U testu ELAM je sledována prozánětlivá aktivita po aplikaci testovaných extraktů plastů. Zánět detekujeme pomocí markerů zánětu (ELAM) a ELISou. Kontrolou je médium s buňkami. Sloupce vyjadřují průměr a chybové úsečky znázorňují směrodatnou odchylku (extrakty plastů a KO-n=3).

★ Rozdíl mezi kontrolou a vzorkem houbičky je statisticky významný na hladině významnosti  $\alpha=0,05$ .

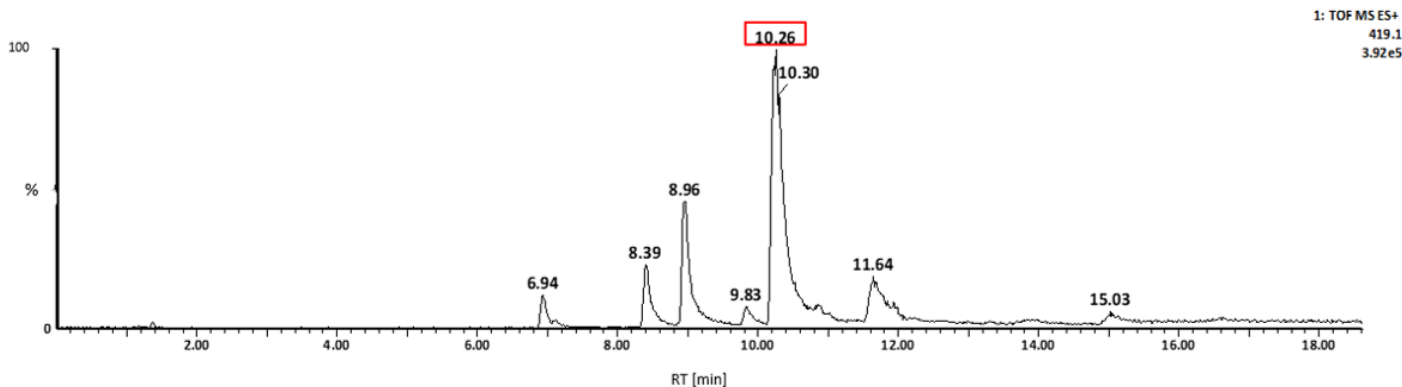
#### 4.4 Analýza vzorku houbičky pomocí UHPLC-MS

Vzorek houbičky na mytí nádobí byl analyzován pomocí UHPLC-MS. Výsledek testu cytotoxicity ukázal, že extrakt houbičky snižuje viabilitu buněk na 46,7 % a test ELAM potvrdil prozánětlivou aktivitu. Pomocí UHPLC-MS byla ověřována hypotéza, že v extraktu houbičky jsou přítomné extrahovatelné látky. K vyhodnocení byly použity chromatogramy pozitivního módu (ES+), které jsou na obrázcích 12 a 13.

V případě chromatogramu na obrázku 12 frakce obsahovala dvě hlavní látky s retenčními časy 10,86 min a 11,93 min, píky jsou ohraničeny červenými obdélníky. Chromatogram na obrázku 13 obsahoval látku s retenčním časem 10,26 min., pík je ohraničen červeným obdélníkem.



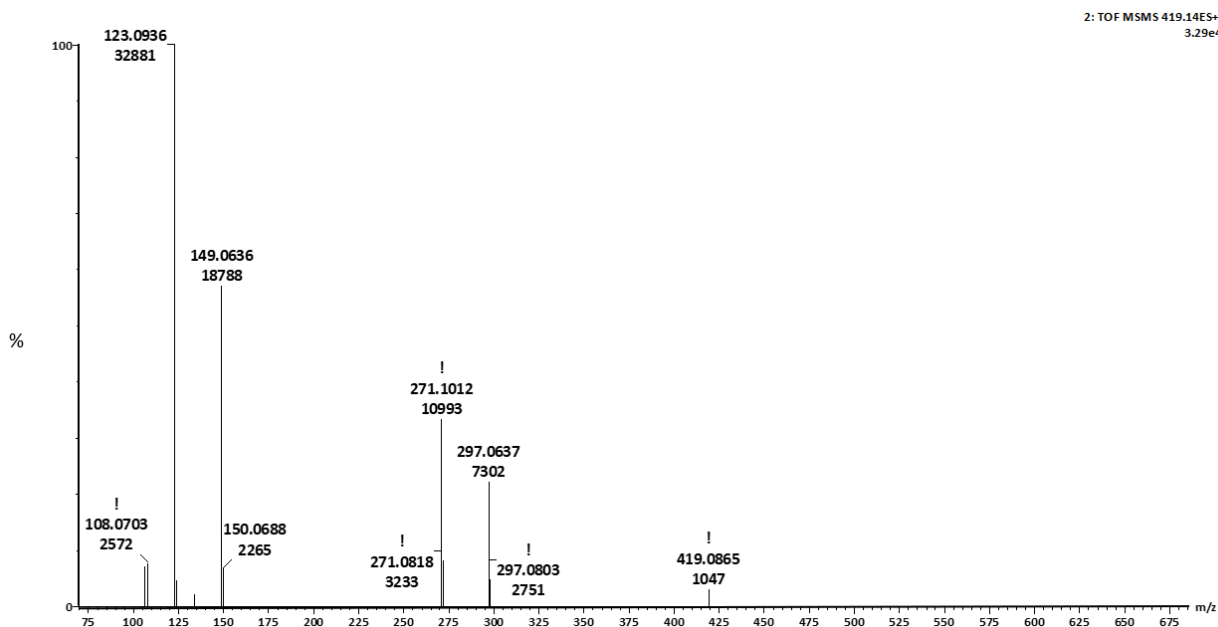
**Obr. 12** UHPLC-MS analýza extraktu houbičky. Je zobrazen Extracted ion chromatogram (EIC) pro  $m/z$  506 naměřené v pozitivním módu



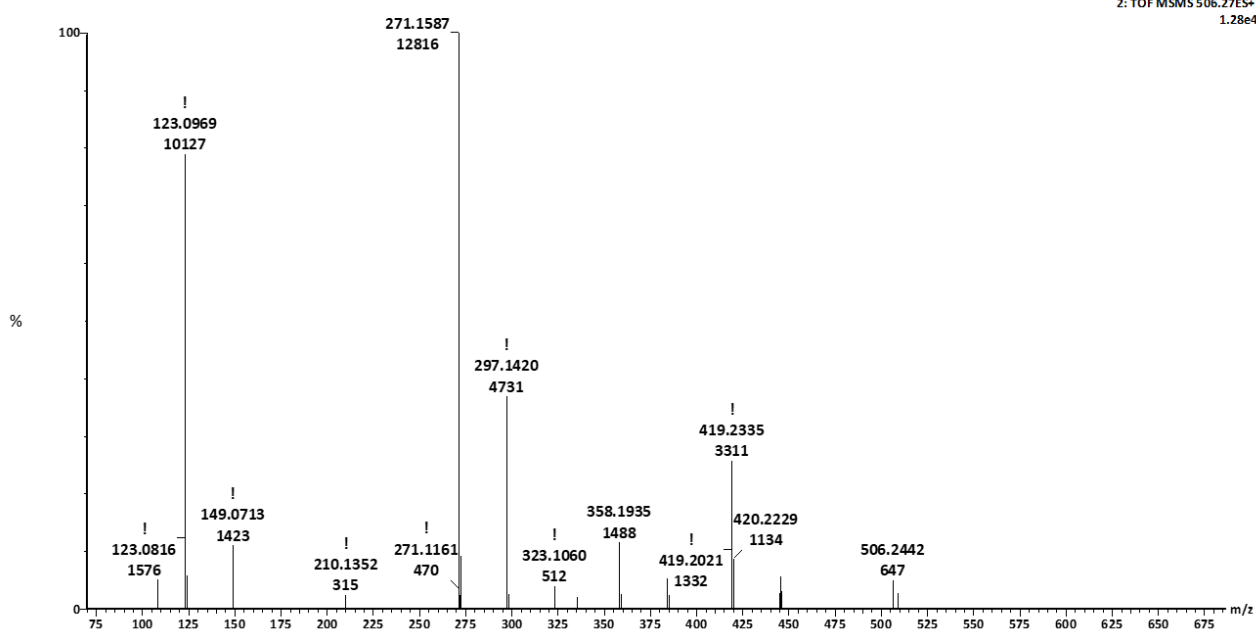
**Obr. 13** UHPLC-MS analýza extraktu houbičky. Je zobrazen EIC pro  $m/z$  419,1 naměřené v pozitivním módu

Na obrázku 14 je spektrum MS/MS v retenčním čase 10,18 min prekurzorového iontu  $m/z$  419,1, kde byly detekovány produktové ionty  $m/z$  123,09 a  $m/z$  271,1. Na druhém chromatogramu na obrázku 15 je MS/MS spektrum v retenčním čase 10,32 min prekurzorového iontu  $m/z$  506,2 s detekovanými produktovými ionty  $m/z$  123,09,  $m/z$  271,1 a  $m/z$  419,23.

Oba prekurzorové ionty poskytovaly produktový ion s  $m/z$  123,0936. Elementární složení tohoto iontu bylo určeno v software MassLynx jako  $C_7H_{10}N_2$ . S následnou předběžnou identifikací možná struktura odpovídá 2,4-diaminotoluenu (4 - methylbenzen - 1,3-diamin), který je meziproduktem při výrobě isokyanátů používající se při výrobě polyurethanu.



**Obr. 14** MS/MS spektrum prekurzorového iontu  $m/z$  419 v retenčním čase 10,18 min vzorku houbičky naměřené v pozitivním módu



**Obr. 15** MS/MS spektrum prekurzorového iontů  $m/z$  506 v retenčním čase 10,32 min vzorku houbičky naměřené v pozitivním módu

## 5. DISKUZE

Cílem bakalářské práce bylo testovat extrahovatelné látky z různých vzorků plastů a zjistit případnou cytotoxickou a prozánětlivou aktivitu. Výběr vzorků jsem se snažila udělat různorodý: od plastů, s kterými jsme běžně v kontaktu (brčko, houbička na mytí nádobí, zubní kartáček či dudlík), tak po plasty používané ve stavebnictví a průmyslu (tartan, elektrický kabel, polystyren, bublinková fólie a teflonová páska). Ještě jsem zahrнула do výběru psí hračku a vzorek pneumatiky. Z těchto vzorků jsem připravila extrakty, které byly přidávány k BJ buněčné linii (nenádorová linie kožních fibroblastů). Následně jsem pomocí barviva resazurinu, který se redukuje živými buňkami na resorufin, zjišťovala míru fluorescence a životaschopnost buněk.

Testováním extraktů plastů na BJ buněčné linii jsem zjistila, že netoxické vzorky byly extrakty dudlíku a Haribo sáčku. Tyto extrakty významně neovlivnily životaschopnost buněk (viabilita nad 90 %). Obzvláště u dudlíku je toto zjištění důležité (viabilita 102,3 %), neboť v běžném životě je v kontaktu s vnitřním prostředím úst dítěte a mohl by ovlivnit vývoj. Dudlíky obecně také patří do kategorie „Předmětu běžného užívání“ a řídí

se dle zákona o ochraně veřejného zdraví č. 350/2011 Sb. (Krajská hygienická stanice středočeského kraje; [http://www.khsstc.cz/obsah/predmet-cinnosti\\_17\\_1.html](http://www.khsstc.cz/obsah/predmet-cinnosti_17_1.html))

Vzorky brčka (viabilita 67,3 %) a haribo sáčku (viabilita 96%) musí splňovat podmínky pro styk s potravinami. Pro tyto materiály platí Nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) č. 1935/2004. V tomto nařízení jsou sepsány požadavky pro jednotlivé plastové materiály. Cytotoxicita není hlavním kritériem, hodnotí se migrace látek z plastů do potravin (Úřední věstník Evropské unie, <https://eur-lex.europa.eu>)

Nejvíce cytotoxický vzorek byl vzorek houbičky, který snížil viabilitu buněk na 46,7 %. Variabilita měření byla poměrně vysoká, a tudíž by bylo vhodné experiment zopakovat. V praxi to může znamenat uvolňování toxických látek do kanalizace, vodních toků a životního prostředí.

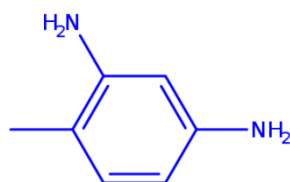
Testem ELAM jsem prokázala, že extrakt houbičky a částečně extrakt polystyrenu vykazovaly prozánětlivou aktivitu. Klasická měkká část houbička na mytí nádobí je z polyurethanu. Pokusy na myších ukázaly, že polyurethanové nanoplasty zvyšují akumulaci viscerálního tuku. Tuková tkáň vykazovala zánětlivý infiltrát (Silva et al., 2016). Ve studii Lu et al. (2018) uvádějí rizika požití polystyrénových mikročástic. Částice může být mikrobiálním stanovištěm, které může způsobit i zánět. (Lu et al., 2018). U embryí zebřičky pruhované byla zkoumána akumulace PS nanoplastů v organismu a toxická aktivita. Docházelo ke zvýšené produkci reaktivních druhů kyslíku a prozánětlivé odpovědi (Lee et al., 2019).

Vzorek houbičky na mytí nádobí byl testován pomocí UHPLC-MS. V EIC chromatogramech na obrázcích 12 a 13 bylo detekováno větší množství píku, které měly stejnou  $m/z$ . To může být způsobeno fragmentací oligomerů. Také u obou MS/MS spekter na obrázcích 14 a 15 je podobný produktový ion  $m/z$  123,09, a proto bylo určeno jeho elementární složení ( $C_7H_{10}N_2$ ) a pravděpodobná struktura (2,4-diaminotoluen).

Molekula 2,4-diaminotoluenu je pravděpodobně součástí větší extrahovatelné molekuly ze vzorku houbičky. 2,4-diaminotoluen je meziproduktem při výrobě polyurethanu, ze kterého se vyrábí i houbičky na mytí nádobí. Identifikace této látky dává smysl a nemusí být nahodilá. Z hlediska chemické bezpečnosti řadíme tuto látku do skupiny akutně toxických a dráždivých látek, ohrožující lidské zdraví a životní prostředí. Komerčně je využíván k výrobě barviv, polyurethanových pěn či stabilizátorů (PubChem Database, staženo 30.6.2020). Ve studii Séverin et al. (2005) se zabývali genotoxickým efektem této látky, který byl potvrzen. Pomocí Comet assay bylo dokázáno, že dochází k poškození DNA buněk jater a ledvin (Séverin et al., 2005). Další studie se zaměřily na karcinogenitu.



Experimenty s krysami a myšmi ukázaly, že 2,4-diaminotoluen se v těle rozkládá na reaktivní produkty, které interagují především s karboxylovými a amino skupinami proteinů a tím poškozují DNA informaci (Shanmugam et al., 2001).



**Obr. 16** Struktura 2,4-diaminotoluenu. Struktura převzata z: <https://www.reaxys.com/>

Dalšími testovanými plasty byly vzorky pneumatiky, elektrického kabelu a psí hračky, které se často vyrábí z PVC. V provedených testech vzorky nevykazovaly významnou aktivitu. Jiné výzkumy ale potvrdily uvolňování aditiv a mikročástic z PVC.

Příkladem může být infúzní sáček s krví ve farmacii, ne které se zaměřují studií Haned et al. (2018). Krev je ve styku s plastovým povrchem a látky-aditiva mohou migrovat. Infúzní sáčky jsou vyráběny z PVC skládající se asi ze 40 % DEHP (bis(ethylhexyl)-phalát). DEHP je považován jako toxická látka narušující reprodukční schopnosti a studií se potvrdila možná migrace do krve (Haned et al., 2018).

Uvolňování aditiv se týká také potravinářského průmyslu. Jednou z migrujících látek jsou chlorované parafíny přidávající se do obalů (Wang et al., 2019). Také z jedné studie zabývající se vakuovanými obaly s masem potvrdily migraci phalátů do potravin (Guerreiro et al., 2018).

## 6. ZÁVĚR

Teoretická část bakalářské práce charakterizuje plasty, jejich degradaci a zaměřuje se na zdravotní dopady u různých druhů organismů. Poukazuje na riziko přítomných rozpustných nízkomolekulárních látek v plastech.

V experimentální části byly stanoveny tři hlavní cíle: vyvinout vhodný extrakční postup a ověřit stálost/nerozpustnost plastů, resp. extrahovatelnost látek z plastových materiálů. Dalším cílem bylo zjistit, zdali extrahovatelné látky z plastů nemají vliv na růst buněk. Posledním cílem bylo testovat prozánětlivou aktivitu extrahovatelných látek z plastů.

K testování byly vybrány vzorky pneumatiky, tartanu, elektrického kabelu, brčka, haribo sáčku, polystyrenu, psí hračky, houbičky, bublinkové fólie, zubního kartáčku, dudlíku a teflonové pásky. Vzorky byly homogenizovány a extrahovány do DMSO.

U cytotoxického testu bylo zjištěno, že za netoxické vzorky můžeme považovat vzorky dudlíku a haribo sáčku. Většina vzorků mírně snižovala růst buněk, a proto by bylo vhodné experiment zopakovat. Nejvíce redukoval viabilitu buněk vzorek houbičky (46,7 %).

U testu ELAM byla pozorována prozánětlivá aktivita u vzorku houbičky a částečná u vzorku polystyrenu. Vzorek houbičky byl dále testován pomocí UHPLC-MS analýzy, která potvrdila přítomnost extrahovatelných látek. Pomocí software MassLynx bylo zjištěno elementární složení  $C_7H_{10}N_2$ . Struktura může být předběžně identifikována jako 2,4 – diaminotoluen, který je pravděpodobně součástí větší extrahovatelné molekuly ze vzorku houbičky. 2,4-diaminotoluen je meziproduktem při výrobě polyurethanu, ze kterého se vyrábí i houbičky na mytí nádobí.

Výsledky naznačují, že z plastů se mohou uvolňovat rozpustné nízkomolekulární látky, které mohou být rizikové pro životní prostředí a škodlivé pro lidské zdraví. Proto si myslím, že by bylo vhodné dále a intenzivněji zkoumat plasty, se kterými jsme v každodenním kontaktu.

## 7. POUŽITÁ LITERATURA

1. Al-Jaibachi R., Cuthbert R. N., Callaghan A. (2019) Examining effects of ontogenic microplastic transference on culex mosquito mortality and adult weight. *Sci. Total Environ.* **651**, 871-876.
2. Andrady A. L. (2003) *Plastics and the environment*, pp. 389-391, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
3. Andrady A. L. (2011) Microplastics in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* **62**, 1596-1605.
4. Astner A. F., Hayes D. G., O'Neill H., Evans B. R., Pingali S. V., Urban V. S., Young T. M. (2019) Mechanical formation of micro- and nano-plastic materials for environmental studies in agricultural ecosystems. *Sci. Total Environ.* **685**, 1097-1106.
5. Baucher J. a Friot D. (2017) *Primary microplastics in the Oceans: a Global Evaluation of Sources*, pp. 1-45, IUCN, Gland, Switzerland.
6. Baulch S. a Perry C. (2014) Evaluating the impacts of marine debris on cetaceans. *Mar. Pollut. Bull.* **80**, 210-221.
7. Benachour N. a Aris A. (2009) Toxic effects of low doses of bisphenol-a on human placental cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **241**, 322-328.
8. Boag A. H., Colby T. V., Fraire A. E., Kuhn C. I., Roggli V. L., Travis W. D., Vallyathan V. (1999) The pathology of interstitial lung disease in nylon flock workers. *The American Journal of Surgical Pathology* **23**, 1539.
9. Bombelli P., Howe C. J., Bertocchini F. (2017) Polyethylene bio-degradation by caterpillars of the wax moth galleria mellonella. *Curr. Biol.* **27**, R292-R293.
10. Brilliant M. a MacDonald B. (2002) Postingestive selection in the sea scallop (placopecten magellanicus) on the basis of chemical properties of particles. *Marine Biology* **141**, 457-465.
11. Brotons J. A., Olea-Serrano M. F., Villalobos M., Pedraza V., Olea N. (1995) Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ. Health Perspect.* **103**, 608-612.
12. Browne M. A., Dissanayake A., Galloway T. S., Lowe D. M., Thompson R. C. (2008) Ingested microscopic plastic translocates to the circulatory system of the mussel, mytilus edulis (l.). *Environ. Sci. Technol.* **42**, 5026-5031.
13. Burrige E. (2003) Bisphenol A: product profile. *Eur. Chem. News* **70**, 14-20.
14. Carraher CH. E. (2017) *Carraher's Polymer Chemistry* tenth edition, pp. 1-59, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
15. Cole M., Lindeque P. K., Fileman E., Clark J., Lewis C., Halsband C., Galloway T. S. (2016) Microplastics alter the properties and sinking rates of zooplankton faecal pellets. *Environ. Sci. Technol.* **50**, 3239-3246.

16. Coppock R. L., Galloway T. S., Cole M., Fileman E. S., Queirós A. M., Lindeque P. K. (2019) Microplastics alter feeding selectivity and faecal density in the copepod, *calanus helgolandicus*. *Sci. Total Environ.* **687**, 780-789.
17. Cosmetic Ingredient Review (vydáno 18.12.2012): Safety Assessment of Modified Terephthalate Polymers as Used in Cosmetics. [https://www.cir-safety.org/sites/default/files/ModTer\\_122012\\_Tent\\_faa\\_final%20for%20posting.pdf](https://www.cir-safety.org/sites/default/files/ModTer_122012_Tent_faa_final%20for%20posting.pdf); Staženo 2.12.2019
18. Derraik J. G. B. (2002) The pollution of the marine environment by plastic debris: A review. *Mar. Pollut. Bull.* **44**, 842-852.
19. Desforges J. P. W., Galbraith M., Ross P. S. (2015) Ingestion of microplastics by zooplankton in the northeast pacific ocean. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **69**, 320-330.
20. Dickman A. (1933) Studies on the waxmoth, *Galleria mellonella*, with particular reference to the digestion of wax by the larvae. *J. Cell. Comp. Physiol.* **3**, 223-246.
21. Donaldson K. a Tran C. L. (2002) Inflammation caused by particles and fibers. *Inhalation Toxicol.* **14**, 5-27.
22. Ebevele R. O. (2000) Polymer science and technology, pp. 31-248, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
23. EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain) (vydáno: 2016): Statement on the presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. *EFSA Journal* 2016; **14**( 6):4501, 30 pp. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/action/showCitFormats?doi=10.2903%2Fj.efsa.2016.4501> ; Staženo 5.2.2020
24. Encyklopedie Diderot (1999) Všeobecná encyklopedie v osmi svazcích (2, c/f), pp.98, Diderot, Praha, CZ.
25. Fellnerová Ivana (2020) Skripta Patofyziologie člověka: Zánik buňky. [https://zoologie.upol.cz/old/osoby/fellnerova/patofyziologie\\_pdf/1a\\_Apoptoza\\_Nekroza\\_2014\\_3\\_3.pdf](https://zoologie.upol.cz/old/osoby/fellnerova/patofyziologie_pdf/1a_Apoptoza_Nekroza_2014_3_3.pdf); Staženo 4.5.2020
26. Fossi M. C., Panti C., Guerranti C., Coppola D., Giannetti M., Marsili L., Minutoli R. (2012) Are baleen whales exposed to the threat of microplastics? A case study of the mediterranean fin whale (*Balaenoptera physalus*). *Mar. Pollut. Bull.* **64**, 2374-2379.
27. Gall S. C. a Thompson R. C. (2015) The impact of debris on marine life. *Mar. Pollut. Bull.* **92**, 170-179.
28. Gasperi J., Wright S. L., Dris R., Collard F., Mandin C., Guerrouache M., Langlois V., Kelly F. J., Tassin B. (2018) Microplastics in air: Are we breathing it in? *Current Opinion in Environmental Science & Health* **1**, 1-5.
29. GESAMP-Reports and studies GESAMP: Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection (vydáno 2016): Sources, fate and effects of microplastics in

- the marine environment: part two of a global assessment. (Kershaw, P.J., and Rochman, C.M., eds) No. 93. <http://www.gesamp.org/site/assets/files/1275/sources-fate-and-effects-of-microplastics-in-the-marine-environment-part-2-of-a-global-assessment-en.pdf>; Staženo 24.11.2019
30. Gewert B., Plassmann M. M., MacLeod M. (2015) Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environmental Science: Processes & Impacts* **17**, 1513-1521.
  31. Gijssman P., Meijers G., Vitarelli G. (1999) Comparison of the uv-degradation chemistry of polypropylene, polyethylene, polyamide 6 and polybutylene terephthalate. *Polym. Degrad. Stab.* **65**, 433-441.
  32. Grassie a Scott (1988) Polymer degradation and stabilisation. Cambridge University Press, Cambridge England, UK.
  33. Guerreiro T. M., de Oliveira D. N., Melo C. F. O. R., de Oliveira Lima E. a Catharino R. R. (2018) Migration from plastic packaging into meat. *Food Res. Int.* **109**, 320-324.
  34. Hamed M., Soliman H. A. M., Osman A. G. M., Sayed A. E. D. H. (2020) Antioxidants and molecular damage in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) after exposure to microplastics. *Environmental Science and Pollution Research* **27**, 14581-14588.
  35. Haned Z., Moulay S. a Lacorte S. (2018) Migration of plasticizers from poly(vinyl chloride) and multilayer infusion bags using selective extraction and GC-MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **156**, 80-87.
  36. Hansen ed. - Report Dánského technologického institutu (vydáno 15.1.2013): Hazardous substances in plastics materials (Hansen ed.) [https://www.byggemiljo.no/wp-content/uploads/2014/10/72\\_ta3017.pdf](https://www.byggemiljo.no/wp-content/uploads/2014/10/72_ta3017.pdf); Staženo 3.2.2020
  37. Halden R. U. (2010) Plastics and health risks. *Annu. Rev. Public Health* **31**, 179-194.
  38. Hoang T. C. a Felix-Kim M. (2020) Microplastic consumption and excretion by fathead minnows (*Pimephales promelas*): Influence of particles size and body shape of fish. *Sci. Total Environ.* **704**, 135433.
  39. Huang Y., Liu Q., Jia W., Yan C., Wang J. (2020) Agricultural plastic mulching as a source of microplastics in the terrestrial environment. *Environ. Pollut.* **260**, 114096.
  40. Hussain I. a Hamid H. (2003) Plastics in agriculture. In: *Plastics and the Environment*. (Andrady A. L. ed), pp. 185-209, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA.
  41. Kang J.-H., Kito K. a Kondo F. (2003) Factors influencing the migration of bisphenol A from cans. *J. Food Prot.* **66**, 1444-1447.
  42. Kedzierski M., D'Almeida M., Magueresse A., Le Grand A., Duval H., César G., Sire O., Bruzard S. a Le Tilly V. (2018) Threat of plastic ageing in marine environment. Adsorption/desorption of micropollutants. *Mar. Pollut. Bull.* **127**, 684-694.

43. Kishida M., McLellan M., Miranda J. A. a Callard G. V. (2001) Estrogen and xenoestrogens upregulate the brain aromatase isoform (p450aromb) and perturb markers of early development in zebrafish (*danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **129**, 261-268.
44. Kishikawa N. a Kuroda N. (2009) Evaluation of organic environmental pollutants detected in human milk. *J. Health Sci.* **55**, 1-10.
45. Kuśmierk N. a Popiołek M. (2020) Microplastics in freshwater fish from central european lowland river (Widawa r., SW Poland). *Environmental Science and Pollution Research* **27**, 11438-11442.
46. Laist D. W. (1987) Overview of the biological effects of lost and discarded plastic debris in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.* **18**, 319-32.
47. Laist D.W. (1997) Impacts of Marine Debris: Entanglement of Marine Life in Marine Debris Including a Comprehensive List of Species with Entanglement and Ingestion Records. In: Coe J.M., Rogers D.B. (eds) *Marine Debris. Springer Series on Environmental Management*. Springer, New York, NY.
48. Larson R. J. (1987) A note on the feeding, growth, and reproduction of the epipelagic scyphomedusa pelagia noctiluca (forskål). *Biological Oceanography* **4**, 447-454.
49. Law B. D., Bunn W. B., Hesterberg T. W. (1990) Solubility of polymeric organic fibers and manmade vitreous fibers in gambles solution. *Inhalation Toxicol.* **2** 321-339.
50. Lee K.W., Shim W. J., Kwon O. Y., Kang J.H. (2013) Size-dependent effects of micro polystyrene particles in the marine copepod tigrionus japonicus. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 11278-11283.
51. Lee W. S., Cho H.-J., Kim E., Huh Y. H., Kim H.-J., Kim B., Kang T., Lee J.-S. a Jeong J. (2019) Bioaccumulation of polystyrene nanoplastics and their effect on the toxicity of au ions in zebrafish embryos. *Nanoscale* **11**, 3173-3185.
52. Lu L., Wan Z., Luo T., Fu Z., Jin Y. (2018) Polystyrene microplastics induce gut microbiota dysbiosis and hepatic lipid metabolism disorder in mice. *Sci. Total Environ.* **631-632**, 449-458.
53. Luo T., Zhang Y., Wang C., Wang X., Zhou J., Shen M., Zhao Y., Fu Z., Jin Y. (2019) Maternal exposure to different sizes of polystyrene microplastics during gestation causes metabolic disorders in their offspring. *Environ. Pollut.* **255**, 113122.
54. Lusher A. L., Burke A., O'Connor I., Officer R. (2014) Microplastic pollution in the northeast atlantic ocean: Validated and opportunistic sampling. *Mar. Pollut. Bull.* **88**, 325-333.
55. Lusher A. L., O'Donnell C., Officer R., O'Connor I. (2015) Microplastic interactions with north atlantic mesopelagic fish. *ICES J. Mar. Sci.* **73**, 1214-1225.
56. Lusher A. L., Hernandez-Milian G., Berrow S., Rogan E., O'Connor I. (2018) Incidence of marine debris in cetaceans stranded and bycaught in ireland: Recent findings and a review of historical knowledge. *Environ. Pollut.* **232**, 467-476.

57. Macali A., Semenov A., Venuti V., Crupi V., D'Amico F., Rossi B., Corsi I., Bergami E. (2018) Episodic records of jellyfish ingestion of plastic items reveal a novel pathway for trophic transference of marine litter. *Sci Rep* **8**, 6105-6105.
58. Maia M. a Nunes F. M. (2013) Authentication of beeswax (*apis mellifera*) by high-temperature gas chromatography and chemometric analysis. *Food Chem.* **136**, 961-968.
59. Mamaca E., Bechmann R. K., Torgrimsen S., Aas E., Bjørnstad A., Baussant T., Floch S. L. (2005) The neutral red lysosomal retention assay and comet assay on haemolymph cells from mussels (*mytilus edulis*) and fish (*symphodus melops*) exposed to styrene. *Aquat. Toxicol.* **75**, 191-201.
60. Moore C. J., Moore S. L., Leecaster M. K., Weisberg S. B. (2001) A comparison of plastic and plankton in the north pacific central gyre. *Mar. Pollut. Bull.* **42**, 1297-1300.
61. Moore C. J. (2008) Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat. *Environ. Res.* **108**, 131-139.
62. Morrogh-Bernard H. C., Foitová I., Yeen Z., Wilkin P., de Martin R., Rárová L., Doležal K., Nurcahyo W. a Olšanský M. (2017) Self-medication by orang-utans (*pongo pygmaeus*) using bioactive properties of *dracaena cantleyi*. *Sci Rep* **7**, 16653.
63. Mrosovsky N., Ryan G. D., James M. C. (2009) Leatherback turtles: The menace of plastic. *Mar. Pollut. Bull.* **58**, 287-289.
64. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 2,4-Diaminotoluene, CID=7261. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2\\_4-Diaminotoluene#section=2D-Structure](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2_4-Diaminotoluene#section=2D-Structure); Staženo 30.6.2020
65. Nerland I. L., Halsband C., Allan I., Thomas K. V. REPORT-Norwegian Institute for Water Research (vydáno 5.11.2014): Microplastics in marine environments: Occurrence, distribution and effects. <https://www.miljodirektoratet.no/globalassets/publikasjoner/M319/M319.pdf>; Staženo 6.12.2019
66. Nizzetto L., Futter M., Langaas S. (2016) Are agricultural soils dumps for microplastics of urban origin? *Environ. Sci. Technol.* **50**, 10777-10779.
67. Park E. J., Han J. S., Park E. J., Seong E., Lee G. H., Kim D. W., Son H. Y., Han H. Y., Lee B. S. (2020) Repeated-oral dose toxicity of polyethylene microplastics and the possible implications on reproduction and development of the next generation. *Toxicol. Lett.* **324**, 75-85.
68. PlasticsEurope, market reports about the European plastics industry (vydáno 2012): Plastics – the Facts 2017, An analysis of European plastics production, demand and waste data for 2011. <https://www.plasticseurope.org/en/resources/publications/109-plastics-facts-2012>; Staženo 25.10.2019
69. PlasticsEurope, market reports about the European plastics industry (vydáno 2017): Plastics – the Facts 2017, An analysis of European plastics production, demand and waste data. <https://www.plasticseurope.org/en/resources/market-data>; Staženo 29.10. 2019

70. PlasticsEurope, market reports about the European plastics industry (vydáno 2018): Plastics – the Facts 2018, An analysis of European plastics production, demand and waste data. <https://www.plasticseurope.org/en/resources/market-data>; Staženo 12.2. 2020
71. Pospíšil J. a Nešpůrek S. (2000) Photostabilization of coatings. Mechanisms and performance. *Prog. Polym. Sci.* **25**, 1261-1335.
72. Pritchard G. (1998) Plastics additives, An A-Z reference, pp. 55-56, Springer Science+Business Media Dordrecht, Dordrecht, NL.
73. Rábová Z. (2008) Pakomáři jako model hodnocení toxicity sedimentů. Bakalářská práce, Masarykova univerzita v Brně Přírodovědecká fakulta, Česká republika. [https://is.muni.cz/th/hcq4u/bakalarska\\_prace.pdf](https://is.muni.cz/th/hcq4u/bakalarska_prace.pdf); Staženo 22.12.2019
74. Regoli F., Frenzilli G., Bocchetti R., Annarumma F., Scarcelli V., Fattorini D., Nigro M. (2004) Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquat. Toxicol.* **68**, 167-178.
75. Rochman C. M., Hoh E., Kurobe T., Teh S. J. (2013) Ingested plastic transfers hazardous chemicals to fish and induces hepatic stress. *Sci Rep* **3**, 3263.
76. Ruoko Teri-Petri (vydáno 24.6.2012): UV-light induced degradation of polypropylene and polystyrene – a spectroscopic and DSC study. Master od Science thesis, Tampere University of technology, Tampere, Finland. <https://trepo.tuni.fi/bitstream/handle/123456789/21157/Ruoko.pdf?sequence=4&isAllowed=y>; Staženo 23.11.2019
77. Sebille E., Wilcox C., Lebreton L., Maximenko N., Hardesty B., Van Franeker J., Eriksen M., Siegel D., Galgani F., Law K. (2015) A global inventory of small floating plastic debris. *Environmental Research Letters* **10**, 124006.
78. Séverin I., Jondeau A., Dahbi L. a Chagnon M.-C. (2005) 2,4-diaminotoluene (2,4-dat)-induced DNA damage, DNA repair and micronucleus formation in the human hepatoma cell line hepg2. *Toxicology* **213**, 138-146.
79. Schönfelder G., Wittfoht W., Hopp H., Talsness C. E., Paul M. a Chahoud I. (2002) Parent bisphenol a accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ. Health Perspect.* **110**, A703-A707.
80. Schug T. T., Janesick A., Blumberg B., Heindel J. J. (2011) Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **127**, 204-215.
81. Scott G. (1999) Polymers and the environment, pp. 1-2, RSC Paperbacks, Cambridge, UK.
82. Shanmugam K., Subrahmanyam S., Tarakad S. V., Kodandapani N., Stanly D., Souza F. (2001) 2,4-toluene diamines-their carcinogenicity, biodegradation, analytical techniques and an approach towards development of biosensors. *Anal. Sci.* **17**, 1369-1374.



83. Silva A. H., Locatelli C., Filippin-Monteiro F. B., Martin P., Liptrott N. J., Zanetti-Ramos B. G., Benetti L. C., Nazari E. M., Albuquerque C. A. C., Pasa A. A., Owen A. a Creczynski-Pasa T. B. (2016) Toxicity and inflammatory response in swiss albino mice after intraperitoneal and oral administration of polyurethane nanoparticles. *Toxicol. Lett.* **246**, 17-27.
84. Singh B. a Sharma N. (2008) Mechanistic implications of plastic degradation. *Polym. Degrad. Stab.* **93**, 561-584.
85. Smith M., Love D. C., Rochman C. M., Neff R. A. (2018) Microplastics in seafood and the implications for human health. *Current Environmental Health Reports* **5**, 375-386.
86. Statista, worldwide plastics production (vydáno 8.11.2018): Graph: Production of plastics worldwide from 1950 to 2018. <https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950/>; Staženo 29.10. 2019
87. Steer M., Cole M., Thompson R. C., Lindeque P. K. (2017) Microplastic ingestion in fish larvae in the western english channel. *Environ. Pollut.* **226**, 250-259.
88. Stoker C., Rey F., Rodriguez H., Ramos J. G., Sirosky P., Larriera A., Luque E. H. a Muñoz-de-Toro M. (2003) Sex reversal effects on caiman latirostris exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol a. *Gen. Comp. Endocrinol.* **133**, 287-296.
89. Summers J. W. a Rabinovitch E.B. (1999) Weathering of Plastics, pp. 61-68, Elsevier, Amsterdam, NL.
90. Sundt P., Syversen F., Skogesal O., Schulze P.-E. Report společnosti MEPEX (April 2016): Primary microplastic-pollution: Measures and reduction potentials in Norway. <https://www.miljodirektoratet.no/globalassets/publikasjoner/M545/M545.pdf>; Staženo 1.12.2019
91. Turner J. T. T. (2002) Zooplankton fecal pellets, marine snow and sinking phytoplankton blooms. *Aquat. Microb. Ecol.* **27**, 57-102.
92. UNEP (United Nations Environment Programme) Report Plastic on Cosmetics (vydáno 2015): Plastic in Cosmetics. Are we polluting the environment through our personal care? Plastic ingredients that contribute to marine microplastic litter. [http://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/9664/-Plastic\\_in\\_cosmetics\\_Are\\_we\\_polluting\\_the\\_environment\\_through\\_our\\_personal\\_care\\_-2015Plas.pdf?sequence=3&isAllowed=y](http://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/9664/-Plastic_in_cosmetics_Are_we_polluting_the_environment_through_our_personal_care_-2015Plas.pdf?sequence=3&isAllowed=y); Staženo 2.12.2019
93. Vandenberg L. N., Maffini M. V., Sonnenschein C., Rubin B. S. a Soto A. M. (2009) Bisphenol-a and the great divide: A review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr. Rev.* **30**, 75-95.
94. Vom Saal F. S. a Hughes C. (2005) An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol a shows the need for a new risk assessment. *Environ. Health Perspect.* **113**, 926-933.

95. Wang C., Gao W., Liang Y., Jiang Y., Wang Y., Zhang Q. a Jiang G. (2019) Migration of chlorinated paraffins from plastic food packaging into food simulants: Concentrations and differences in congener profiles. *Chemosphere* **225**, 557-564.
96. Zhang J., Gao D., Li Q., Zhao Y., Li L., Lin H., Bi Q., Zhao Y. (2020) Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus aspergillus flavus from the guts of wax moth galleria mellonella. *Sci. Total Environ.* **704**, 135931.