

## **Наставно-научном већу Универзитета у Београду – Хемијског факултета**

Молим Наставно-научно веће Универзитета у Београду – Хемијског факултета да одобри пријаву теме докторске дисертације под називом:

**„Развој, валидација и примена аналитичког протокола за изоловање и карактеризацију микропластичних честица у узорцима људског фецеса“**

Образложење теме:

**1. Научна област:** Хемијске науке

**Ужа научна област:** Аналитичка хемија

### **2. Предмет научног истраживања**

Предмет научног истраживања ове докторске дисертације је развој, оптимизација и валидација аналитичког протокола за изоловање микропластичних честица из узорака људског фецеса, као комплексног биолошког материјала богатог органском материјом и влакнима.

Истраживање обухвата систематско испитивање и оптимизацију поступка дигестије узорака ради ефикасног уклањања органске материје уз очување интегритета микропластичних честица. Посебна пажња биће посвећена примени селективних хемијских претретмана за уклањање целулозне компоненте биолошког материјала, као и комбинацији хемијских, ензимских и оксидативних поступака дигестије, са циљем унапређења ефикасности изоловања микропластичних честица из узорака људског фецеса.

Валидација предложене методе обухватиће процену ефикасности дигестије (степен уклањања органске материје), процену ефикасности опоравка микропластичних честица (recovery) применом микропластичних материјала познатих карактеристика, као и процену утицаја комплетног поступка дигестије на очуваност хемијске структуре и морфолошких карактеристика различитих полимерних материјала. Очуваност полимерне структуре микропластике процењиваће се применом инфрацрвене спектроскопије са Фуријевом трансформацијом ( $\mu$ -FTIR), као и одговарајућих микроскопских техника.

Други део истраживања заснива се на примени оптимизованог и валидираног протокола на узорцима људског фецеса прикупљеним у клиничким условима у Дечјој болници Сребрњак у Загребу (Република Хрватска), у оквиру међународног пројекта IMPTOX. Испитаници потичу са три географска подручја (Загреб, Славонија и Далмација). У наведеним узорцима одређиваће се присуство, бројност и полимерни састав микропластичних честица.

Главни циљ истраживања је успостављање поуздане, поновљиве и аналитички валидиране методе за изоловање микропластичних честица из узорака људског фецеса, као и демонстрација њене применљивости у анализи реалних хуманих узорака, што представља основу за будућа истраживања изложености и биомониторинга.

Етички одбор Дечје болнице Сребрњак у Загребу (Република Хрватска) одобрио је спровођење научноистраживачког пројекта „EU H2020 IMPTOX – An innovative analytical platform to investigate the effect and toxicity of micro and nano plastics combined with environmental contaminants on the risk of allergic diseases in preclinical and clinical studies“, финансираног у оквиру програма Horizon 2020 (Grant agreement No. 965173), одлуком од 19.10.2021. године (KLASA: 100-02/21-01; Ur.broj: 04-930/3-21).

Етичка комисија за употребу хуманог биолошког материјала за истраживање Универзитета у Београду – Хемијског факултета донела је одлуку о одобрењу коришћења биолошког материјала фецеса у оквиру академске студије „Испитивање садржаја микропластике у узорцима столице дечје популације“, одлука број 1-10/23 од 11.10.2023. године.

Истраживање се спроводи у складу са одредбама Хелсиншке декларације, важећим законодавством Републике Хрватске и Републике Србије, као и Општом уредбом о заштити података (GDPR). Од свих испитаника, односно родитеља/старатеља малолетних испитаника, прибављен је информисани пристанак у складу са одобреним протоколом студије.

У прилогу пријаве теме докторске дисертације достављају се наведене етичке одлуке на увид.

### **3. Основне хипотезе**

Микропластика настаје разградњом и фрагментацијом макропластике под утицајем природних и антропогених фактора [1]. Микропластичне честице ушле су у ланац исхране и детектоване су у различитим прехранбеним производима и морским организмима који се користе у људској исхрани [2]. Главни пут изложености људи микропластици је гутање, а њено присуство потврђено је и у људском организму, укључујући узорке фецеса [3,4].

Људски фецес представља погодан и неинвазиван узорак за процену изложености микропластици која се уноси храном. Међутим, анализа микропластике у оваквом биолошком материјалу представља значајан аналитички изазов услед сложеног састава и високог садржаја органске материје. Постојећи поступци изоловања микропластике из фецеса заснивају се на вишестепеним и често агресивним третманима [5,6], што може довести до физичких и хемијских промена полимерних честица.

С обзиром на то да целулоза представља значајну компоненту органске материје фецеса и показује отпорност на уобичајене поступке дигестије, развој селективнијег приступа њеном уклањању може представљати кључни корак у унапређењу аналитичке поузданости. Растварање целулозе у одређеним алкалним системима показало је потенцијал у олакшавању уклањања органске материје из различитих биолошких материјала [7]. Швајцеров реагенс (Schweizer's reagent), који се састоји од бакар(II)-хидроксида у амонијачном раствору [8], већ је примењен у припреми водених узорака за анализу микропластике [9], али његова примена у биолошким материјалима богатим целулозом није довољно испитана.

Имајући у виду наведене методолошке изазове, ова докторска дисертација полази од претпоставке да је могуће развити аналитички приступ заснован на селективном растварању целулозе у комбинацији са оптимизованим условима дигестије, који ће омогућити ефикасно уклањање органске матрице уз очување интегритета микропластичних честица и поуздану идентификацију полимера применом  $\mu$ -FTIR спектроскопије.

#### **4. Циљ истраживања и очекивани резултати**

У оквиру предложене докторске дисертације планира се развој, оптимизација и аналитичка валидација протокола за изоловање, идентификацију и карактеризацију микропластичних честица из комплексних биолошких матрикса, са посебним фокусом на узорке људског фецеса као погодног неинвазивног материјала за биомониторинг оралне изложености микропластици.

Научни циљеви ове докторске дисертације обухватиће:

- развој и оптимизацију поступка селективног уклањања целулозно-богате органске материје применом одговарајућих реагенаса и контролисаних услова благе дигестије, ради ефикасног изоловања микропластике без деградације полимера;
- систематско испитивање и поређење различитих приступа претретмана и дигестије узорака, као и оптимизацију параметара протокола у циљу постизања високе ефикасности уклањања биолошког материјала и задовољавајућег степена опоравка (recovery) микропластичних честица;
- карактеризацију изолованих честица у погледу полимерног типа, расподеле величине, морфологије и бројности, као и процену применљивости развијеног протокола у сврхе биомониторинга;
- примена оптимизованог и валидираног протокола на реалне клиничке узорке ради процене потенцијала методе за будућа истраживања изложености и биомониторинга.

Очекује се да резултати ове докторске дисертације доведу до:

- успостављања стандардизованог аналитичког протокола за рад са узорцима људског фецеса у контексту анализе микропластике;
- дефинисања валидационих параметара методе (ефикасност дигестије, степен опоравка, поновљивост и робусност);
- добијања поузданих података о присуству, бројности и полимерном саставу микропластике у анализираним узорцима;
- доприноса унапређењу аналитичких приступа за испитивање микропластике у комплексним биолошким материјалима;
- постављања научне основе за даља истраживања изложености људи микропластиком.

## **5. Методе истраживања**

За предложена истраживања узорци су прикупљени у Дечјој болници Сребрњак у Загребу (Република Хрватска), у оквиру одобреног протокола међународног пројекта IMPTOX. Испитаници ће обухватити три географска подручја Републике Хрватске (Загреб, Далмацију и Славонију), у циљу испитивања потенцијалних географских варијација у присуству микропластичних честица.

У оквиру развоја аналитичког протокола биће испитани различити приступи уклањању целулозно-богате органске матрице, укључујући примену реагенса за растварање целулозе, као и комбинације алкалне, ензимске, киселе и оксидативне дигестије. Планирано је поређење више протокола у погледу ефикасности уклањања органске материје, трајања поступка и очувања интегритета микропластичних честица.

Оптимизација ће обухватити варирање односа масе узорка и запремине реагенса, времена реакције и редоследа дигестионих корака, са циљем постизања максималног уклањања матрикса уз минималан утицај на хемијску и морфолошку структуру полимера.

У циљу минимизације секундарне контаминације микропластиком, примењиваће се контролни узорци (procedural blanks), рад у контролисаним лабораторијским условима, као и употреба стакленог и металног лабораторијског посуђа где год је то могуће.

Ефикасност уклањања органске материје процењиваће се на основу степена редукције биолошког материјала након примене различитих дигестионих услова, док ће се степен опоравка (recovery) микропластичних честица одређивати применом контролисаних експеримената са полимерним материјалима познатог састава и величине.

За идентификацију и хемијску карактеризацију изолованих микропластичних честица користиће се инфрацрвена спектроскопија са Фуријеовом трансформацијом ( $\mu$ -FTIR), при чему ће услови снимања бити оптимизовани у циљу обезбеђивања поуздане идентификације полимера на основу спектралног поклапања са референтним библиотекама.

Квантификација микропластичних честица изражаваће се као број честица по граму узорка (честице/g), уз класификацију према типу полимера, величини и морфологији (фрагменти, влакна и сл.).

За статистичку обраду и тумачење резултата примењиваће се дескриптивна статистика, једнофакторска анализа варијансе (ANOVA) са Tukey HSD post-hoc тестом, анализа резидуала, тест нормалности резидуала, тест хомоскедастичности, тест независности случајева и тестирање еквивалентности, у складу са карактеристикама добијених података.

## 6. Литература

- [1] Meng X, Yuan J, Huang Q, Liu R, Yang Y, Yang X, et al. A Review of Sources, Hazards, and Removal Methods of Microplastics in the Environment. *Water* 2025;17:102. <https://doi.org/10.3390/w17010102>
- [2] Di Fiore C, Carriera F, Russo MV, Avino P. Are Microplastics a Macro Issue? A Review on the Sources of Contamination, Analytical Challenges and Impact on Human Health of Microplastics in Food. *Foods* 2023;12:3915. <https://doi.org/10.3390/foods12213915>
- [3] Nawab A, Ahmad M, Khan MT, Nafees M, Khan I, Ihsanullah I. Human exposure to microplastics: A review on exposure routes and public health impacts. *Journal of Hazardous Materials Advances* 2024;16:100487. <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2024.100487>
- [4] Schwabl P, Köppel S, Königshofer P, Bucsics T, Trauner M, Reiberger T, et al. Detection of Various Microplastics in Human Stool: A Prospective Case Series. *Ann Intern Med* 2019;171:453–7. <https://doi.org/10.7326/M19-0618>
- [5] Hartmann C, Lomako I, Schachner C, El Said E, Abert J, Satrapa V, et al. Assessment of microplastics in human stool: A pilot study investigating the potential impact of diet-associated scenarios on oral microplastics exposure. *Science of The Total Environment* 2024;951:175825. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.175825>
- [6] Yan Z, Zhao H, Zhao Y, Zhu Q, Qiao R, Ren H, et al. An efficient method for extracting microplastics from feces of different species. *Journal of Hazardous Materials* 2020;384:121489. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121489>

- [7] Olsen LMB, Knutsen H, Mahat S, Wade EJ, Arp HPH. Facilitating microplastic quantification through the introduction of a cellulose dissolution step prior to oxidation: Proof-of-concept and demonstration using diverse samples from the Inner Oslofjord, Norway. *Marine Environmental Research* 2020;161:105080. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.105080>
- [8] Dias YJ, Kolbasov A, Sinha-Ray S, Pourdeyhimi B, Yarin AL. Theoretical and experimental study of dissolution mechanism of cellulose. *Journal of Molecular Liquids* 2020;312:113450. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.113450>
- [9] Ochoa L, Chan J, Auguste C, Arbuckle-Keil G, Fahrenfeld NL. Stormwater runoff microplastics: Polymer types, particle size, and factors controlling loading rates. *Science of The Total Environment* 2024;929:172485. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2024.172485>