

# Epigenetički i razvojni parametri u posteljicama ženki štakora izloženih alfa-cipermetrinu tijekom gestacije

---

**Petrina, Petra**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:436468>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-18**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Petra Petrina

**Epigenetički i razvojni parametri u  
posteljicama ženki štakora izloženih  
 $\alpha$ -cipermetrinu tijekom gestacije**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Petra Petrina

**Epigenetic and developmental parameters in  
placentas of rats exposed to  $\alpha$ -cypermethrin  
during gestation**

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen u Jedinici za toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu te u Laboratoriju za epigenetiku i molekularnu medicinu Zavoda za biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Anje Katić i izv. prof. dr. sc. Inge Urlić. Diplomski rad je izrađen u okviru internog projekta Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada *Procjena učinaka prenatalne izloženosti  $\alpha$ -cipermetrinu na epigenetičko programiranje i endokrinu disrupciju reprodukcije i razvoja pokusnih štakora* (voditelj: dr. sc. Anja Katić). Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra molekularne biologije.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Epigenetički i razvojni parametri u posteljicama ženki štakora izloženih $\alpha$ -cipermetrinu tijekom gestacije

Petra Petrina

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Alfa-cipermetrin je piretroidni insekticid tipa II, široko korišten u poljoprivredi, kućanstvima i veterini. Istraživanjima je dokazano djelovanje piretroida kao endokrinih disruptora. Zbog zastupljenosti velikog broja hormonskih receptora, posteljica je posebno osjetljiva na učinke ovakvih spojeva. Cilj ovog istraživanja bio je po prvi puta istražiti učinak  $\alpha$ -cipermetrina na globalnu metilaciju DNA, rast i apoptozu stanica te histopatološke promjene u posteljicama ženki štakora izloženih  $\alpha$ -cipermetrinu peroralno tijekom gestacije. U tu svrhu je metodom pirosekvenciranja analiziran postotak metilacije tri CpG dinukleotida unutar ponavljajućih sekvenci LINE-1, imunohistokemijskom metodom analizirana je ekspresija fosforiliranog histona H3 kao proliferacijskog markera te pocijepane kaspaze-3 kao apoptotskog markera, te je napravljena histopatološka analiza. S porastom doze  $\alpha$ -cipermetrina ne dolazi do statistički značajnog smanjenja globalne metilacije DNA. Pri testiranim koncentracijama  $\alpha$ -cipermetrin ne uzrokuje apoptozu, ali u koncentracijama od 10 i 19 mg/kg/dan dovodi do statistički značajnog smanjenja proliferacije. Rezultati histopatološke analize pokazali su brojne promjene u tkivu posteljice, koje također nisu bile statistički značajno različite u odnosu na kontrolne skupine. Potrebno je provesti dodatna istraživanja u svrhu boljeg razumijevanja djelovanja  $\alpha$ -cipermetrina kao endokrinih disruptora na epigenetičke i razvojne parametre u posteljicama ženki štakora izloženih tijekom gestacije.

Ključne riječi: endokrinih disruptora, histopatologija, imunohistokemija, piretroid, pirosekvenciranje, skotne ženke štakora

(50 stranica, 20 slika, 13 tablica, 87 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: dr. sc. Anja Katić

Mentor: izv. prof. dr. sc. Inga Urlić

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Inga Urlić

Izv. prof. dr. sc. Maja Matulić

Prof. dr. sc. Biljana Balen

Rad prihvaćen: 31. ožujka 2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

### Epigenetic and developmental parameters in placentas of rats exposed to $\alpha$ -cypermethrin during gestation

Petra Petrina

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Alpha-cypermethrin is a type II pyrethroid pesticide, widely used in agriculture, households and veterinary medicine. Research has shown that pyrethroids act as endocrine disruptors. Due to the abundance of hormone receptors, the placenta is highly sensitive to these compounds. The aim of this research was to investigate for the first time the effects of  $\alpha$ -cypermethrin on global DNA methylation, growth, apoptosis and histopathological changes in placentas of female rats exposed orally during gestation. For this purpose, the methylation level of three CpG dinucleotides within LINE-1 repeats was analyzed by pyrosequencing, protein expression of phosphorylated histone H3 as a marker of proliferation and cleaved caspase-3 as a marker of apoptosis were detected by immunohistochemistry and a histopathological analysis was performed. The increase of  $\alpha$ -cypermethrin dosage isn't followed by a statistically significant decrease in global DNA methylation. Alpha-cypermethrin doesn't induce apoptosis at tested concentrations, but at concentrations of 10 and 19 mg/kg/day significantly decreases cell proliferation. Many histopathological changes were detected in placentas, but their occurrence wasn't statistically significant in comparison with control groups. Further research is needed to better understand the effects of  $\alpha$ -cypermethrin as an endocrine disruptor on epigenetic and developmental parameters in placentas of female rats exposed during gestation.

Keywords: endocrine disruption, histopathology, immunohistochemistry, pyrethroid, pyrosequencing, pregnant female rats  
(50 pages, 20 figures, 13 tables, 87 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Anja Katić, PhD

Mentor: Assoc. prof. Inga Urlić, PhD

Reviewers:

Assoc. Prof. Inga Urlić, PhD

Assoc. Prof. Maja Matulić, PhD

Prof. Biljana Balen, PhD

Thesis accepted: March 31<sup>st</sup>, 2022.

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Endokrini disruptori .....	1
1.1.1. Epigenetički mehanizmi i posteljica.....	3
1.2. Alfa-cipermetrin .....	4
1.3. Dietilstilbestrol .....	6
1.4. Posteljica .....	7
2. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	10
3. MATERIJALI I METODE.....	11
3.1. Eksperimentalne životinje i uzorkovanje tkiva .....	11
3.2. Analiza metilacije ponavljajućih sljedova LINE-1 .....	12
3.2.1. Izolacija DNA iz svježeg tkiva .....	12
3.2.2. Bisulfitna konverzija .....	12
3.2.3. Lančana reakcija polimerazom nakon bisulfitne konverzije genomske DNA .....	13
3.2.4. Pirosekvenciranje.....	15
3.3. Imunohistokemijska analiza apoptotskog i proliferacijskog markera.....	17
3.3.1. Fiksacija, uklapanje i rezanje tkiva posteljice.....	17
3.3.2. Imunohistokemija .....	18
3.4. Histopatološka analiza posteljica .....	19
3.5. Mikroskopija.....	20
3.6. Statistička obrada podataka .....	21
4. REZULTATI .....	22
4.1. Epigenetičke analize .....	22
4.1.1. Provjera uspješnosti lančane reakcije polimerazom.....	22
4.1.2. Provjera kvalitete bisulfitne konverzije .....	23
4.1.3. Obrazac globalne metilacije DNA u posteljici.....	24
4.2. Imunohistokemijske analize .....	27
4.2.1. Ekspresija histona H3 fosforiliranog na položajima S10 i T11.....	27
4.2.2. Ekspresija pocijepane kaspaze-3.....	30
4.3. Histopatološke analize.....	31
5. RASPRAVA .....	37
6. ZAKLJUČAK.....	40
7. LITERATURA .....	41
8. ŽIVOTOPIS .....	50

## POPIS KRATICA:

APS	adenozin-5-fosfosulfat
ATP	adenozin trifosfat
BSA	albumin iz goveđeg seruma
DAB	3,3'-diaminobenzidin
DG	dan graviditeta
dNTP	deoksiribonukleozid-trifosfat
LINE-1	eng. <i>Long interspersed nuclear element-1</i>
LOAEL	eng. <i>Lowest Observed Adverse Effect Level</i>
NOAEL	eng. <i>No Observed Adverse Effect Level</i>
PCR	lančana reakcija polimerazom
RT	sobna temperatura
TBS	eng. <i>tris-buffered saline</i>

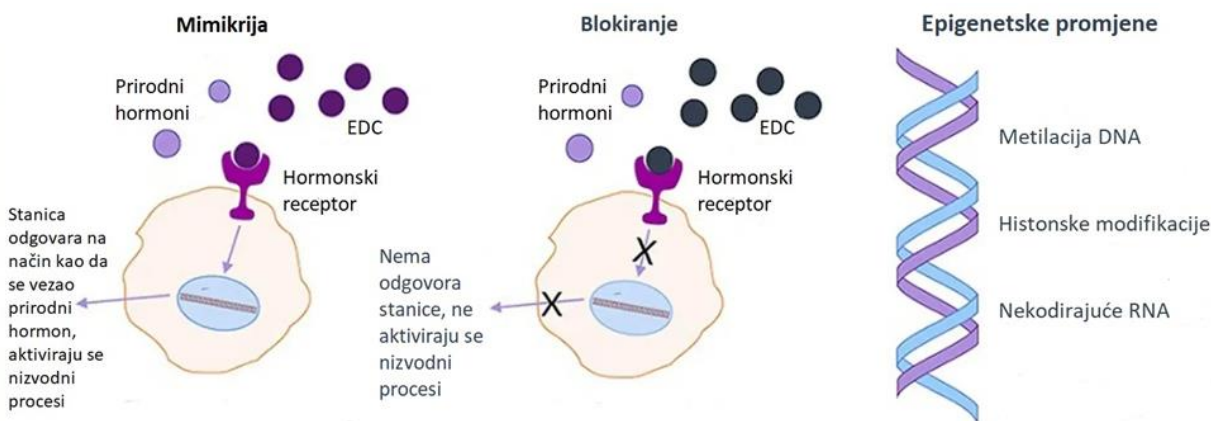


# 1. UVOD

Nakon otkrića diklordifeniltrikloroetana (eng. *dichlorodiphenyltrichloroethane*, DDT) 1939. godine, proizvedeni su brojni pesticidi u svrhu korištenja u poljoprivredi. Njihovi indirektni učinci na ljudsko zdravlje su pozitivni; korištenje pesticida pomaže kontrolirati prijenosnike bolesti biljaka, stoke, ali i ljudi. Istovremeno omogućuju povećanu proizvodnju hrane te sigurnu opskrbu populacije hranom (Cooper i Dobson, 2007). Međutim, u međuvremenu je dokazano da su brojni pesticidi štetni za okoliš. Neki od ovih spojeva zadržavaju se u tlu i vodenom okolišu te s vremenom dolazi do njihovog nakupljanja u tkivima beskralježnjaka i kralježnjaka (Mnif i sur., 2011). Također je dokazano da mnogi često korišteni pesticidi mogu djelovati kao endokrini disruptori (eng. *endocrine disrupting chemicals*, EDC) (Andersen i sur., 2002; Kojima i sur., 2004). Nakon što je otkriveno da mogu imati štetne učinke na zdravlje ljudi i životinja, neke od njih, kao što su DDT i atrazin, brojne su države povukle iz uporabe, ali se i dalje mogu naći u mjerljivim koncentracijama u okolišu (Mnif i sur., 2011).

## 1.1. Endokrini disruptori

Endokrini disruptori (eng. *endocrine disrupting chemicals*) su egzogene tvari ili smjese tvari koje mijenjaju funkciju/funkcije endokrinog sustava i time dovode do štetnih učinaka na zdravlje zdravog organizma, njegovog potomstva ili (pod)populacija (WHO-IPCS, 2002). Izvori izloženosti endokrinim disruptorima su raznoliki i široko rasprostranjeni u svakodnevnom životu. Većina endokrinih disruptora je sintetskog porijekla te se koriste u plastici, kozmetičkim proizvodima, farmaceutskim proizvodima te u poljoprivredi kao pesticidi (Monneret, 2017). Endokrini disruptori svojim djelovanjem mogu utjecati na regulaciju i stabilnost čitavog endokrinog sustava (Tang i sur., 2020). Glavni mehanizmi djelovanja su vezanje na androgene ili estrogene receptore te putem epigenetičkih promjena (Slika 1) (Tabb i Blumberg, 2006). Vezanjem na hormonske receptore mogu aktivirati nizvodne procese te na taj način imitirati djelovanja prirodnih hormona. Neki od ovih spojeva pak imaju antagonističko djelovanje, odnosno vežu se na hormonske receptore bez da ih aktiviraju. Na ovaj način onemogućavaju vezanje hormona na ciljne receptore te inhibiraju njihovo djelovanje (Mnif i sur., 2011).



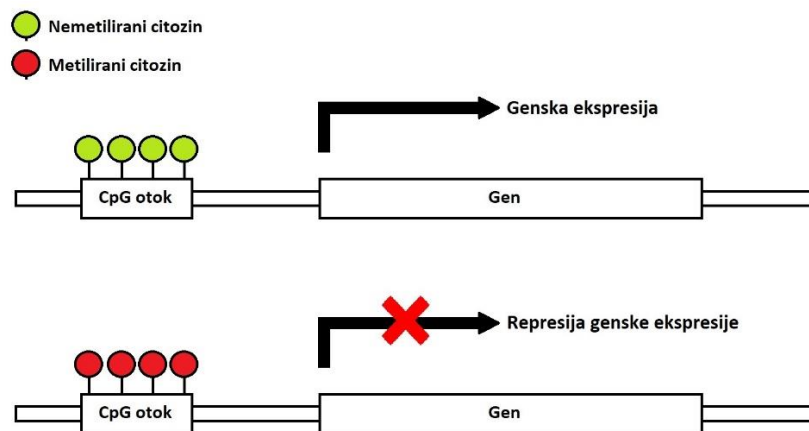
Slika 1. Mehanizmi djelovanja endokrinih disruptora. EDC – endokrini disruptori.

(Preuzeto i modificirano prema <https://diethylstilbestrol.co.uk/endocrine-disruption-oestrogen-action/>)

Prisutnost endokrinih disruptora otkrivena je u serumu, amnionskoj tekućini, mlijeku te urinu trudnica (Shekhar i sur., 2017; Maitre i sur., 2018). Poznato je da normalno funkcioniranje svih organskih sustava ovisi o endokrinim faktorima, a mali poremećaji u endokrinoj funkciji mogu imati ozbiljne i trajne posljedice, posebno u određenim fazama životnog ciklusa kao što su trudnoća i razvoj fetusa (Kavlock i sur., 1996). Organizam u razvoju može biti indirektno izložen endokrinim disruptorima nakon izloženosti majke hranom, preko kože ili dišnih puteva za vrijeme trudnoće (Tang i sur., 2020). Howard Bern je 1992. godine u ulomku naslovljenom *The Fragile Fetus* opisao osjetljivost fetusa u razvoju na utjecaje spojeva koji utječu na endokrini sustav (Bern, 1992). U ovom osjetljivom razdoblju odvija se brza proliferacija, diferencijacija te migracija stanica, kao i kompleksno stanično signaliziranje. Također, činjenice da fetusi imaju brži metabolizam, nepotpuno razvijen imunološki sustav i mehanizme detoksikacije čine ih posebno osjetljivima na učinke endokrinih disruptora (Bern, 1992). Za razliku od izloženosti u odrasloj dobi, koja najčešće rezultira reverzibilnim promjenama, izloženost štetnim spojevima za vrijeme kritičnih faza razvoja i diferencijacije može uzrokovati ireverzibilne i dugotrajne posljedice na zdravlje jedinke (Newbold, 2004). Posteljica za fetus predstavlja važnu zaštitnu barijeru od štetnih spojeva kojima je majka izložena za vrijeme trudnoće (Tang i sur., 2020). Međutim, endokrini disruptori mogu proći tu barijeru, nakupljati se u tkivu posteljice te indirektno utjecati na fetus u razvoju (Murphy i sur., 2006).

### 1.1.1. Epigenetički mehanizmi i posteljica

Epigenetske promjene predstavljaju najvjerojatniji mehanizam kojim okolišni čimbenici utječu na ishod trudnoće (Sundrani i sur., 2011). Kao tkivo koje je najviše izloženo okolišnim faktorima za vrijeme trudnoće, u posteljici je moguće najizglednije dokazati njihove eventualne štetne učinke (Novakovic i Saffery, 2012). Epigenetika je područje koje proučava promjene u ekspresiji gena koje nisu uvjetovane promjenama u samoj sekvenci DNA (Bird, 2007). Glavni načini epigenetske regulacije ekspresije gena su metilacija DNA, histonske modifikacije te interferencija malim nekodirajućim RNA (Maccani i Marsit, 2009). Epigenetske oznake reguliraju tkivno i razvojno specifičnu ekspresiju gena, a izloženost štetnim okolišnim čimbenicima za vrijeme razvoja može utjecati na uspostavu tih oznaka, rezultirajući trajnom promjenom u regulaciji gena (Jirtle i Skinner, 2007). Najbolje istražen epigenetski mehanizam je metilacija DNA (Bird, 2007). Metilacija DNA odvija se pomoću enzima DNA metiltransferaze koji dodaje metilnu skupinu na citozinske ostatke u genomskim područjima bogatim citozin/gvanidin dinukleotidima zvanim CpG otoci (Maccani i Marsit, 2009). Takvi se CpG otoci najčešće nalaze u promotorima gena, a njihova hipermetilacija povezana je s utišavanjem ekspresije, dok je hipometilacija povezana s ekspresijom gena (Slika 2) (Maccani i Marsit, 2009). Metilna skupina omogućava vezanje raznih proteina (kao što su npr. transkripcijski represori) koji onemogućavaju inicijaciju transkripcije (Maccani i Marsit, 2009).



Slika 2. Utjecaj statusa metiliranosti citozina unutar CpG otoka promotorske regije na gensku ekspresiju.

Između oplodnje i implantacije dolazi do opsežnog epigenetskog reprogramiranja, a mnoge tkivno specifične oznake uspostavljaju se u ranim fazama diferencijacije (Hogg i sur., 2012). Nakon oplodnje, dolazi do globalne demetilacije, tako da je do stanja blastociste genom hipometiliran. Nakon implantacije, u stadiju blastociste dolazi do ponovne uspostave metilnih oznaka i to na način da u stanicama trofoektodermalnog porijekla DNA ostaje relativno hipometilirana u odnosu na unutarnju masu stanica (Santos i sur., 2002). To rezultira različitim obrascima metilacije DNA u ekstra-embrionalnim tkivima (uključujući posteljicu) u usporedbi sa somatskim stanicama (Gama-Sosa i sur., 1983; Novakovic i sur., 2010). Međutim, epigenetsko reprogramiranje nastavlja se odvijati za vrijeme prenatalnog razvoja kao i nakon rođenja (Yuen i sur., 2011). Metode istraživanja metilacije DNA mogu se podijeliti u tri grupe (Vryer i Saffery, 2017). Prva je analiza specifičnih genskih lokusa koja uključuje mali broj definiranih CpG mjesta u maloj genomske regiji. Drugi pristup uključuje analizu više jedinstvenih lokusa unutar genoma (eng. *genome-wide analysis*). Treći pristup podrazumijeva određivanje globalne metilacije preko ukupnog sadržaja 5-metilcitozina u uzorku. Najčešće korištena metoda određivanja globalne metilacije uključuje analizu ponavljajućih sljedova LINE (eng. *Long interspersed numerical elements*), najčešće LINE-1 (eng. *Long interspersed nuclear element-1*) i SINE (eng. *short interspersed numerical elements*), najčešće Alu (Vryer i Saffery, 2017). Ove ponavljajuće sekvence čine 40% genoma štakora (Rat Genome Sequencing Project Consortium, 2004) i gotovo 50% ljudskog genoma (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001), zbog čega se pretpostavlja da status metiliranosti tih regija odražava status metiliranosti cijelog genoma.

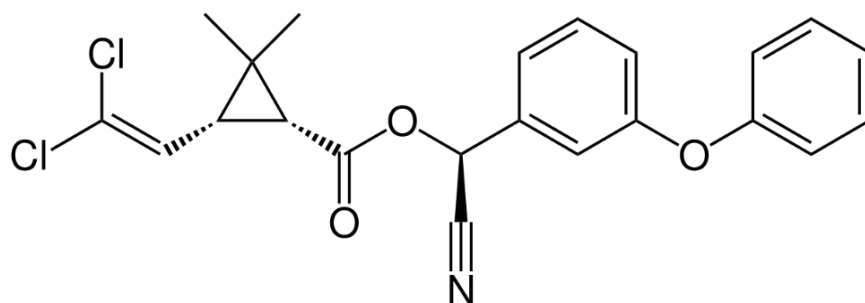
## 1.2. Alfa-cipermetrin

Piretroidi su strukturni derivati prirodnih piretrina prisutnih u piretrumu, ekstraktu iz cvijeta dalmatinskog buhača, *Chrysanthemum cinerariifolium* (Casida, 1980). Pripadaju u skupinu insekticida sa širokom primjenom u poljoprivredi, veterini i u kućanstvima (Tang i sur., 2018). Visoko su toksični za kukce, a istovremeno imaju malu toksičnost za sisavce zbog brzog metabolizma, više tjelesne temperature i niže osjetljivosti za analogna ciljna mjesta (Narahashi i sur., 2007). Svoju širu primjenu su pronašli nakon postupnog ukidanja organofosfatnih insekticida upravo zbog ovih prednosti, te sada čine jednu četvrtinu svjetskog tržišta insekticida (Yavuz i sur., 2009). Međutim, širom upotrebom ovih spojeva se ispostavilo da mogu uzrokovati akutnu i

kroničnu toksičnost u ljudi i životinja (Ray i Fry, 2006; Farag i sur., 2007). Piretroidi primarno djeluju na živčani sustav na način da uzrokuju produljeno otvoreno stanje natrijevih kanala ovisnih o naponu (Soderlund i sur., 2002; Narahashi i sur., 2007).

Piretroidi se dijele u dvije skupine koje se razlikuju po kemijskoj strukturi i načinu djelovanja. Piretroidi tipa I utječu na kratkotrajno otvaranje natrijevih kanala u membranama neurona. Piretroidi tipa II sadrže alfa-cijano skupinu i uzrokuju dulju odgodu inaktivacije natrijevih kanala što dovodi do ustrajne depolarizacije membrane neurona (Soderlund i sur., 2002).

Alfa-cipermetrin (Slika 3) sintetski je piretroidni insekticid tipa II koji ima široku primjenu u kućanstvu, poljoprivredi i veterini zbog brze razgradnje i male toksičnosti za sisavce (USEPA, 2012). Za razliku od cipermetrina koji je smjesa cis i trans enantiomera u omjeru 40:60,  $\alpha$ -cipermetrin je smjesa enantiomera u omjeru 1:1 (Romero i sur., 2017).



Slika 3. Strukturna formula  $\alpha$ -cipermetrina.

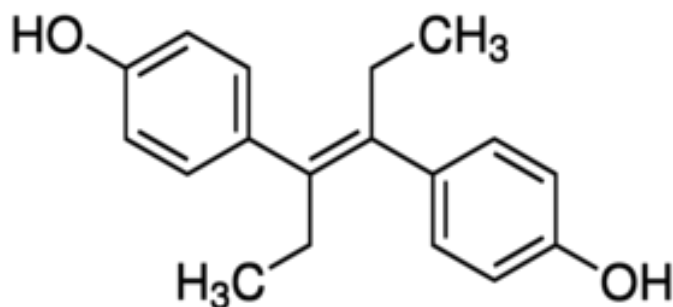
(Preuzeto s <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6c/Alpha-cypermethrin.svg>)

Cipermetrin je jedan od najčešće pronađenih piretroida u hrani, a glavni izvor izloženosti u urbanim područjima je voćem i povrćem (Tang i sur., 2018). Istraživanja na štakorima su pokazala da se cipermetrin brzo metabolizira te da se 99% spoja eliminira iz tijela u roku od nekoliko sati (Marei i sur., 1982). Međutim, zbog lipofilne prirode spoja, cipermetrin i njegovi konjugati masnih kiselina nakupljaju se u masnom tkivu, mozgu i jetri štakora (Marei i sur., 1982). U odraslih jedinki, toksičnost piretroida kao što je cipermetrin smanjena je brzim metabolizmom jetre kroz reakcije oksidacije katalizirane citokromom P450 ili hidrolizom pomoću karboksilesteraza (Crawford i sur., 1981). U slučaju da je majčin metabolizam usporen i lipofilni ksenobiotik kao što je cipermetrin ostane u krvotoku, postoji mogućnost njegovog prolaska kroz posteljicu pasivnom difuzijom te utjecaja na embrij (Elser i sur., 2020). Izloženost trudnica ovim spojevima stoga je posebno

zabrinjavajuća jer je povezana s problemima u fizičkom i neurološkom razvoju djece te smanjenim kognitivnim sposobnostima (Xue i sur., 2013; Furlong i sur., 2017; Coker i sur., 2018).

### 1.3. Dietilstilbestrol

Dietilstilbestrol (Slika 4) sintetski je nesteroidni estrogenski spoj koji ima pet puta potentniji farmakološki i terapijski učinak od prirodnog estradiola (Korach i sur., 1978).



Slika 4. Strukturna formula dietilstilbestrola.

(Preuzeto s <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/substance/diethylstilbestrol2683556531>)

U periodu od 1940.-ih do 1970.-ih, dietilstilbestrol se prepisivao ženama s visoko rizičnim trudnoćama u svrhu prevencije komplikacija i spontanih pobačaja (Newbold, 2004). Međutim, u istraživanju provedenom 1971. godine po prvi put su povezane maligne vaginalne promjene u adolescentnih djevojaka s izloženošću ovom spoju u vrijeme fetalnog razvoja (Herbst i sur., 1971), nakon čega se prestao koristiti u medicinske svrhe.

Kasnijim istraživanjima uočene su brojne druge benigne i maligne promjene u žena koje su za vrijeme trudnoće bile izložene ovom spoju te u njihovih potomaka (Newbold i sur., 2006). Tako je izloženost majki dietilstilbestrolu u vrijeme trudnoće povezana s povećanim rizikom od raka dojke (Colton i sur., 1993). Daljnja istraživanja su dokazala češće benigne promjene reproduktivnog sustava u otprilike 95% žena koje su bile izložene dietilstilbestrolu za vrijeme fetalnog razvoja (Newbold i sur., 2006). Te promjene uključuju anatomske promjene cerviksa (Kaufman i Adam, 1978), kao i smanjenu plodnost (Senekjian i sur., 1988). U sinova žena koje su za vrijeme trudnoće bile izložene dietilstilbestrolu uočena je veća učestalost cisti epididimisa i hipotrofičnih testisa (Gill i sur., 1979). Istraživanja provedena na miševima uspješno su ponovila i predvidjela većinu

histoloških promjena koje su zabilježene u reproduktivnim organima ljudi koji su bili izloženi sličnim koncentracijama dietilstilbestrola (McLachlan i sur., 1975, McLachlan i sur., 1982), što ih čini pogodnim modelima za praćenje učinaka endokrinih disruptora na zdravlje ljudi.

Na temelju dosadašnjih istraživanja, pretpostavlja se da dietilstilbestrol djeluje kroz epigenetske molekularne mehanizme, a ne kroz mutacije u molekuli DNA (Li i sur., 2003). Izloženost ovom spoju u vrijeme razvoja uzrokuje promjenu u ekspresiji gena koja ustraje i u odrasloj dobi. Istraživanja provedena na miševima pokazala su da prenatalna izloženost dietilstilbestrolu odgađa ekspresiju gena HOX koji su uključeni u strukturnu diferencijaciju reproduktivnog sustava (Ma i sur., 1998, Bromer i sur., 2009). Također je dokazano da izloženost dietilstilbestrolu tijekom razvoja utječe na deregulaciju gena Wnt u vrijeme morfogeneze maternice (Miller i sur., 1998) te da potiče demetilaciju gena laktoferina u maternici (Li i sur., 1997).

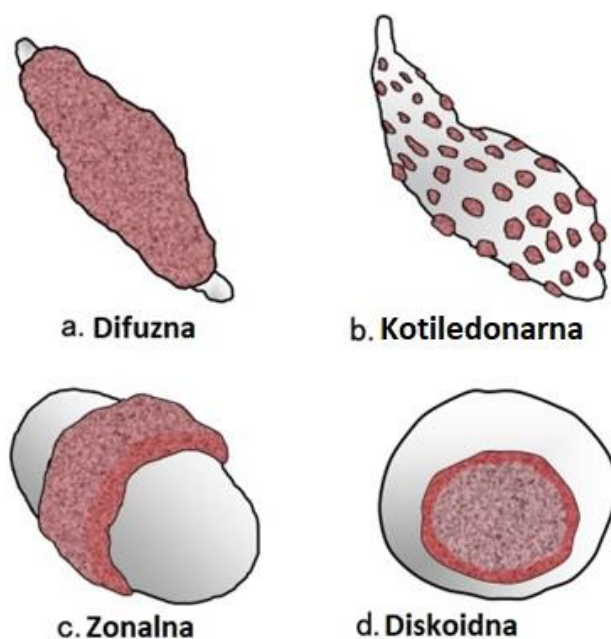
Dietilstilbestrol je postao jedan od prvih primjera transplacentalnog otrova koji ima sposobnost proći kroz posteljicu i direktno utjecati na fetus u razvoju. Činjenica da su abnormalnosti koje uzrokuje vidljive tek kasnije tijekom života jedinke je razlog što se koristio u medicinske svrhe čak nekoliko desetljeća.

## **1.4. Posteljica**

Posteljica je ključni organ za fetalni razvoj tijekom trudnoće u sisavaca. Osim što ima ulogu u prijenosu nutrijenata do fetusa, ima i funkciju endokrinog organa koji proizvodi i luči razne hormone, uključujući estrogen, progesteron i posteljični laktogen (Hogg i sur., 2012). Posteljica također djeluje i kao zaštitna barijera koja štiti fetus od štetnih utjecaja i infekcija te ima metaboličku ulogu detoksifikacije sličnu jetri (Hogg i sur., 2012).

Prijenos tvari kroz posteljicu odvija se na tri glavna načina. Prvi je pasivni transport jednostavnim difuzijom kojom se prenose npr. molekularni kisik i steroidni hormoni ili olakšanom difuzijom kojom se prenose glukoza i većina farmaceutika. Drugi način je aktivni transport kojim se prenose aminokiseline i folati. Treći je vezikularni transport kojim se prenose veće molekule kao što su imunoglobulini (Syme i sur., 2004).

Iako posteljica ima jednaku ulogu kod svih sisavaca, morfologija ovog organa razlikuje se između različitih vrsta (Enders i Blankenship, 1999). Posteljice se klasificiraju u četiri glavne skupine na temelju oblika: difuzna, kotiledonarna, zonalna i diskoidna (Slika 5). Klasifikacija se temelji na tome nalazi li se područje razmjene između majke i fetusa preko cijele dostupne površine korionske vreće ili je to područje ograničeno (Furukawa i sur., 2014).

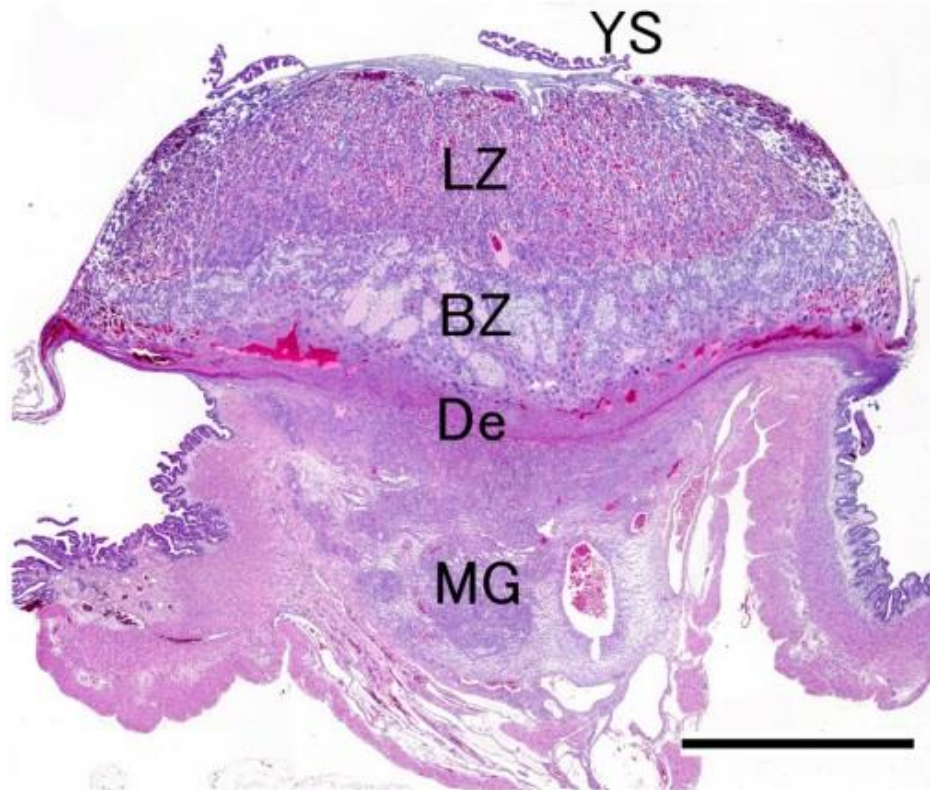


Slika 5. Podjela posteljica na temelju oblika. (Preuzeto i modificirano prema Furukawa i sur., 2014)

Na temelju histološke strukture, posteljice se dijele u tri glavne skupine: epitelokorijalna, endoteliokorijalna i hemokorijalna. Štakori imaju hemokorijalni tip i diskoidni oblik posteljice (Furukawa i sur., 2014).

Histološki, posteljica štakora sastoji se od zone labirinta i bazalne zone koje čine fetalni dio posteljice, dok se majčin dio posteljice sastoji od decidue te metrijskih žlijezda (Slika 6) (Furukawa i sur., 2014).





Slika 6. Histološki prerez štakorske posteljice, obojan metodom hemalaun-eozin. BZ – bazalna zona, De – decidua, LZ – zona labirinta, MG – metrijske žlijezde, YS - žumanjčana vreća. (Preuzeto i modificirano prema Furukawa i sur., 2014)

U zoni labirinta nalaze se tri sloja trofoblasta koji razdvajaju prostor s majčinom krvi od fetalnih krvnih žila. Vanjski trofektoderm, koji dolazi u direktni kontakt s majčinom krvi, sastoji se od citotrofoblasta. Ispod trofektoderma nalaze se dva sloja sinciotrofoblasta. Bazalna zona sastoji se od tri tipa diferenciranih stanica: spongiotrofoblasta, divovskih stanica trofoblasta i glikogenskih stanica. Decidua se sastoji od mezometrijalnih decidualnih stanica. Metrijske žlijezde se u potpunosti razvijaju sredinom skotnosti, nakon čega se smanjuju do poroda. Sastoje se od decidualiziranih stromalnih stanica endometrija, prirodnih stanica ubojica maternice, arterija, trofoblasta i fibroblasta. Žumanjčana vreća sastoji se od epitelnih i mezodermalnih stanica, a dijeli se na visceralni i parijetalni dio. Budući da sredinom skotnosti parijetalna žumanjčana vreća puca, visceralna žumanjčana vreća ostaje izložena unutrašnjosti maternice i naziva se reverznom žumanjčanom vrećom (Furukawa i sur., 2014).

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je procijeniti učinke  $\alpha$ -cipermetrina kao endokrinog disruptora na epigenetičke i razvojne promjene u posteljicama ženki štakora izloženih tijekom gestacije. To uključuje:

- analizu metilacije ponavljajućih sljedova LINE-1 u svrhu procjene globalnih epigenetičkih promjena metodom pirosekvenciranja,
- određivanje i kvantifikaciju proteinske ekspresije histona H3 kao proliferacijskog i pocijepane kaspaze-3 kao apoptotskog markera metodom imunohistokemije kako bi se istražio utjecaj  $\alpha$ -cipermetrina na rast i apoptozu stanica,
- procjene patoloških promjena u tkivu posteljica klasičnom histopatološkom analizom.

Na temelju poznatih učinaka drugih endokrinih disruptora na posteljicu, očekujem da će izloženost  $\alpha$ -cipermetrinu tijekom gestacije uzrokovati smanjenje globalne metilacije DNA, smanjenu proliferaciju stanica, inducirati apoptozu te uzrokovati degeneraciju stanica bazalne zone i krvarenje u tkivu posteljice.

## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1. Eksperimentalne životinje i uzorkovanje tkiva

Diplomski rad izradila sam na uzorcima posteljica štakora vrste *Rattus norvegicus*, soj Wistar HsdBrIHan. Životinje su bile uzgojene u Jedinici za laboratorijske životinje Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada. Postupanje sa životinjama odvijalo se u skladu s Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13 i 39/17) Uprave za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede. Za provođenje pokusa dobivena je dozvola Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada (Ur. Br.: 100-21/20-20).

Kako bi utvrdili koje ženke štakora imaju ujednačen estrusni ciklus te predvidjeli kada će biti pripravne za parenje s mužjacima (dan proestrusa), kolege s Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada pratili su im faze estrusnog ciklusa svako jutro u isto vrijeme tijekom tri tjedna. Faze estrusnog ciklusa praćene su citološkim pregledom ispiraka rodnice pod svjetlosnim mikroskopom (Marcondes i sur., 2002., Paccola i sur., 2013). Ženke štakora s ujednačenim estrusnim ciklusom su na dan proestrusa stavljene u kaveze s mužjacima u omjeru 1:1 preko noći. Sljedećeg jutra su ženke razdvojene od mužjaka i pregledane radi utvrđivanja prisutnosti sluznog čepa u rodnici. Ukoliko nije bio prisutan, uzet je ispirak rodnice i pregledan pod svjetlosnim mikroskopom. Skotnost je utvrđena prisustvom spermija u vaginalnom ispirku ili sluznog čepa u rodnici. Po dvanaest skotnih ženki štakora razvrstano je u sljedeće pokusne skupine: negativna kontrola (voda), kontrola otapala (kukuruzno ulje), pozitivna kontrola (dietilstilbestrol) te tri skupine izložene  $\alpha$ -cipermetrinu. Ispitivane doze  $\alpha$ -cipermetrina iznosile su 1, 10 i 19 mg/kg/dan, a izračunate su prema trenutno dostupnim NOAEL (eng. *No Observed Adverse Effect Level*) i LOAEL (eng. *Lowest Observed Adverse Effect Level*) vrijednostima za  $\alpha$ -cipermetrin za reproduktivnu toksičnost u štakora (WHO, 2019). Korištena doza dietilstilbestrola iznosila je 10  $\mu$ g/kg/dan. Sve skupine životinja držane su u jednakim uvjetima. Životinje je tretirao veterinar od 6. dana graviditeta (DG) do 21. DG, 1 mL/dan; *per os* želučanocrijevnom sondom čime se oponaša prirodan put unosa pesticida hranom uz istovremenu sigurnost da je svaka životinja izložena točno željenoj koncentraciji i količini spoja. Veterinar je dio skotnih ženki štakora 21. DG uspavao pod općom anestezijom intraperitonealnim ubrizgavanjem kombinacije anestetika (Narketan i Xylapan, Vetoquinol UK Ltd., Towcester, Ujedinjeno Kraljevstvo) u dozi 0,8 mL/kg ketamina-narketana i

0,6 mL/kg ksilazina-ksilapana. Nakon vađenja gravidne maternice te otvaranja plodnih mjehura s posteljicama i fetusima, uzorkovano je šest posteljica po eksperimentalnoj skupini. Posteljice predviđene za epigenetičke analize pohranjene su u odgovarajuće posude na -80°C do daljnje obrade, a one predviđene za histopatološku i imunohistokemijsku analizu u Sainte Marie fiksativ (95% apsolutni etanol, 1% ledena octena kiselina, 4% destilirana voda).

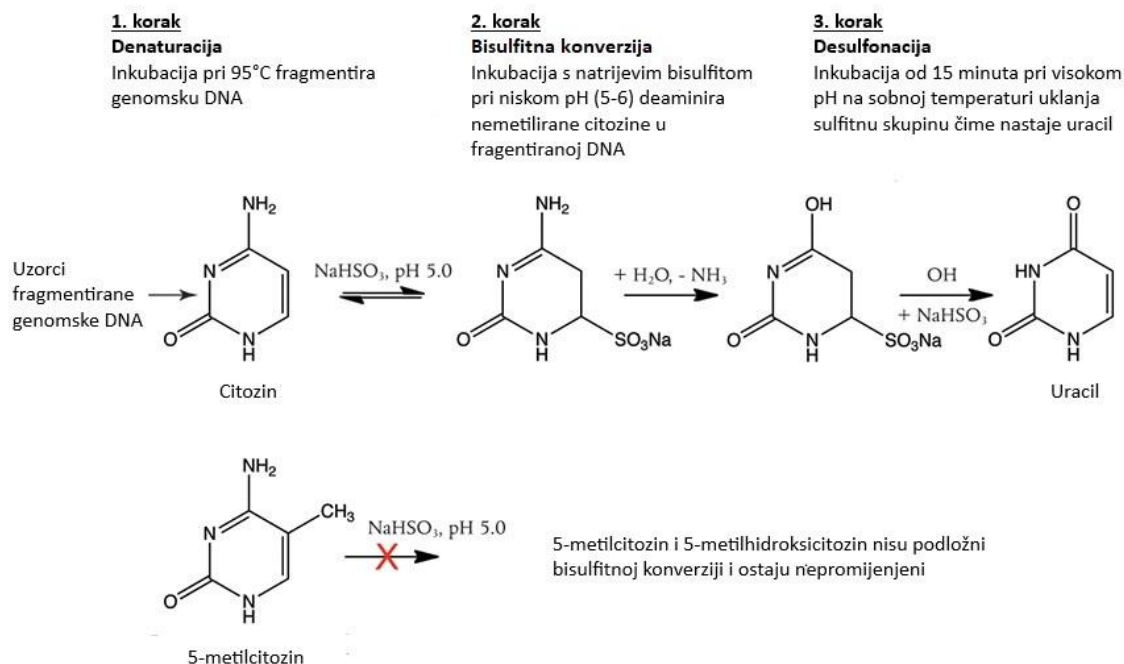
## **3.2. Analiza metilacije ponavljajućih sljedova LINE-1**

### **3.2.1. Izolacija DNA iz svježeg tkiva**

Kako bih izolirala genomsku DNA iz posteljica, odmrznutom tkivu koje je bilo pohranjeno u Eppendorf epruvete od 1,5 mL dodala sam 500 µL pufera za lizu (50 mM Tris HCl, 100 mM EDTA pH 8, 50 mM NaCl, 10% SDS, Milli-Q voda) te 20 µL proteinaze K (Carl Roth, Karlsruhe, Njemačka). Uzorci su potom inkubirani na termobloku (Eppendorf ThermoMixer C, Hamburg, Njemačka) pri 56°C i 600 rpm 24 sata. Koncentraciju izolirane DNA izmjerila sam spektrofotometrijski (ThermoScientific™ NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Sjedinjene Američke Države) nakon čega sam uzorke pohranila na -20°C za daljnje analize.

### **3.2.2. Bisulfitna konverzija**

Bisulfitna konverzija je proces kojim se molekule DNA nakon početne denaturacije tretiraju natrijevim bisulfitom u svrhu analize metilacije CpG otoka od interesa. Ovim procesom se deaminiraju nemetilirani citozini u molekuli DNA koji se zatim desulfonacijom prevode u uracil, dok metilirani citozini ostaju nepromijenjeni (Slika 7) (©New England Biolabs, 2022). Kasnije se lančanom reakcijom polimeraze (eng. *polymerase chain reaction*, PCR) u molekulu DNA na mjestu uracila ugrađuje timin (©New England Biolabs, 2022). Za bisulfitnu konverziju i zatim pročišćavanje bisulfitno konvertirane genomske DNA koristila sam komercijalno dostupan set kemikalija EpiTect® Plus DNA Bisulfite Kit (QIAGEN, Venlo, Nizozemska) prema uputama proizvođača.



Slika 7. Bisulfitna konverzija genomске DNA. Proces se sastoji od tri glavna koraka: denaturacije genomске DNA, konverzije djelovanjem natrijevog bisulfitna te desulfonacije čime na kraju reakcije na mjestu nemetiliranih citozina u DNA nastaju uracili. Metilirani citozini ostaju nepromijenjeni na kraju reakcije. (Preuzeto i modificirano prema <https://international.neb.com/applications/epigenetics/dna-methylation-analysis/bisulfite-conversion>)

### 3.2.3. Lančana reakcija polimerazom nakon bisulfitne konverzije genomске DNA

U svrhu kvantitativne analize globalne metilacije DNA nakon tretmana  $\alpha$ -cipermetrinom, analizirala sam tri CpG dinukleotida unutar ponavljajućih sljedova LINE-1 (eng. *Long interspersed nuclear element-1*). Sekvenca koja sadrži CpG dinukleotide od interesa unutar ponavljajućih sljedova LINE-1 umnožena je lančanom reakcijom polimeraze te glasi:

TTGGTGAGTTTGGGATATATAGAGGTAGAATTTTTTTAGGATYGGGTAYGTTTTGTGT  
TTATYGGGAAGTTTTATATTYGYGGTTYGTAGTAGTTTTTTGTTTTTAGATTT. Slovo Y predstavlja dušičnu bazu citozin ili timin, ovisno o tome je li citozin na tom položaju prije bisulfitne konverzije bio metilirani ili ne. Sekvence uzvodne (eng. *forward*) i nizvodne (eng. *reverse*)

početnice korištene za PCR prikazane su u Tablici 1, a preuzete su iz rada Hamm i suradnika (2009). Nizvodna početnica na 5' kraju ima kovalentno vezani biotin kako bi se nastali produkti PCR-a kasnije mogli vezati na sefrozne kuglice za pirosekvenciranje.

Tablica 1. Sekvence korištenih početnica za umnažanje dijela ponavljajućih sljedova LINE-1 lančanom reakcijom polimeraze nakon bisulfitne konverzije DNA. Nizvodna početnica na 5' kraju ima kovalentno vezan biotin.

Naziv početnice	Sekvenca početnice
<i>rLINE1 forward</i>	TTGGTGAGTTTGGGATAT
<i>rLINE1 reverse</i>	B-AAATCTAAAAACAAAAACTACTAC

Za postavljanje lančane reakcije polimerazom koristila sam komercijalno dostupan set kemikalija PyroMark® PCR Kit (QIAGEN). Komponente reakcijske smjese prikazane su u Tablici 2. Uz analizirane uzorke, uz svaku reakciju pripremila sam i negativnu kontrolu koja nije sadržavala DNA kako bih provjerila eventualnu kontaminaciju komponenata reakcijske smjese. Također su svaki put pripremljene i dvije pozitivne kontrole; metilirana i nemetilirana štakorska DNA koje su također prethodno bisulfitno konvertirane.

Tablica 2. Reakcijska smjesa lančane reakcije polimerazom korištena za umnažanje CpG dinukleotida od interesa unutar ponavljajućih sljedova LINE-1.

Komponente reakcijske smjese	Volumen po reakciji (µl)
2x PyroMark PCR Master Mix	12,5
10x CoralLoad Concentrate	2,5
LINE-1 uzvodna početnica	0,5
LINE-1 nizvodna početnica, biotinizirana	0,5
H <sub>2</sub> O	8
Uzorak bisulfitno konvertirane DNA	1
Ukupno	25

Nakon pripreme reakcijskih smjesa, inkubirane su u uređaju Bio-Rad C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, Sjedinjene Američke Države). Termalni uvjeti pod kojima je proveden PCR prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Uvjeti provedene lančane reakcije polimerazom za umnažanje CpG dinukleotida od interesa unutar ponavljajućih sljedova LINE-1.

Korak	Temperatura (°C)	Trajanje	Broj ciklusa
Početna denaturacija	95	15 min	1
Denaturacija	94	30 s	50
Prianjanje	53,7	30 s	50
Elongacija	72	30 s	50
Završna elongacija	72	10 min	1
Inkubacija	12	∞	1

Uspješnost PCR-a provjeravala sam elektroforezom na 2%-tnom agaroznom gelu u TAE puferu (tris baza, octena kiselina, EDTA) 15 minuta pri 80 V i zatim 20 minuta pri 120 V (Bio-Rad). Za vizualizaciju DNA pod UV svjetlom koristila sam boju GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain (Lonza, Basel, Švicarska). Veličinu umnoženog fragmenta potvrdila sam usporedbom s markerom; smjesom fragmenata DNA poznatih veličina (SimplyLoad™ 100 bp DNA Ladder, Lonza).

### 3.2.4. Pirosekvenciranje

Pirosekvenciranje je metoda sekvenciranja nove generacije (eng. *Next Generation Sequencing*, NGS) koja se bazira na sintezi DNA. Kalup za pirosekvenciranje čini jednolančana DNA koja na 5' kraju sadrži kovalentno vezani biotin. Dobivanje jednolančanog kalupa postiže se vezanjem umnoženih fragmenata DNA na sefarozne kuglice preko lanca DNA koji sadrži kovalentno vezani biotin, te potom ispiranja komplementarnog lanca. U reakciji sudjeluju enzimi DNA polimeraza, ATP sulfurilaza, apiraza i luciferaza te supstrati luciferin i adenzin-5-fosfosulfat (APS). Nakon hibridizacije početnice za sekvenciranje s kalupom DNA, u reakcijsku smjesu se redom dodaje jedan po jedan deoksiribonukleozid-trifosfat (dNTP). U slučaju da DNA polimeraza ugradi dNTP u novonastajući lanac DNA na principu komplementarnosti, oslobodit će se anorganski pirofosfat. ATP sulfurilaza pretvara oslobođeni pirofosfat i APS iz reakcijske smjese u adenzin trifosfat (ATP). Luciferaza koristi nastali ATP za oksidaciju luciferina čime nastaje svjetlosni signal koji se detektira i kvantificira. U slučaju ugradnje istog dNTP u novonastajući lanac DNA više puta za redom, nastaje proporcionalno jači svjetlosni signal. Neugrađene dNTP i

ATP razgrađuje apiraza kako nebi dalje sudjelovali u reakciji. Nakon što je proces degradacije završen, u reakcijsku smjesu dodaje se sljedeći dNTP te se proces ponavlja (©QIAGEN 2013-21).

Esej za pirosekvenciranje napravila sam u programu PyroMark Q24 Advanced Software. Za pripremu reakcije koristila sam komercijalno dostupni set kemikalija PyroMark® Q24 Advanced CpG Reagents (QIAGEN) i pratila upute proizvođača. U Tablici 4 prikazan je sastav smjese korištene za imobilizaciju produkata PCR-a na sefarozne kuglice.

Tablica 4. Sastav smjese za imobilizaciju umnoženih fragmenata DNA.

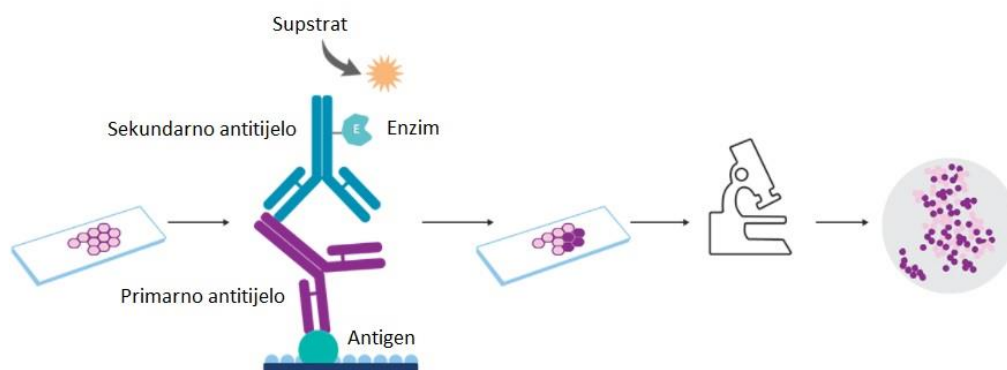
Komponenta smjese	Volumen po reakciji (μl)
Streptavidin sefaroza	1
PyroMark Binding Buffer	40
H <sub>2</sub> O	19
Biotinilirani produkt PCR-a	20
Ukupno	80

Za pirosekvenciranje sam koristila uzvodnu početnicu sekvence 5'-TAGAATTTTTTTAGGAT-3' (Eurofins Genomics, Louisville, Sjedinjene Američke Države). Početnicu sam razrijedila u puferu za prijanjanje (eng. *annealing buffer*) na koncentraciju od 0,375 μM. Na temelju dizajniranog eseja i protokola za sekvenciranje, računalni program PyroMark Q24 Advanced Software pruža informacije o potrebnoj količini pojedinih dNTP-ova te smjesa enzima i supstrata za reakciju. Na temelju tih informacija napunila sam spremnik za pirosekvenciranje (eng. *cartridge*) i postavila ga u uređaj za pirosekvenciranje PyroMark Q24 Advanced (QIAGEN). Radnu postaju (eng. *workstation*) napunila sam odgovarajućim kemikalijama i Milli-Q vodom po uputama proizvođača. Nakon pripreme radne postaje, u pločicu koja sadrži smjesu za imobilizaciju produkata PCR-a se urone iglice vakuum sisaljke. Na iglicama ostaju vezane sefarozne kuglice s vezanim produktima PCR-a. Iglice se dalje redom uranjaju u otopine na radnoj postaji kako bi se postigla denaturacija DNA te ispiranje komplementarnog lanca DNA koji ne sadrži vezan biotin. Takav jednolančani kalup DNA se zatim iglicama uranja u pločicu s razrijeđenom početnicom za sekvenciranje. Pločica se potom stavlja na grijaču ploču na 80°C 3 minute, nakon čega se postavlja u uređaj za pirosekvenciranje te se pokreće odgovarajući program.



### 3.3. Imunohistokemijska analiza apoptotskog i proliferacijskog markera

Imunohistokemija je metoda detekcije i lokalizacije proteina u tkivima koja se temelji na specifičnom vezanju protutijela na antigen. Glavni koraci imunohistokemijskog bojanja (Slika 8) uključuju rehidraciju fiksiranog i uklopljenog tkiva, razotkrivanje antigena, blokiranje nespecifičnog vezanja protutijela životinjskim serumom, inkubaciju s protutijelom te vizualizaciju mjesta vezanja protutijela u uzorku (Duraiyan i sur., 2012).



Slika 8. Princip imunohistokemijskog bojanja i indirektna metode vizualizacije signala.

(Preuzeto i modificirano prema <https://www.bdbiosciences.com/en-learn/applications/immunohistochemistry#Overview>)

#### 3.3.1. Fiksacija, uklapanje i rezanje tkiva posteljice

Kolege s Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu su tkivo prvo fiksirali u fiksativu Sainte-Marie baziranom na etanolu (95% apsolutni etanol, 1% ledena octena kiselina, 4% destilirana voda). Svi uzorci su potom dehidrirani u uzlaznoj seriji alkohola nakon čega su uklopljeni u parafin.

Tkivo je rezano na debljinu od 4  $\mu\text{m}$  pomoću mikrotoma (Leica RM2125 RTS, Wetzlar, Njemačka), a rezovi su zatim navučeni na silanizirana predmetna stakla Vitrognost (Biognost®, Zagreb, Hrvatska) za daljnje imunohistokemijske i histopatološke analize.

### 3.3.2. Imunohistokemija

U svrhu određivanja promjene ekspresije proliferacijskog i apoptotskog markera u tkivu posteljica nakon tretmana  $\alpha$ -cipermetrinom, imunohistokemijom su detektirani fosforilirani histon H3 i pocijepana kaspaza-3. Za njihovu detekciju korištena su sljedeća protutijela:

1. Rekombinantno zečje protutijelo specifično za histon H3 fosforiliran na položajima S10 i T11 (ab32107, Abcam, Cambridge, Ujedinjeno Kraljevstvo),
2. Monoklonsko zečje protutijelo specifično za pocijepanu kaspazu-3 (#9664, Cell Signaling Technology, Danvers, Sjedinjene Američke Države).

Rezove tkiva posteljice prvo sam inkubirala sat vremena na 56°C u svrhu deparafinizacije, nakon čega slijedi temperiranje od 10 minuta na sobnoj temperaturi (eng. *room temperature*, RT). Nakon toga slijedi deparafinizacija i rehidracija tkiva koja se postiže uranjanjem stakala u ksilen i niz alkohola. Stakla se redom uranjaju u ksilen (Biognost® BioClear) dva puta po 10 minuta, apsolutni etanol dva puta po 5 minuta, 96% etanol dva puta po 5 minuta, 70% etanol na 5 minuta te destiliranu vodu na 5 minuta. Razotkrivanje antigena postiže se kuhanjem rezova tkiva u citratnom puferu (Dako Target Retrieval Solution, Citrate pH 6, Agilent Technologies, Santa Clara, Sjedinjene Američke Države). Rezove tkiva sam kuhala u puferu 20 minuta, nakon čega slijedi 30 minuta hlađenja na RT. Stakla sam zatim isprala uranjanjem u 1xTBS (eng. *tris-buffered saline*) na 5 minuta. U svrhu inaktivacije endogenih protutijela koristila sam 5% albumin iz goveđeg seruma (eng. *bovine serum albumin*, BSA) pripremljen u TBS-u. Rezove tkiva sam stavila na inkubaciju 20 minuta s 5% BSA u vlažnoj komori na RT. Sljedeći korak je inkubacija s primarnim protutijelom priređenim u 1% BSA, 0,1% Tween®20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Sjedinjene Američke Države) u TBS-u. Protutijelo na histon H3 razrijedila sam na koncentraciju od 1:400, a protutijelo na pocijepanu kaspazu-3 na koncentraciju od 1:100. Stakla s primarnim protutijelima sam stavila na inkubaciju preko noći u vlažnoj komori pri 4°C. Sljedeće jutro stakla sam ispirala u 1xTBS-u tri puta po 5 minuta. Potom slijedi inkubacija u mraku u trajanju od 20 minuta s 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pripremljenim u TBS-u kako bi se inaktivirale endogene peroksidaze. Stakla sam ispirala tri puta po 5 minuta u 1xTBS-u te zatim stavila na inkubaciju jedan sat sa sekundarnim protutijelom priređenim u 1% BSA u TBS-u. Koristila sam sekundarno protutijelo pripremljeno u kozi specifično za zečje imunoglobuline (ab90751, Abcam) te ga razrijedila na koncentraciju od 1:1000.

Po završetku inkubacije, stakla sam ispirala tri puta po 5 minuta u 1xTBS-u. U svrhu vizualizacije mjesta vezanja protutijela, rezove tkiva sam stavila na inkubaciju 3 minute s otopinom 3,3'-diaminobenzidina (DAB) i supstrata (Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, Agilent Technologies, Santa Clara, Sjedinjene Američke Države). Reakciju sam zaustavljala uranjanjem stakala u destiliranu vodu. Budući da je DAB karcinogen potrebno je u korištenu destiliranu vodu uliti natrijev hipoklorit kako bi se inaktivirao. Za vizualizaciju histološke strukture stakla sam na 10 sekundi uranjala u hematoksilin (Biognost® Hematoxylin M) te ih potom kratko ispirala u destiliranoj pa zatim 7 minuta u vodovodnoj vodi. Sljedeći korak je dehidracija uzoraka koja se postiže uranjanjem stakala u uzlazni niz alkohola i ksilen. Stakla su redom uranjana u destiliranu vodu na 5 minuta, 70% etanol na 5 minuta, 96% etanol dva puta po 5 minuta, apsolutni etanol dva puta po 5 minuta te ksilen (Biognost® BioClear) dva puta po 10 minuta. Uzorke sam zatim uklopila u medij baziran na ksilenu (Biognost® BioMount DPX Low) i pokrila pokrovnim stakalcem (Biognost® VitroGnost 20x60 mm).

### **3.4. Histopatološka analiza posteljica**

U svrhu određivanja patoloških promjena u tkivu posteljica, dio rezova obojan je hematoksilinom i eozinom. Rezove tkiva prvo sam inkubirala sat vremena na 56°C u svrhu deparafinizacije, nakon čega slijedi temperiranje od 10 minuta na RT. Nakon toga slijedi deparafinizacija i rehidracija tkiva koja se postiže uranjanjem stakala u ksilen i niz alkohola. Stakla se redom uranjaju u ksilen (Biognost® BioClear) dva puta po 10 minuta, apsolutni etanol dva puta po 5 minuta, 96% etanol dva puta po 5 minuta, 70% etanol na 5 minuta te destiliranu vodu na 5 minuta. Stakla sam zatim uranjala na 50 sekundi u hematoksilin (Biognost® Hematoxylin M) te ih kratko ispirala u destiliranoj, pa zatim vodovodnoj vodi na 5 minuta. Stakla sam redom uranjala u destiliranu vodu na 5 minuta, 70% etanol na 5 minuta te zatim 96% etanol na 5 minuta. Nakon toga stakla sam uronila na 30 sekundi u eozin (Biognost® Eosin Y 0.5% Aqueous). Sljedeći korak je dehidracija uzoraka koja se postiže kratkim uronom stakala u 70% etanol dva puta, zatim 96% etanol dva puta, apsolutni etanol dva puta na 30 sekundi, ksilen (Biognost® BioClear) na 30 sekundi te još jednom u ksilen (Biognost® BioClear) na 15 minuta. Uzorke sam zatim uklopila u medij baziran na ksilenu (Biognost® BioMount DPX Low) i pokrila pokrovnim stakalcem (Biognost® VitroGnost 20x60 mm).

### 3.5. Mikroskopija

Proliferacijsku i apoptotsku aktivnost stanica u bazalnom sloju posteljica ženki štakora 21. DG kvantitativno sam analizirala relativnom stereološkom varijablom numeričke gustoće ( $N_V$ ). Rezove sam analizirala pod svjetlosnim mikroskopom Olympus CH-BI45-T-2 (Olympus, Tokio, Japan) uz Weibelov mnogonamjenski testni sustav sa 42 testne točke (Kališnik, 1985). Analizirala sam po šest imunohistokemijski obrađenih uzoraka po pokusnoj skupini, a po svakom uzorku sam pregledala pet vidnih polja. Rezove sam analizirala pri povećanju od 400x, stoga je za svako analizirano mikroskopsko vidno polje ukupna duljina testnih linija ( $L_t$ ) iznosila 1,008 mm, a površina testnog prostora ( $A_t$ ) je iznosila 0,0837 mm<sup>2</sup>.

Numerička gustoća ( $N_V$ ) je relativna stereološka varijabla koja označava broj čestica u jedinici prostora. Broj profila čestica u ravnini presjeka ( $N_A$ ) razmjeran je umnošku njihove numeričke gustoće ( $N_V$ ) i njihovog tangentnog promjera ( $D$ ) što se izražava formulom:

$$N_A = N_V \times D$$

Nakon što sam prebrojala profile čestica ( $N$ ) u testnom prostoru ( $A_t$ ), izračunala sam njihov kvocijent ( $N_A = N/A_t$ ) te uvrstila u prethodnu formulu, čime sam dobila izraz:

$$N_V = N / (A_t \times D)$$

Prosječni tangentni promjer H3 pozitivnih stanica preuzet je iz rada Šerman i suradnika (2006) u kojemu je također analiziran bazalni sloj štakorske posteljice iste gestacijske starosti, a iznosi 0,015 mm. Pomoću ovih vrijednosti izračunala sam numeričku gustoću H3-pozitivnih stanica u uzorcima štakorske posteljice 20. DG.

Histopatološka analiza rezova obojanih metodom hematoksilin-eozin provedena je uz pomoć kolega s Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Uzorci su pregledani pod svjetlosnim mikroskopom Nikon TE300 (Nikon, Tokio, Japan) uz pripadajući računalni program. Uzorci su pregledavani pod povećanjem od 400x. Iz svake skupine su pregledana po tri uzorka, a na svakom uzorku je analizirano 10 vidnih polja.

### **3.6. Statistička obrada podataka**

Postotke metilacije analiziranih CpG dinukleotida između pojedinih pokusnih skupina usporedila sam neparametrijskim Kruskal-Wallis testom i Dunnovom višestrukom usporedbom. Dobivene rezultate prikazala sam grafički u programu GraphPad Prism 9.

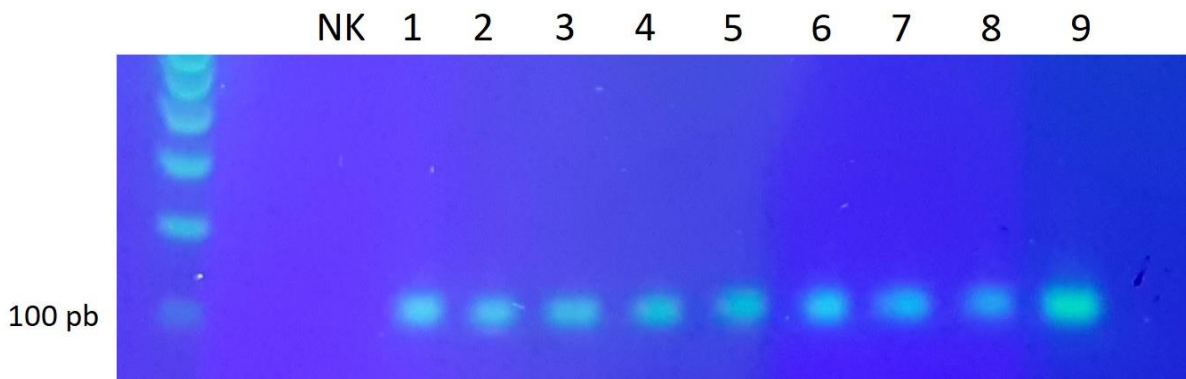
Statističku značajnost rezultata imunohistokemijske i histopatološke analize također sam odredila neparametrijskim Kruskal-Wallis testom i Dunnovom višestrukom usporedbom. Dobiveni rezultati prikazani su tablično za histopatološke analize, a grafički u programu GraphPad Prism 9 za imunohistokemijske analize.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Epigenetičke analize

#### 4.1.1. Provjera uspješnosti lančane reakcije polimerazom

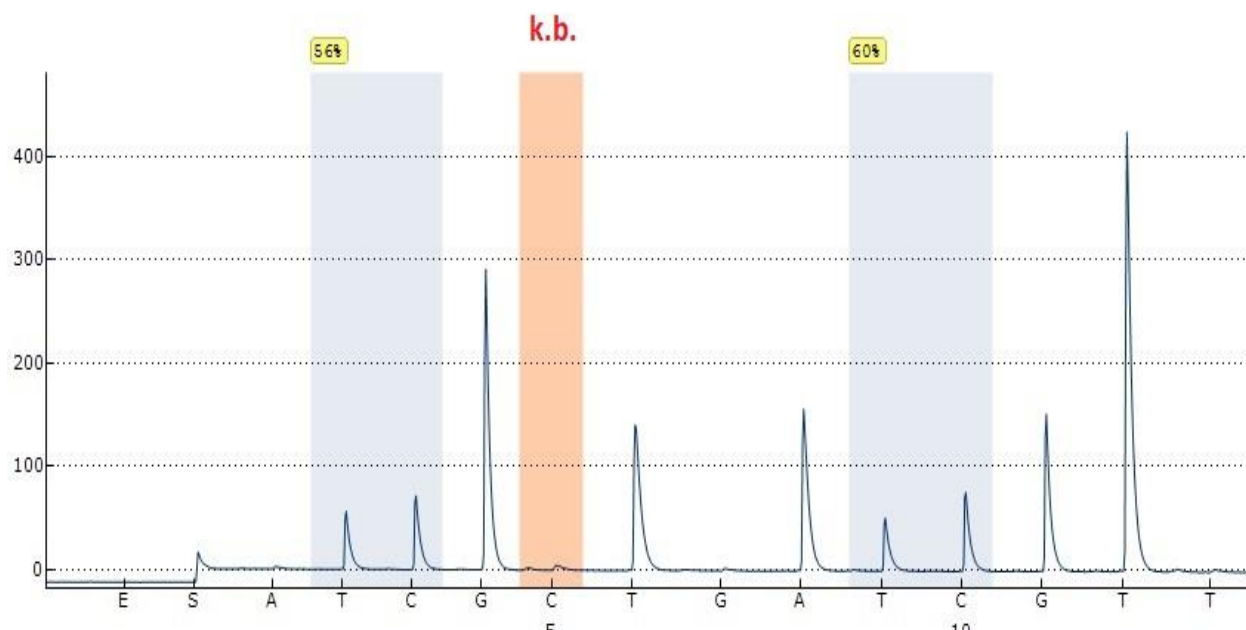
Kako bi se analizirao utjecaj  $\alpha$ -cipermetrina na posteljice ženki štakora, skotne ženke štakora tretirane su  $\alpha$ -cipermetrinom u dozama od 1, 10 te 19 mg/kg/dan, dietilstilbestrolom u dozi od 10  $\mu$ g/kg/dan (pozitivna kontrola), kukuruznim uljem (kontrola otapala) te vodom (negativna kontrola) od 6. DG do 21. DG, 1 mL/dan, *per os*. Iz sakupljenih uzoraka tkiva posteljice izolirana je genomski DNA. Kako bi se istražio utjecaj  $\alpha$ -cipermetrina na globalnu metilaciju DNA, fragment ponavljajućih sljedova LINE-1 umnožen je metodom PCR specifičnim početnicama. Uspješnost umnažanja fragmenta ponavljajućih sljedova LINE-1 provjerena je elektroforezom DNA. Slika 9 prikazuje primjer agaroznog gela nakon elektroforeze DNA za dio uzoraka iz pokusnih skupina tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 1 i 10 mg/kg/dan od 6. DG do 21. DG, 1 mL/dan, *per os*. Negativna kontrola sadržavala je sve sastojke reakcijske smjese osim DNA, te je služila za provjeru kontaminacije sastojaka smjese. Pomoću markera je potvrđeno da je lančanom reakcijom polimeraze umnožen upravo željeni fragment veličine 110 parova baza.



Slika 9. Agarozni gel nakon elektroforeze DNA. Umnožen je fragment ponavljajućih sljedova LINE-1 iz uzoraka posteljica ženki štakora tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 1 i 10 mg/kg/dan od 6. dana graviditeta (DG) do 21. DG, 1 mL/dan, *per os*. Uzorci su označeni brojevima od 1 do 9, a NK predstavlja negativnu kontrolu.

#### 4.1.2. Provjera kvalitete bisulfitne konverzije

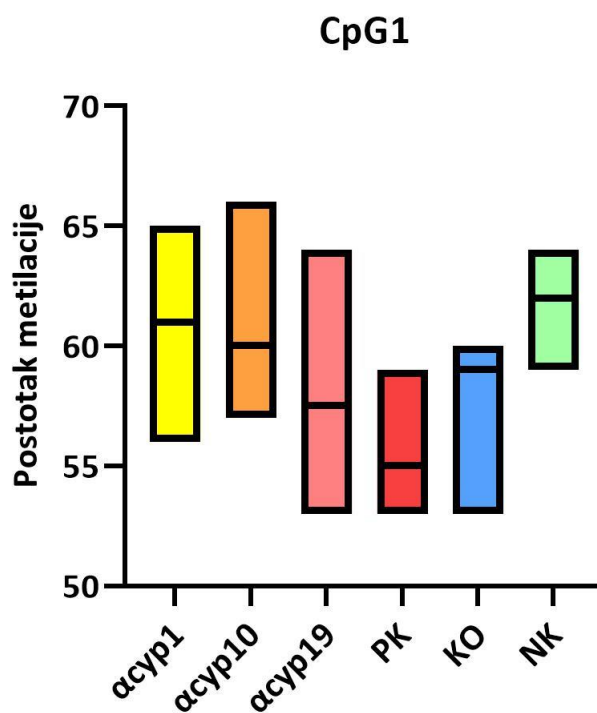
Uspješnost bisulfitne konverzije provjerena je tijekom pirosekvenciranja. Uređaj PyroMark® Q24 Advanced provodi kontrolu kvalitete bisulfitne konverzije za svaki uzorak, obično na početku procesa pirosekvenciranja. Nakon PCR-a, u slučaju uspješne bisulfitne konverzije svaki bi citozin kojemu ne slijedi gvanin trebao biti promijenjen u timin. Uređaj stoga u smjesu dodaje dCTP (deoksicitidin trifosfat) na položaju u sekvenci u kojem bi trebao slijediti timin nastao iz konvertiranog citozina. U slučaju nastanka svjetlosnog signala na tom položaju, bisulfitna konverzija nije bila uspješna te se uzorak odbacuje. Nedostatak signala označava da je bisulfitna konverzija bila uspješna te da su svi nemetilirani citozini u uzorku promijenjeni u timin. Slika 10 prikazuje dio pirograma za jedan uzorak posteljice iz pokusne skupine tretirane  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 19 mg/kg/dan od 6. DG do 21. DG, 1 mL/dan, *per os*. Svi uzorci su prošli provjeru bisulfitne konverzije.



Slika 10. Dio pirograma za fragment ponavljajućih sljedova LINE-1 iz uzorka posteljice ženke štakora tretirane  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 19 mg/kg/dan od 6. dana graviditeta (DG) do 21. DG, 1 mL/dan *per os*. Na horizontalnoj osi prikazan je slijed kojim su deoksiribonukleotidi dodavani u reakcijsku smjesu za vrijeme pirosekvenciranja. Na vertikalnoj osi prikazan je intenzitet svjetlosnog signala. Iznad analiziranih CpG mjesta prikazan je postotak metilacije, a oznaka k.b. označava kontrolu bisulfitne konverzije.

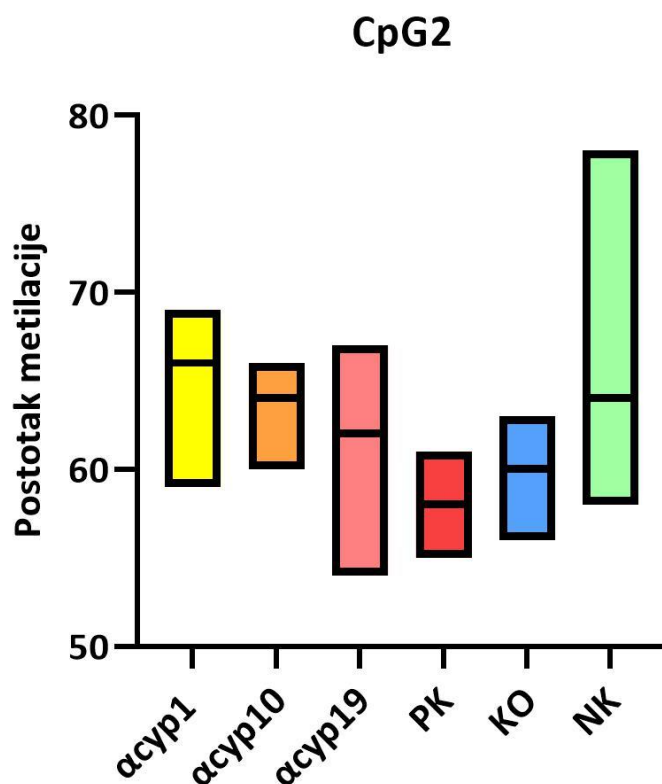
#### 4.1.3. Obrazac globalne metilacije DNA u posteljici

Utjecaj  $\alpha$ -cipermetrina na globalnu metilaciju genomske DNA u tkivu posteljica ženki štakora određen je metodom pirosekvenciranja. U tu svrhu analiziran je postotak metilacije tri CpG dinukleotida unutar ponavljajućih sljedova LINE-1. Usporedbom postotka metilacije za svako pojedino CpG mjesto između tretiranih i kontrolnih skupina nije uočena statistički značajna razlika (Slike 11-13). Za sva tri CpG mjesta može se uočiti da postotak metilacije pada s porastom koncentracije  $\alpha$ -cipermetrina. Osim toga, kontrola otapala je također utjecala na smanjenje metilacije u odnosu na negativnu kontrolu.



Slika 11. Postotak metilacije mjesta CpG1 unutar ponavljajućih sljedova LINE-1 određen pirosekvenciranjem nakon bisulfitne konverzije DNA iz uzoraka posteljica ženki štakora tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom u dozama od 1, 10 i 19 mg/kg/dan, dietilstilbestrolom u dozi od 10  $\mu$ g/kg/dan (pozitivna kontrola), kukuruznim uljem (kontrola otapala) i vodom (negativna kontrola) od 6. dana graviditeta (DG) do 21. DG, 1 mL/dan, *per os*. Rezultati su prikazani kao medijani, minimalne te maksimalne vrijednosti. Pokusne skupine:  $\alpha$ -cipermetrin 1 mg/kg/dan (acyp1),  $\alpha$ -cipermetrin 10 mg/kg/dan (acyp10),  $\alpha$ -cipermetrin 19 mg/kg/dan (acyp19), pozitivna kontrola (PK), kontrola otapala (KO) te negativna kontrola (NK).

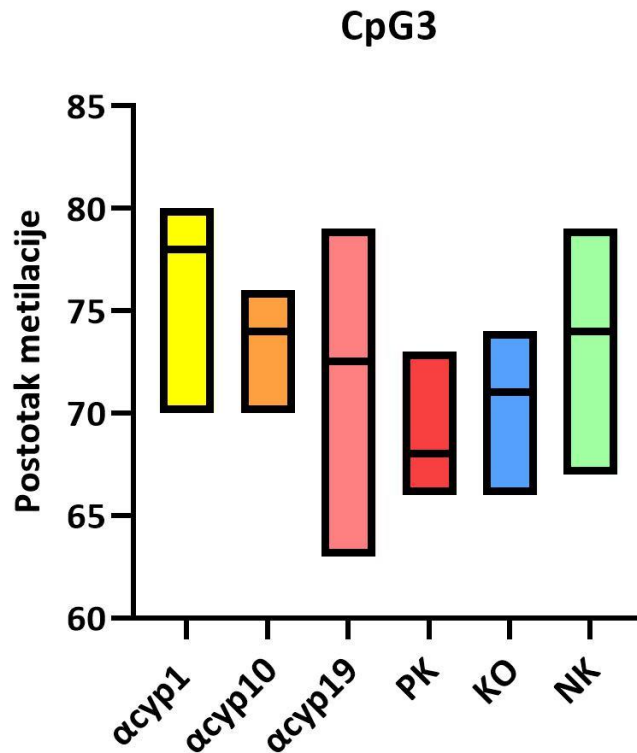




Slika 12. Postotak metilacije mjesta CpG2 unutar ponavljajućih sljedova LINE-1 određen pirosekvenciranjem nakon bisulfitne konverzije DNA iz uzoraka posteljica ženki štakora tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom u dozama od 1, 10 i 19 mg/kg/dan, dietilstilbestrolom u dozi od 10  $\mu$ g/kg/dan (pozitivna kontrola), kukuruznim uljem (kontrola otapala) i vodom (negativna kontrola) od 6. dana graviditeta (DG) do 21. DG, 1 mL/dan, *per os*.

Rezultati su prikazani kao medijani, minimalne te maksimalne vrijednosti.

Pokusne skupine:  $\alpha$ -cipermetrin 1 mg/kg/dan ( $\alpha$ cyp1),  $\alpha$ -cipermetrin 10 mg/kg/dan ( $\alpha$ cyp10),  $\alpha$ -cipermetrin 19 mg/kg/dan ( $\alpha$ cyp19), pozitivna kontrola (PK), kontrola otapala (KO) te negativna kontrola (NK).



Slika 13. Postotak metilacije mjesta CpG3 unutar ponavljajućih sljedova LINE-1 određen pirosekvenciranjem nakon bisulfitne konverzije DNA iz uzoraka posteljica ženki štakora tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom u dozama od 1, 10 i 19 mg/kg/dan, dietilstilbestrolom u dozi od 10  $\mu$ g/kg/dan (pozitivna kontrola), kukuruznim uljem (kontrola otapala) i vodom (negativna kontrola) od 6. dana graviditeta (DG) do 21. DG, 1 mL/dan, *per os*.

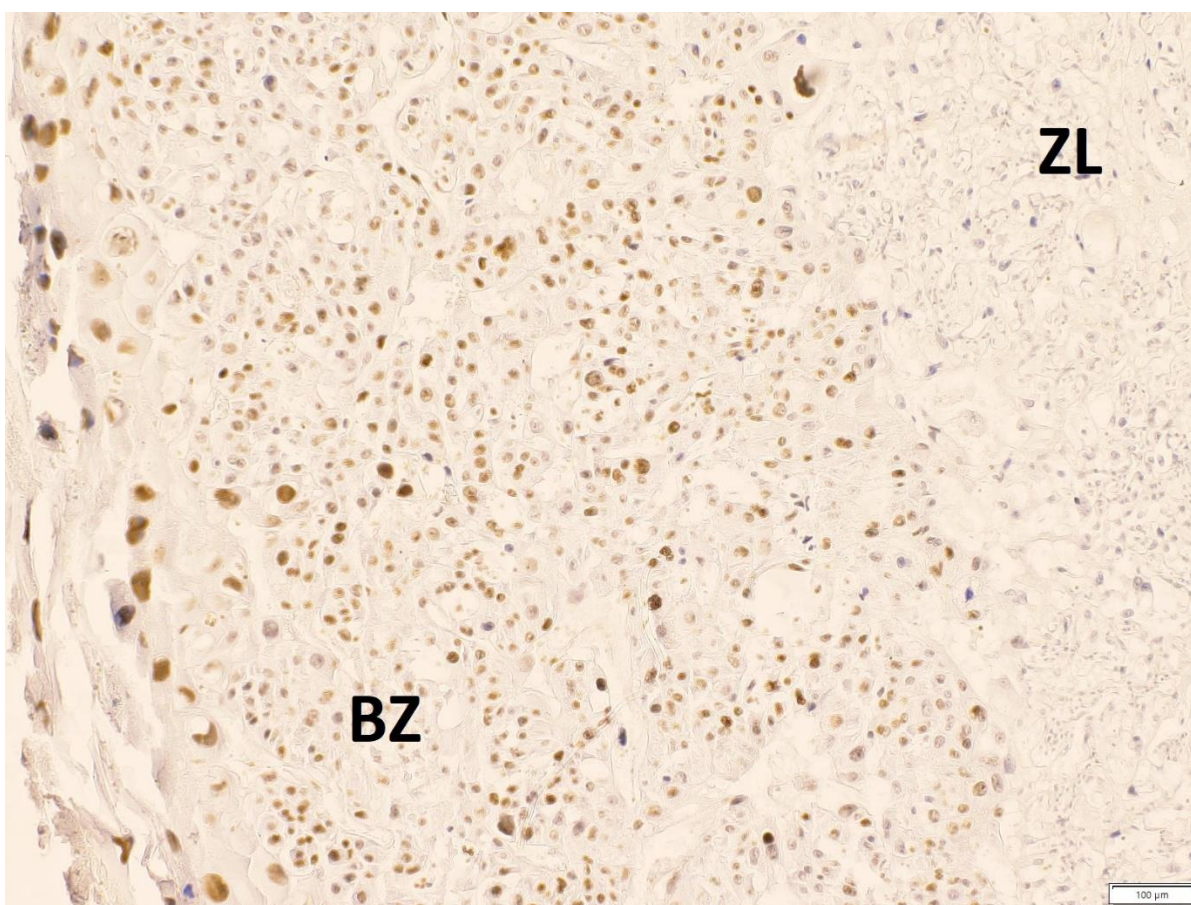
Rezultati su prikazani kao medijani, minimalne te maksimalne vrijednosti.

Pokusne skupine:  $\alpha$ -cipermetrin 1 mg/kg/dan ( $\alpha$ cyp1),  $\alpha$ -cipermetrin 10 mg/kg/dan ( $\alpha$ cyp10),  $\alpha$ -cipermetrin 19 mg/kg/dan ( $\alpha$ cyp19), pozitivna kontrola (PK), kontrola otapala (KO) te negativna kontrola (NK).

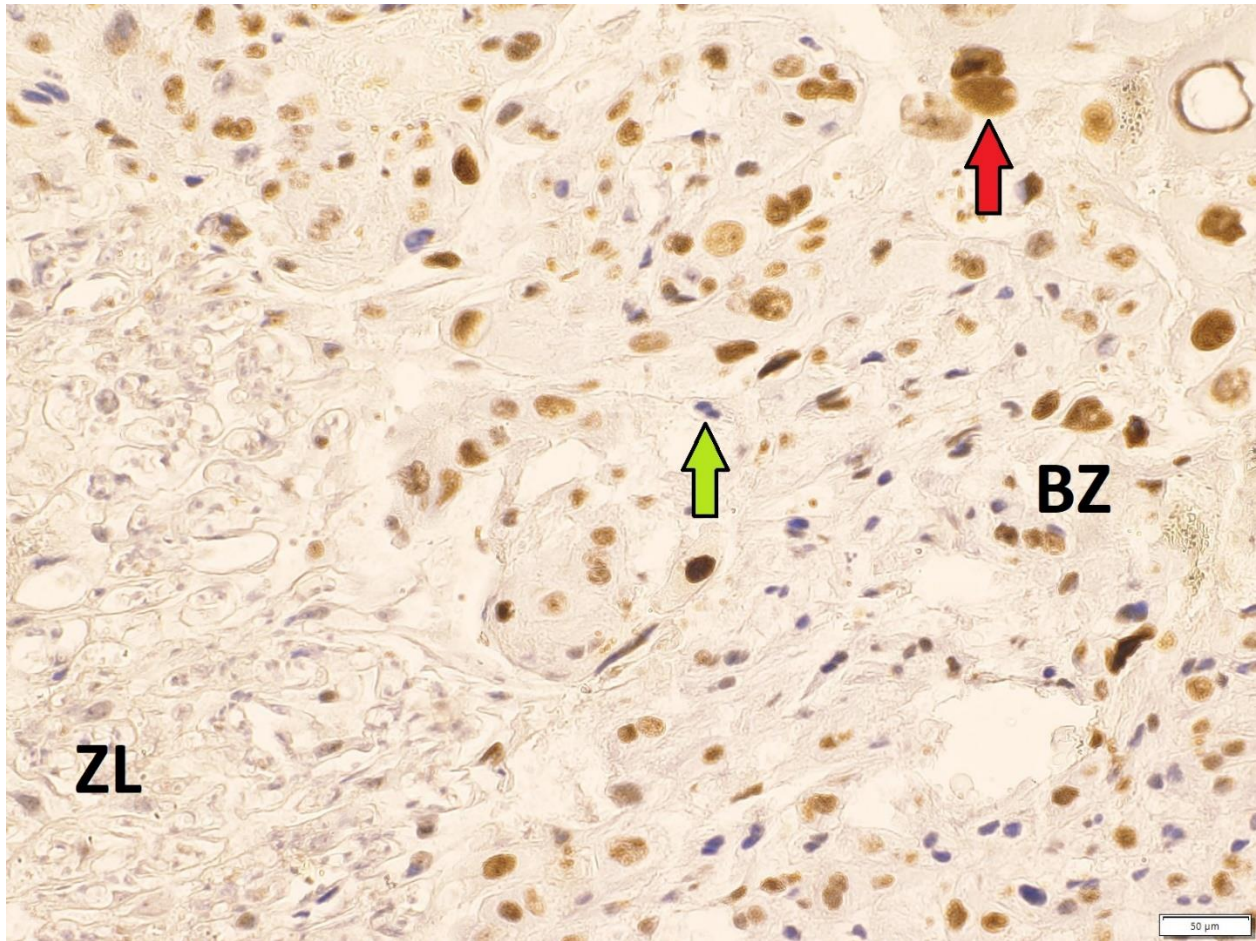
## 4.2. Imunohistokemijske analize

### 4.2.1. Ekspresija histona H3 fosforiliranog na položajima S10 i T11

Utjecaj  $\alpha$ -cipermetrina na rast stanica posteljice određen je imunohistokemijskom detekcijom ekspresije histona H3 koji je fosforiliran na položajima S10 i T11. U uzorcima posteljica pokusnih skupina tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 10 mg/kg/dan te kukuruznim uljem (kontrola otapala) od 6. DG do 21. DG uočena je velika varijabilnost u broju pozitivnih stanica unutar skupina. Proliferacijska aktivnost određena je numeričkom gustoćom stanica. Stanice s jezgrinim signalima za fosforilirani histon H3 brojane su u divovskim stanicama trofoblasta bazalne zone posteljice (Slike 14-16).

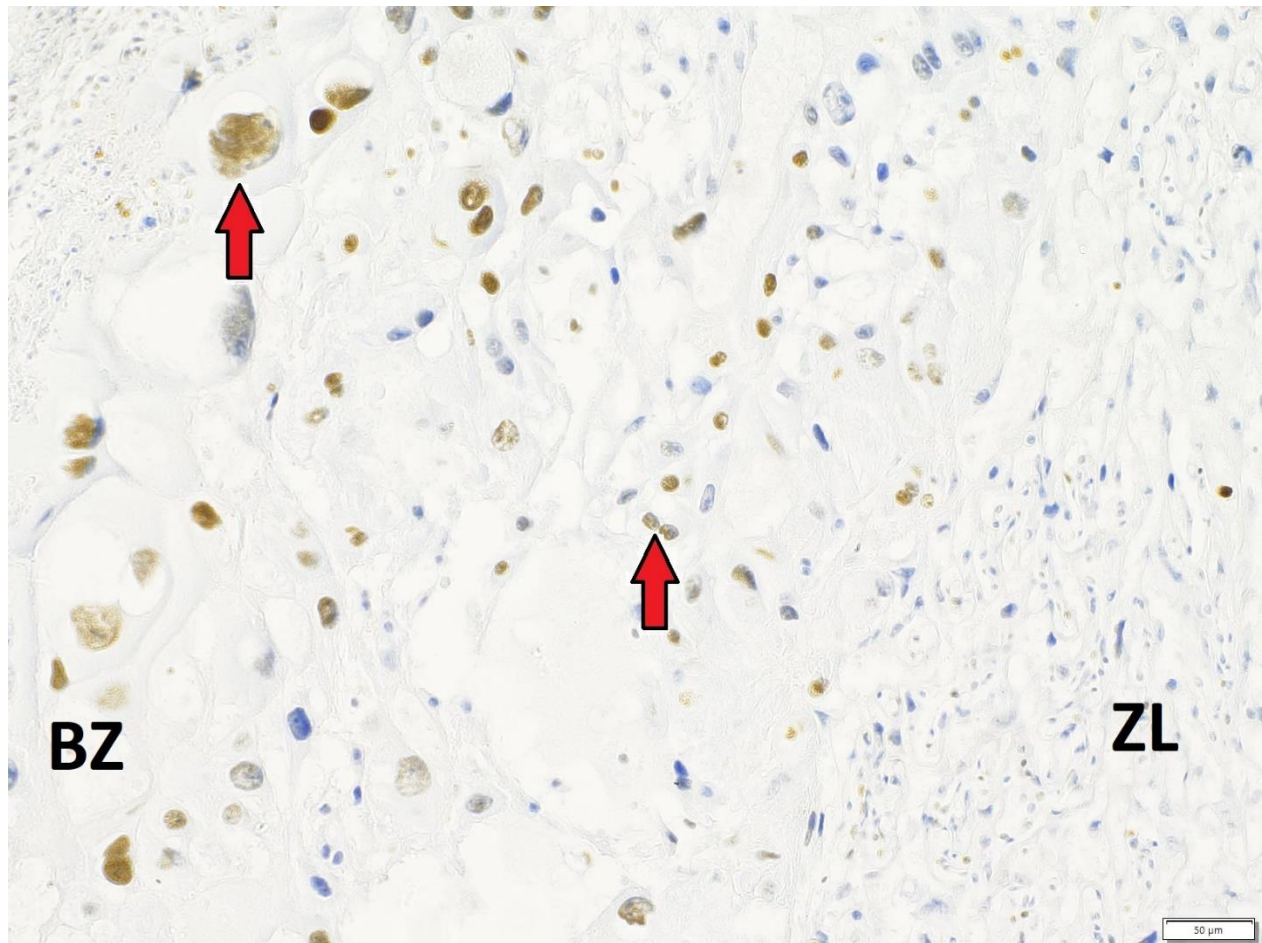


Slika 14. Mnoštvo stanica pozitivnih na histon H3 fosforiliran na položajima S10 i T11 u divovskim stanicama trofoblasta bazalne zone posteljice ženke štakora iz pokusne skupine negativna kontrola, tretirane vodom od 6. dana graviditeta (DG) do 21. DG, 1 mL/dan, *per os*. Odsutnost signala u zoni labirinta. BZ – bazalna zona, ZL – zona labirinta.



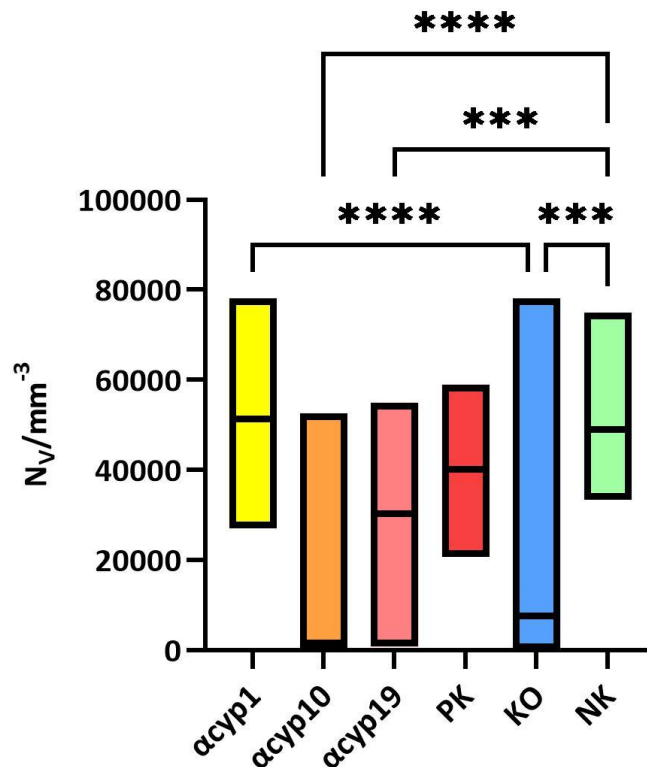
Slika 15. Ekspresija fosforiliranog histona H3 u većini stanica bazalne zone posteljice ženke štakora iz pokusne skupine pozitivna kontrola, tretirane dietilstilbestrolom u dozi od 10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dan}$ , od 6. dana graviditeta (DG) do 21. DG, 1 mL/dan, *per os*. Crvenom strelicom označena je divovska stanica trofoblasta pozitivna na fosforilirani histon H3. Zelenom strelicom označena je stanica bazalne zone posteljice negativna na fosforilirani histon H3. BZ – bazalna zona, ZL – zona labirinta.





Slika 16. Ekspresija fosforiliranog histona H3 u manjem broju stanica bazalne zone posteljice ženke štakora iz pokusne skupine tretirane  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 19 mg/kg/dan, od 6. dana graviditeta (DG) do 21. DG, 1 mL/dan, *per os*. Crvenim strelicama označeni su primjeri stanica pozitivnih na fosforilirani histon H3. BZ – bazalna zona, ZL – zona labirinta.

Statistički značajno smanjenje proliferacije u usporedbi s kontrolom otapala uočeno je u skupini  $\alpha$ cyp1 ( $p < 0,0001$ ). Statistički značajno smanjenje proliferacije u usporedbi s negativnom kontrolom prisutno je u skupinama  $\alpha$ cyp10 ( $p < 0,0001$ ) te  $\alpha$ cyp19 ( $p = 0,0005$ ). Međutim, statistički značajna razlika ( $p = 0,0004$ ) uočena je i između negativne kontrole i kontrole otapala (Slika 17).



Slika 17. Numerička gustoća ( $N_v$ ) stanica pozitivnih na fosforilirani histon H3 u bazalnoj zoni posteljica ženki štakora tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom u dozama od 1 ( $\alpha$ cyp1), 10 ( $\alpha$ cyp10) i 19 mg/kg/dan ( $\alpha$ cyp19), dietilstilbestrolom u dozi od 10  $\mu$ g/kg/dan (pozitivna kontrola, PK), kukuruznim uljem (kontrola otapala, KO) i vodom (negativna kontrola, NK) od 6. dana graviditeta (DG) do 21. DG, 1 mL/dan, *per os*.

Rezultati su prikazani kao medijani te minimalne i maksimalne vrijednosti.

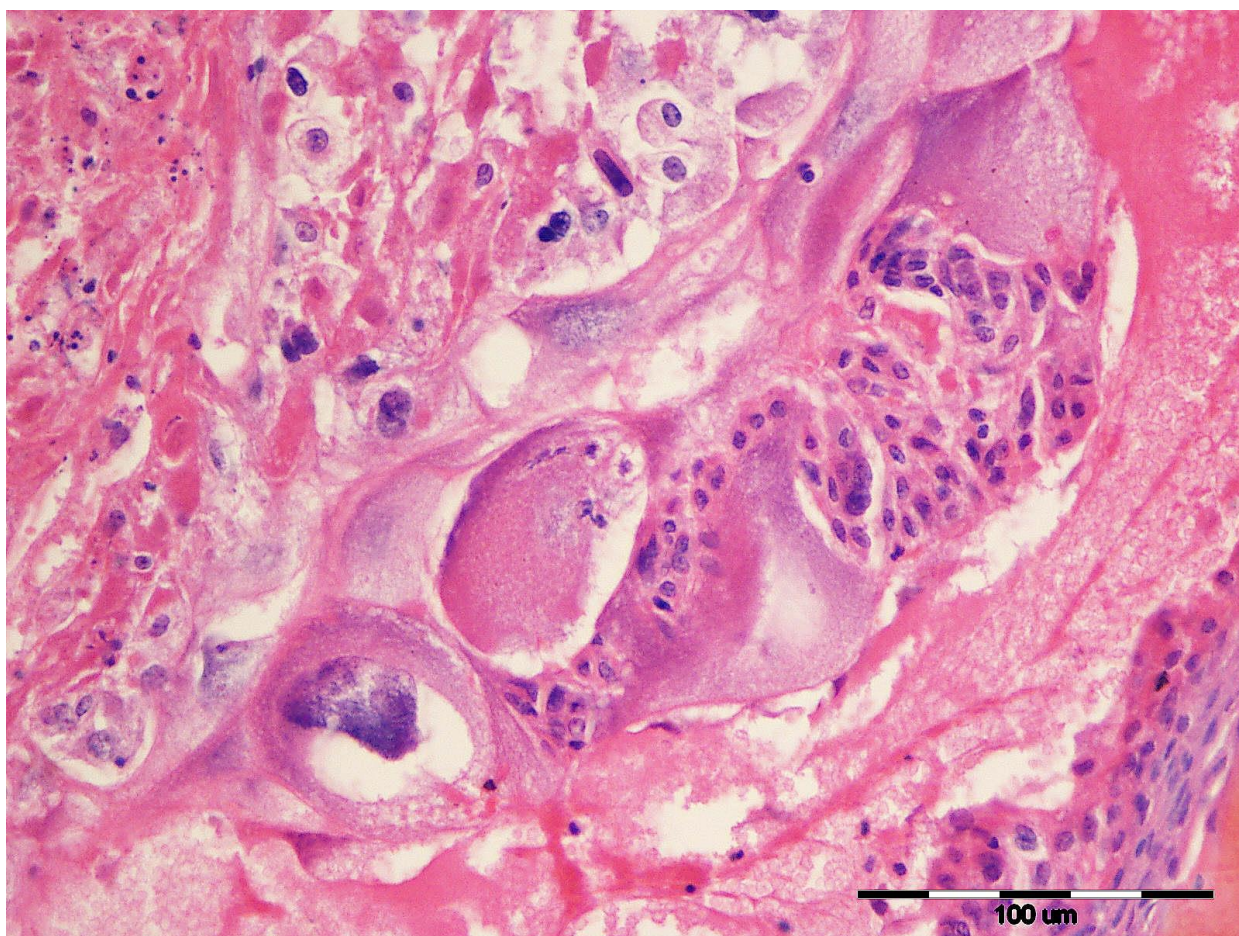
Statistički značajne razlike u vrijednostima između eksperimentalnih skupina izloženih  $\alpha$ -cipermetrinu i negativne kontrole te kontrole otapala označene su zvjezdicama. \*\*\* -  $p < 0,0005$ , \*\*\*\* -  $p < 0,0001$ .

#### 4.2.2. Ekspresija pocijepane kaspaze-3

Utjecaj izloženosti ženki štakora  $\alpha$ -cipermetrinu od 6. DG do 21. DG na apoptozu stanica posteljica određen je imunohistokemijskom detekcijom pocijepane kaspaze-3. U posteljicama ženki štakora nije utvrđena ekspresija pocijepane kaspaze-3. Ispravnost korištenog protutijela potvrđena je imunohistokemijskim bojanjem tumorskih tkiva u kojima je očekivana pojavnost apoptoze.

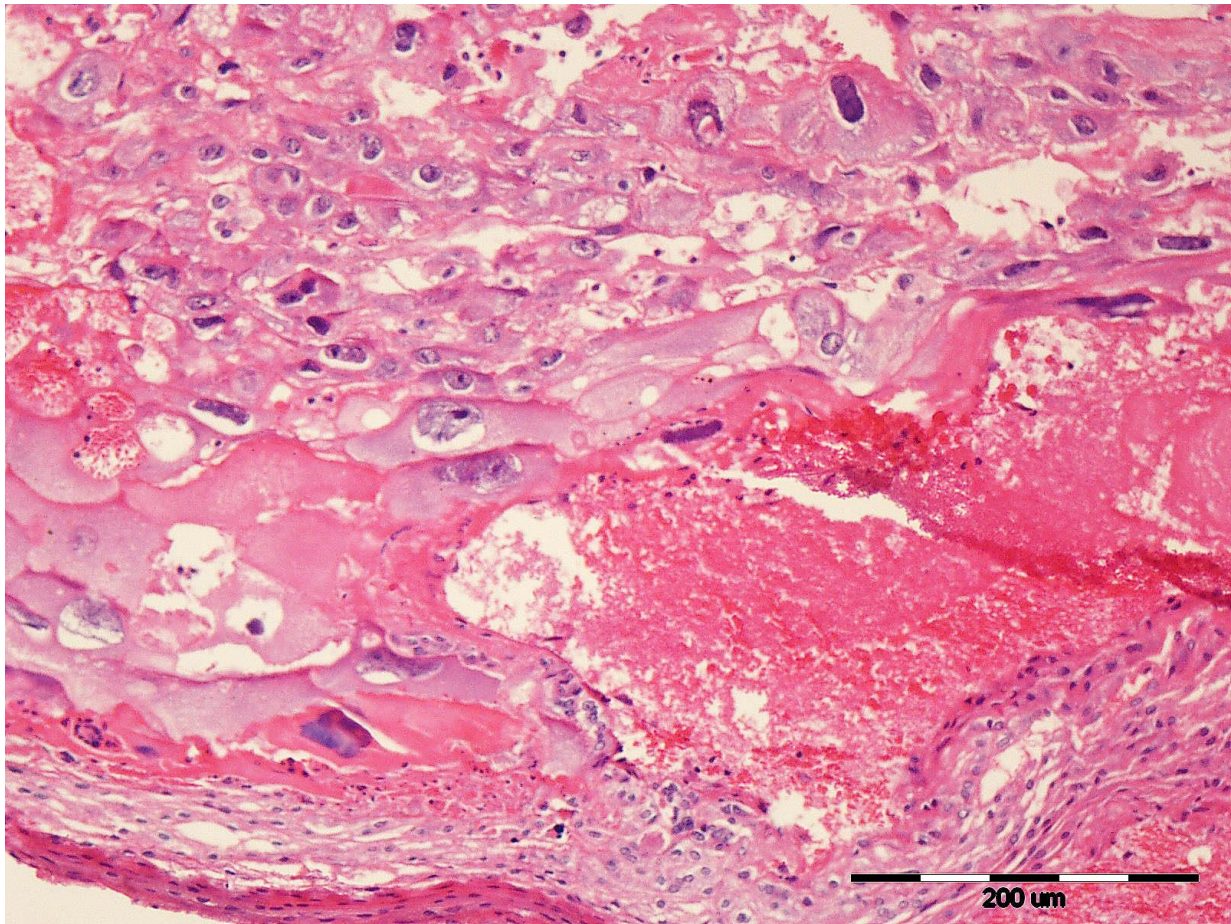
### 4.3. Histopatološke analize

Tijekom analiza tražila se pojavnost sljedećih histopatoloških promjena: povećanje broja i volumena divovskih stanica trofoblasta, polimorfizam u jezgrama divovskih stanica trofoblasta, degeneracija u citoplazmi divovskih stanica trofoblasta, degeneracija spongiotrofoblasta (Slika 18), krvarenje u bazalnoj zoni (Slika 19), krvarenje u zoni labirinta (Slika 20), hiperplazija zone labirinta, smanjeno i nepravilno stvaranje krvnih žila u zoni labirinta, infiltracija limfocita u bazalnoj zoni, infiltracija limfocita u zoni labirinta te cistična degeneracija glikogenskih stanica.



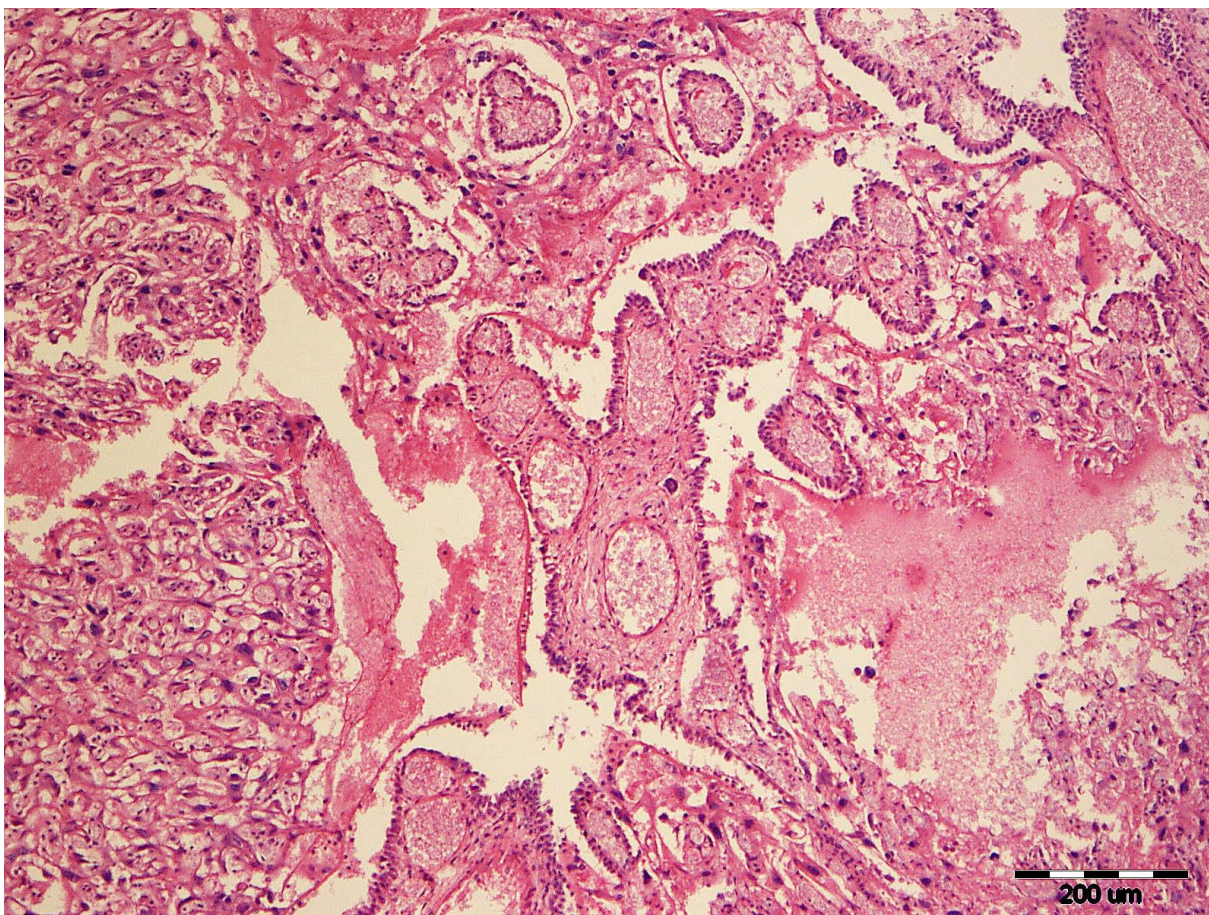
Slika 18. Degeneracija spongiotrofoblasta u tkivu posteljice.





Slika 19. Krvarenje u bazalnoj zoni tkiva posteljice.





Slika 20. Krvarenje u zoni labirinta tkiva posteljice.

U uzorcima posteljica nije pronađeno povećanje broja i volumena divovskih stanica trofoblasta, kao ni hiperplazija zone labirinta. Svaka proučavana promjena u uzorku je označena brojem od 0 do 3, ovisno o težini histološke promjene. Broj 0 označava da ta promjena nije detektirana u uzorku, 1 označava blagu promjenu, 2 umjerenu, a 3 tešku promjenu (Tablice 5-13). Neparometrijskim Kruskal-Wallis testom i Dunnovom višestrukom usporedbom utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika u proučavanim histopatološkim promjenama između uzoraka posteljica ženki štakora iz skupina tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom i kontrolnih skupina.

Tablica 5. Polimorfizam u jezgrama divovskih stanica trofoblasta u posteljicama ženki štakora tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 1 ( $\alpha$ cyp1), 10 ( $\alpha$ cyp10) i 19 mg/kg/dan ( $\alpha$ cyp19), kukuruznim uljem (kontrola otapala, KO) i vodom (negativna kontrola, NK) od 6. dana graviditeta (DG) do 21. DG, 1 mL/dan, *per os*.

Polimorfizam u jezgrama divovskih stanica trofoblasta					
Uzorak	NK	KO	$\alpha$ cyp1	$\alpha$ cyp10	$\alpha$ cyp19
1	0	1	0	1	0
2	0	1	1	1	0
3	1	1	1	1	1

Tablica 6. Degeneracija u citoplazmi divovskih stanica trofoblasta u posteljicama ženki štakora tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 1 ( $\alpha$ cyp1), 10 ( $\alpha$ cyp10) i 19 mg/kg/dan ( $\alpha$ cyp19), kukuruznim uljem (kontrola otapala, KO) i vodom (negativna kontrola, NK) od 6. dana graviditeta (DG) do 21. DG, 1 mL/dan, *per os*.

Degeneracija u citoplazmi divovskih stanica trofoblasta					
Uzorak	NK	KO	$\alpha$ cyp1	$\alpha$ cyp10	$\alpha$ cyp19
1	0	0	1	0	0
2	0	0	0	2	1
3	0	0	0	1	1

Tablica 7. Degeneracija spongiotrofoblasta (nekroza) u posteljicama ženki štakora tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 1 ( $\alpha$ cyp1), 10 ( $\alpha$ cyp10) i 19 mg/kg/dan ( $\alpha$ cyp19), kukuruznim uljem (kontrola otapala) i vodom (negativna kontrola) od 6. dana graviditeta (DG) do 21. DG, 1 mL/dan, *per os*.

Degeneracija spongiotrofoblasta (nekroza)					
Uzorak	NK	KO	$\alpha$ cyp1	$\alpha$ cyp10	$\alpha$ cyp19
1	0	0	2	1	0
2	0	0	0	1	0
3	0	0	0	0	1

Tablica 8. Krvarenje u bazalnoj zoni u posteljicama ženki štakora tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 1 ( $\alpha$ cyp1), 10 ( $\alpha$ cyp10) i 19 mg/kg/dan ( $\alpha$ cyp19), kukuruznim uljem (kontrola otapala) i vodom (negativna kontrola) od 6. dana graviditeta (DG) do 21. DG, 1 mL/dan, *per os*.

Krvarenje u bazalnoj zoni					
Uzorak	NK	KO	$\alpha$ cyp1	$\alpha$ cyp10	$\alpha$ cyp19
1	0	0	3	1	0
2	0	0	0	3	0
3	0	0	0	0	1

Tablica 9. Krvarenje u zoni labirinta u posteljicama ženki štakora tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 1 ( $\alpha$ cyp1), 10 ( $\alpha$ cyp10) i 19 mg/kg/dan ( $\alpha$ cyp19), kukuruznim uljem (kontrola otapala) i vodom (negativna kontrola) od 6. dana graviditeta (DG) do 21. DG, 1 mL/dan, *per os*.

Krvarenje u zoni labirinta					
Uzorak	NK	KO	$\alpha$ cyp1	$\alpha$ cyp10	$\alpha$ cyp19
1	1	0	3	0	1
2	1	0	0	2	0
3	1	0	2	1	0

Tablica 10. Smanjeno i nepravilno stvaranje krvnih žila u zoni labirinta u posteljicama ženki štakora tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 1 ( $\alpha$ cyp1), 10 ( $\alpha$ cyp10) i 19 mg/kg/dan ( $\alpha$ cyp19), kukuruznim uljem (kontrola otapala) i vodom (negativna kontrola) od 6. dana graviditeta (DG) do 21. DG, 1 mL/dan, *per os*.

Smanjeno i nepravilno stvaranje krvnih žila u zoni labirinta					
Uzorak	NK	KO	$\alpha$ cyp1	$\alpha$ cyp10	$\alpha$ cyp19
1	0	0	2	0	0
2	0	0	0	1	0
3	1	0	0	0	0

Tablica 11. Infiltracija limfocita u bazalnoj zoni u posteljicama ženki štakora tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 1 ( $\alpha$ cyp1), 10 ( $\alpha$ cyp10) i 19 mg/kg/dan ( $\alpha$ cyp19), kukuruznim uljem (kontrola otapala) i vodom (negativna kontrola) od 6. dana graviditeta (DG) do 21. DG, 1 mL/dan, *per os*.

Infiltracija limfocita u bazalnoj zoni					
Uzorak	NK	KO	$\alpha$ cyp1	$\alpha$ cyp10	$\alpha$ cyp19
1	0	1	0	0	1
2	0	0	0	0	0
3	1	0	0	0	0

Tablica 12. Infiltracija limfocita u zoni labirinta u posteljicama ženki štakora tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 1 ( $\alpha$ cyp1), 10 ( $\alpha$ cyp10) i 19 mg/kg/dan ( $\alpha$ cyp19), kukuruznim uljem (kontrola otapala) i vodom (negativna kontrola) od 6. dana graviditeta (DG) do 21. DG, 1 mL/dan, *per os*.

Infiltracija limfocita u zoni labirinta					
Uzorak	NK	KO	$\alpha$ cyp1	$\alpha$ cyp10	$\alpha$ cyp19
1	1	0	0	0	0
2	0	0	0	1	1
3	0	0	0	1	1

Tablica 13. Cistična degeneracija glikogenskih stanica u posteljicama ženki štakora tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 1 ( $\alpha$ cyp1), 10 ( $\alpha$ cyp10) i 19 mg/kg/dan ( $\alpha$ cyp19), kukuruznim uljem (kontrola otapala) i vodom (negativna kontrola) od 6. dana graviditeta (DG) do 21. DG, 1 mL/dan, *per os*.

Cistična degeneracija glikogenskih stanica					
Uzorak	NK	KO	$\alpha$ cyp1	$\alpha$ cyp10	$\alpha$ cyp19
1	0	0	0	1	0
2	0	0	0	2	1
3	1	0	1	0	2

## 5. RASPRAVA

Posteljica je privremeni organ s brojnim funkcijama. Osim što predstavlja imunološku barijeru između majke i fetusa te sudjeluje u prijenosu hranjivih tvari, plinova i otpadnih tvari od majke do fetusa, posteljica je tijekom graviditeta i aktivan steroidogeni organ odgovoran za sintezu brojnih hormona nužnih za fetalni, posteljčni i majčin metabolizam i razvoj (Myatt, 2006). Izloženost tvarima iz okoliša, uključujući i endokrine disruptore, tijekom prenatalnog razdoblja može utjecati na održavanje hormonalne ravnoteže. Zbog zastupljenosti velikog broja hormonskih receptora, posteljica je posebno osjetljiv organ na učinke endokrinih disruptora. Izloženost posteljice endokrinim disruptorima dokazano može utjecati na njen razvoj i funkcije te na ishod trudnoće (Gringich i sur., 2020).

Istraživanja provedena na štakorima pokazala su da izloženost endokrinim disruptorima kao što su dietilstilbestrol i bisfenol A mijenja razinu ekspresije gena *ER $\alpha$*  (eng. *Estrogen receptor alpha*) i *ER $\beta$*  (eng. *Estrogen receptor beta*) u različitim tkivima (Khurana i sur., 2000). Izlaganje dietilstilbestrolu i ftalatima u uvjetima *in vitro* povezano je sa smanjenom ekspresijom markera specifičnih za diferencijaciju trofoblasta (Derfoul i sur., 2003, Adibi i sur., 2010). Dietilstilbestrol također utječe na unos kalcija i povezan je sa smanjenom proliferacijom i preživljavanjem stanica trofoblasta (Derfoul i sur., 2003). Ova istraživanja podržavaju ideju da izloženost endokrinim disruptorima može utjecati na promjene u tkivu posteljice te u samom fetusu (Hogg i sur., 2012).

Piretroidi su danas četvrta najčešće korištena skupina insekticida u svijetu prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (WHO, 2016). Iako postoje dokazi o djelovanju piretroida kao endokrinih disruptora (Brander i sur, 2016), do danas nije istraženo djelovanje  $\alpha$ -cipermetrina, sintetskog piretroidnog insekticida tipa II, kao endokrinog disruptora na epigenetičke i razvojne promjene u posteljicama štakora. U ovom su istraživanju po prvi puta proučavani učinci peroralne izloženosti ženki štakora  $\alpha$ -cipermetrinu tijekom gestacije na epigenetičke promjene u posteljicama analizom metilacije ponavljajućih sljedova LINE-1. Također je po prvi put istražen učinak peroralne izloženosti  $\alpha$ -cipermetrinu tijekom gestacije na razvoj posteljica kvantifikacijom markera za rast i programiranu smrt stanica imunohistokemijskom metodom i procjenom histopatoloških promjena.

Budući da stanice posteljice pokazuju jedinstvene obrasce metilacije u usporedbi sa somatskim stanicama, razvoj posteljice predstavlja jedan od najboljih modela za proučavanje epigenetičkih mehanizama (Novaković i sur., 2010). Zbog visoke zastupljenosti u genomu sisavaca (40-50% ovisno o vrsti), ponavljajući sljedovi LINE-1 često se koriste u istraživanjima okolišnih učinaka na globalnu metilaciju genomske DNA (Yang i sur., 2004). Analiza metilacije tri CpG mjesta unutar ponavljajućih sljedova LINE-1 u posteljicama ženki štakora pokazala je negativnu korelaciju između metilacije i korištenih doza  $\alpha$ -cipermetrina u ovom istraživanju. Iako smanjenje postotka metilacije nije statistički značajno u odnosu na negativnu kontrolu, ovaj rezultat hipometilacije ponavljajućih sljedova LINE-1 u skladu je s učinkom drugih endokrinih disruptora na globalnu metilaciju u tkivu posteljice. Istraživanje provedeno na ljudskim posteljicama pokazalo je da izloženost bisfenolu A uzrokuje statistički značajno smanjenje metilacije ponavljajućih sljedova LINE-1 (Nahar i sur., 2015). Zhao i suradnici (2014) su opazili da povećanje koncentracije metabolita ftalata u urinu majke negativno korelira s metilacijom ponavljajućih sljedova LINE-1 u ljudskoj posteljici. Stoga je hipometilacija ovog genomskog područja u provedenom istraživanju na posteljicama ženki štakora izlaganima  $\alpha$ -cipermetrinu tijekom gestacije bila očekivana. Zbog morfološke i genetičke sličnosti između posteljice štakora i miša s ljudskom posteljicom, rezultati epigenetičkih istraživanja u glodavaca mogu se primijeniti na ljude. Pri tome svakako treba imati na umu da se radi o životinjskim modelima koji su nezaobilazni i jako korisni u istraživanjima, kao i da postoje određene razlike između posteljica glodavaca i ljudi (Šerman i Dodig, 2011).

Utjecaj  $\alpha$ -cipermetrina na rast i programiranu smrt stanica određen je imunohistokemijskom detekcijom ekspresije histona H3 fosforiliranog na položajima S10 i T11 te pocijepane kaspaze-3. U stanicama sisavaca, histon H3 fosforilira se u kasnoj G2 fazi, i to u području pericentromernog heterokromatina. S napretkom mitoze, fosforilacija histona H3 proširuje se na cijele kromosome. Proces fosforilacije završava u kasnoj profazi, a ova epigenetska oznaka zadržava se kroz cijelu metafazu. Defosforilacija započinje u anafazi te završava u ranoj telofazi (Hans i Dimitrov, 2001). Fosforilirani histon H3 stoga može služiti kao marker za rast, odnosno proliferaciju stanica. Statistički značajno smanjenje stanica pozitivnih na fosforilirani histon H3 u odnosu na negativnu kontrolu uočeno je u posteljicama ženki štakora iz pokusnih skupina koje su bile izlagane  $\alpha$ -cipermetrinu u dozama od 10 i 19 mg/kg/dan tijekom gestacije. Smanjenje proliferacijske aktivnosti bilo je očekivano s obzirom da je taj utjecaj na posteljicu zabilježen i nakon izloženosti

drugim endokrinim disruptorima. Zhang i suradnici (2020) su utvrdili da prenatalna izloženost endokrinom disruptoru bis(2-etilheksil)-ftalatu inhibira proliferaciju u mišjim posteljicama. U svom su istraživanju imunohistokemijom i imunofluorescencijom detektirali ekspresiju proliferacijskog markera Ki67. Yang i suradnici (2018) su na staničnoj liniji ljudskih stanica trofoblata imunofluorescencijom detektirali ekspresiju jezgrinog antigena proliferirajućih stanica (PCNA) te utvrdili da izloženost endokrinom disruptoru butil parabenu inhibira proliferaciju.

Kaspaze su proteolitički enzimi koji su važni posrednici u procesu apoptoze. Kaspaza-3 ima ulogu u cijepanju mnogih ključnih staničnih proteina, kondenzaciji kromatina te fragmentaciji DNA. Kaspaza-3 stoga ima ključnu ulogu u procesu stanične smrti te stvaranja apoptotskih tjelešaca (Porter i Janicke, 1999). Iz tog razloga se često detektira kao marker apoptotskih procesa. Poznato je da izloženost endokrinim disruptorima može uzrokovati apoptozu u tkivu posteljice. Zhang i suradnici (2015) su ljudske stanice sinciotrofoblata, izolirane iz tkiva posteljica nakon zdravih poroda, izlagali endokrinom disruptoru perfluorooktan sulfonatu. Metodom Western blot su dokazali da izloženost ovom spoju uzrokuje povećanu ekspresiju proapoptotskih proteina Bax i pocijepane kaspaze-3. Najviša testirana doza  $\alpha$ -cipermetrina u provedenom istraživanju iznosila je 19 mg/kg/dan, što je dvostruko manje od trenutne LOAEL vrijednosti za  $\alpha$ -cipermetrin. Zbog nedostatka signala u svim pokusnim skupinama, možemo zaključiti da pri testiranim koncentracijama  $\alpha$ -cipermetrin ne uzrokuje programiranu smrt stanica.

Histopatološkom analizom uzoraka posteljica ženki štakora izloženih  $\alpha$ -cipermetrinu tijekom gestacije uočene su brojne promjene u tkivu posteljice: polimorfizam u jezgrama divovskih stanica trofoblata, degeneracija u citoplazmi divovskih stanica trofoblata, degeneracija spongiotrofoblata, krvarenje u bazalnoj zoni, krvarenje u zoni labirinta, smanjeno i nepravilno stvaranje krvnih žila u zoni labirinta, infiltracija limfocita u bazalnoj zoni, infiltracija limfocita u zoni labirinta te cistična degeneracija glikogenskih stanica. Iako uočene promjene nisu statistički značajne u odnosu na negativnu kontrolu, upućuju na to da  $\alpha$ -cipermetrin čak i pri niskim koncentracijama korištenima u ovom istraživanju može utjecati na razvoj i funkciju tkiva posteljice. Patološke promjene u tkivu posteljice uzrokovane  $\alpha$ -cipermetrinom bile su očekivane i u skladu su s literaturnim podacima za druge endokrine disruptore. Najviše histopatoloških istraživanja na posteljicama provedeno je nakon izloženosti bisfenolu A. Mao i suradnici (2020) su uočili da izloženost bisfenolu A uzrokuje smanjenje omjera spongiotrofoblata i divovskih

stanica trofoblata u mišjim posteljicama. Izloženost bisfenolu A uzrokovala je degeneraciju i nekrozu divovskih stanica trofoblata te smanjenje sloja sinciotrofoblata (Tait i sur., 2015). Prenatalna izloženost bisfenolu A utjecala je na smanjenje udjela zone labirinta u odnosu na ukupno tkivo posteljice, degeneraciju divovskih stanica trofoblata i spongiotrofoblata (Tachibana i sur., 2007). S obzirom da su za histopatološke analize korištena samo tri stakla po pokusnoj skupini, za utvrđivanje značajnosti utjecaja  $\alpha$ -cipermetrina na histopatološke promjene, analizu bi trebalo provesti na većem broju uzoraka.

## 6. ZAKLJUČAK

U ovom je radu po prvi puta istražen učinak peroralne izloženosti piretroidnom insekticidu  $\alpha$ -cipermetrinu, kao endokrinom disruptoru, tijekom gestacije na globalnu metilaciju DNA, proliferaciju, apoptozu te histopatološke promjene u tkivu posteljica ženki štakora. Na temelju rezultata provedenog istraživanja možemo zaključiti sljedeće:

- Analizom tri CpG dinukleotida unutar ponavljajućih sljedova LINE-1 u posteljicama ženki štakora pokazano je da izloženost rastućim koncentracijama  $\alpha$ -cipermetrina prati smanjenje globalne metilacije DNA, međutim uočene razlike nisu bile statistički značajne.
- Imunohistokemijskom analizom ekspresije fosforiliranog histona H3 utvrđeno je statistički značajno smanjenje proliferacije u pokusnim skupinama tretiranim  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 10 i 19 mg/kg/dan tijekom gestacije.
- Analizom ekspresije pocijepane kaspaze-3 utvrđeno je da pri testiranim koncentracijama  $\alpha$ -cipermetrin ne uzrokuje apoptozu.
- Histopatološkom analizom uočene su brojne promjene u tkivu posteljica ženki štakora iz pokusnih skupina izloženih  $\alpha$ -cipermetrinu. Međutim, u usporedbi s negativnom kontrolom, ove razlike nisu statistički značajne.

Za bolje razumijevanje utjecaja  $\alpha$ -cipermetrina na epigenetičke i razvojne parametre u posteljicama ženki štakora, istraživanje bi trebalo provesti na većem broju uzoraka, uz proširenje epigenetičkih analiza na veći broj CpG dinukleotida unutar ponavljajućih sljedova LINE-1.



## 7. LITERATURA

Adibi J. J., Whyatt R. M., Hauser R., Bhat H. K., Davis B. J., Calafat A. M., Hoepner L. A., Perera F. P., Tang D., Williams P. L. (2010): Transcriptional biomarkers of steroidogenesis and trophoblast differentiation in the placenta in relation to prenatal phthalates exposure. *Environmental Health Perspectives*, 118(2), 251-256.

Andersen H. R., Cook S. J., Waldbilig, D. (2002): Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 179(1), 1-12.

Bern H. (1992): The fragile fetus. U: Colborn T, Clement C. Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection. Princeton, NJ: Princeton Scientific, 9–16.

Bird A. (2007): Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447, 396-398.

Bromer J. G., Wu J., Zhou Y., Taylor H. S. (2009): Hypermethylation of HOXA10 by *in utero* diethylstilbestrol exposure: An epigenetic mechanism for altered developmental programming. *Endocrine Reviews*, 30(3), 285-292.

Coker E., Chevrier J., Rauch S., Bradman A., Obida M., Crause M., Bornman R., Eskenazi B. (2018): Association between prenatal exposure to multiple insecticides and child body weight and body composition in the VHEMBE South African birth cohort. *Environment International*, 113, 122-132.

Colton T., Greenberg E. R., Noller K., Resseguie L., Van Bennekom C., Heeren T., Zhang Y. (1993): Breast cancer in mothers prescribed diethylstilbestrol in pregnancy. *New England Journal of Medicine*, 269(16), 2096-2100.

Cooper J., Dobson H. (2007): The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Protection*, 26(9), 1337-1348.

Crawford M. J., Croucher A., Hutson D. H. (1981): The metabolism of the pyrethroid insecticide cypermethrin in rats; excreted metabolites. *Pesticide Science*, 12(4), 399-411.

Derfoul A., Lin F. J., Awumey E. M., Kolodzeski T., Hall D. J., Tuan R. S. (2003): Estrogenic endocrine disruptive components interfere with calcium handling and differentiation of human trophoblast cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 89(4), 755-770.

Duraiyan J., Govindarajan R., Kaliyappan K., Palanisamy M. (2012): Applications of immunohistochemistry, *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4(6), S307- S309).

Elser B. A., Kayali K., Dhakal R., O'Hare B., Wang K., Joachim-Lehmler H., Stevens H. E. (2020): Combined maternal exposure to cypermethrin and stress affect embryonic brain and placental outcomes in mice. *Toxicological Sciences*, 175(2), 182-196.

Enders A. C., Blankenship T. N. (1999): Comparative placental structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 38(1), 3-15.

Farag A. T., Goda N. F., Shaaban N. A., Mansee A. H. (2007): Effects of oral exposure of synthetic pyrethroid, cypermethrin on the behaviour of F1-progeny of mice. *Reproductive Toxicology*, 23(4), 560-567.

Furlong M. A., Barr D. B., Wolff M. S., Engel S. M. (2017): Prenatal exposure to pyrethroid pesticides and childhood behavior and executive functioning. *Neurotoxicology*, 62, 231-238.

Furukawa S., Kuroda Y., Sugiyama A. (2014): A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. *Journal of Toxicologic Pathology*, 27(1), 11-18.

Gama-Sosa M. A., Wang R. Y., Kuo K. C., Gehrke C. W., Ehrlich M. (1983): The 5-methylcytosine content of highly repeated sequences in human DNA. *Nucleic Acids Research*, 11(10), 3087-3095.

Gill W. B., Schumacher G. F. B., Bibbo M., Straus F. H., Schoenberg H. W. (1979): Association of diethylstilbestrol exposure *in utero* with cryptorchidism, testicular hypoplasia and semen abnormalities. *Journal of Urology*, 122, 36-39.

Gingrich J., Ticiani E., Veiga-Lopez A. (2020): Placenta disrupted: endocrine disrupting chemicals and pregnancy. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 31(7), 508-524.

Hamm C.A., Xie H., Costa F.F., Vanin E.F., Seftor E.A., Sredni S.T., Bischof J., Wang D., Bonaldo M.F., Hendrix M.J.C., Soares M.B. (2009): Global demethylation of rat chondrosarcoma cells after treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine results in increased tumorigenicity. *PLoS ONE*, 4(12).

Hans F., Dimitrov S. (2001): Histone H3 phosphorylation and cell proliferation. *Oncogene*, 20(24), 3021-3027.

Herbst A. L., Ulfelder H., Poskanzer D. C. (1971): Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *New England Journal of Medicine*, 284(15), 878-881.

Hogg K., Price E. M., Hanna C. W., Robinson W. P. (2012): Prenatal and perinatal environmental influences on the human fetal and placental epigenome. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 92(6), 716-726.

International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409, 860-921.

Jirtle R. L., Skinner M. K. (2007): Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nature Reviews Genetics*, 8, 253-262.

Kališnik, M. (1985): Temelji stereologije. Stereološka sekcija Zveze društev anatomov Jugoslavije, Institut za histologijo in embriologijo MF, Ljubljana, 59-65.

Kaufman R. H., Adam E. (1978): Genital tract anomalies associated with *in utero* exposure to diethylstilbestrol. *Israel Medical Association Journal*, 14(3), 353-362.

Kavlock, R. J., Daston G. P., DeRosa C., Fenner-Crisp P., Gray L. E., Kaattari S., Lucier G., Luster M., Mac M. J., Maczka C., Miller R., Moore J., Rolland R., Scott G., Sheehan D. M., Sinks T., Tilson H. A. (1996): Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives*, 104(4), 715-740.

Khurana S., Ranmal S., Ben-Jonathan N. (2000): Exposure of newborn male and female rats to environmental estrogens: delayed and sustained hyperprolactinemia and alterations in estrogen receptor expression. *Endocrinology*, 141(12), 4512-4517.

Kojima H., Katsura E., Takeuchi S., Niiyama K., Kobayashi K. (2004): Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by *in vitro* reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environmental Health Perspectives*, 112(5), 524-531.

Korach K. S., Metzler M., McLachlan J. A. (1978): Estrogenic activity *in vivo* and *in vitro* of some diethylstilbestrol metabolites and analogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(1), 468-471.

Li S., Washburn K. A., Moore R., Uno T., Teng C., Newbold R. R., McLachlan J. A., Negishi M. (1997): Developmental exposure to diethylstilbestrol elicits demethylation of estrpgeen-responsive lactoferrin gene in mouse uterus. *Cancer Research*, 57(19), 4356-4359.

Li S., Hursting S. D., Davis B. J., McLachlan J. A., Barrett J. C. (2003): Environmental exposure, DNA methylation, and gene regulation: lessons from diethylstilbestrol-induced cancers. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 983, 161-169.

Ma L., Benson G. V., Lim H., Dey S. K., Maas R. L. (1998): Abdominal B (AbdB) Hoxa genes: regulation in adult uterus by estrogen and progesterone and repression in mullerian duct by the synthetic estrogen diethylstilbestrol (DES). *Developmental Biology*, 197(2), 141-154.

Maccani M. A., Marsit C. J. (2009): Epigenetics in the placenta. *American Journal of Reproductive Immunology*, 62(2), 78-89.

Maitre L., Robinson O., Martinez D., Toledano M. B., Ibarluzea J., Marina L. S., Sunyer J., Villanueva C. M., Keun H. C., Vrijheid M., Coen M. (2018): Urine metabolic signatures of multiple environmental pollutants in pregnant women. *Environmental Science and Technology*, 52(22), 13469-13480.

Mao J., Jain A., Denslow N. D., Nouri M. Z., Chen S., Wang T., Zhu N., Koh J., Sarma S. J., Sumner B. W., Lei Z., Sumner L. W., Bivens N. J., Roberts R. M., Tuteja G., Rosenfeld C. S. (2020): Bisfenol A and bisphenol S disruptions of the mouse placenta and potential effects on the placenta-brain axis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(9), 4642-4652.

Marcondes F. K., Bianchi F. J., Tanno A. P. (2002): Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful consideratons. *Brazilian Journal of Biology*, 62(4A), 609-614.

Marei A. E. M., Ruzo L. O., Casida J. E. (1982): Analysis and persistence of permethrin, cypermethrin, deltamethrin and fenvalerate in the fat and brain of treated rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(3), 558-562.

McLachlan J. A., Newbold R. R., Bullock B. (1975): Reproductive tract lesions in male mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Science*, 190(4218), 991-992.

McLachlan J. A., Newbold R. R., Shah H. C., Hogan M. D., Dixon R. L. (1982): Reduced fertility in female mice exposed transplacentally to diethylstilbestrol (DES). *Fertility and Sterility*, 38(3), 364-371.

Miller C., Degenhardt K., Sassoon D. A. (1998): Fetal exposure to DES results in de-regulation of Wnt7a during uterine morphogenesis. *Nature Genetics*, 20(3), 228-230.

Mnif W., Ibn Hadj Hassine A., Bouaziz A., Bartegi A., Thomas O., Roig B. (2011): Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(6), 2265-2303.

Monneret C. (2017): What is an endocrine disruptor? *Comptes Rendus Biologies*, 340(9-10), 403-405.

Myatt L. (2006): Placental adaptive responses and fetal programming. *The Journal of Physiology*, 572(Pt 1), 25-30.

Nahar M. S., Liao C., Kannan K., Harris C., Dolinoy D. C. (2015): *In utero* bisphenol A concentration, metabolism, and global DNA methylation across matched placenta, kidney, and liver in the human fetus. *Chemosphere*, 124(1), 54-60.

Narahashi T., Zhao X., Ikeda T., Nagata K., Yeh J. Z. (2007): Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. *Human and Experimental Toxicology*, 26(4), 361-366.

Newbold R. R. (2004): Lessons learned from perinatal exposure to diethylstilbestrol. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 199(2), 142-150.

Newbold R. R., Padilla-Banks E., Jefferson W. N. (2006): Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations. *Endocrinology*, 147(6), 11-17.

Novakovic B., Wong N. C., Sibson M., Ng H. K., Morley R., Manuelpillai U., Down T., Rakyan V. K., Beck S., Hiendleder S., Roberts C. T., Craig J. M., Saffery R. (2010): DNA methylation-mediated down-regulation of DNA methyltransferase-1 (DNMT1) is coincident with, but not essential for, global hypomethylation in human placenta. *Journal of Biological Chemistry*, 285(13), 9583-9593.

Novakovic B., Saffery R. (2012): The ever growing complexity of placental epigenetics – Role in adverse pregnancy outcomes and fetal programming. *Placenta*, 33(12), 959-970.

Paccola C. C., Resende C. G., Stumpp T., Miraglia S. M., Cipriano I. (2013): The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Animal Reproduction*, 10(4), 677-683.

Porter A. G., Janicke R. U. (1999): Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 6, 99-104.

Rat Genome Sequencing Project Consortium (2004). *Nature*, 428, 493-521.

Ray D. E., Fry J. R. (2006): A reassessment of neurotoxicity of pyrethroid insecticides. *Pharmacology and Therapeutics*, 111(1), 174-193.

Romero A., Ramos E., Ares I., Castellano V., Martinez M., Martinez-Larranaga M. R., Anadon A., Martinez M. A. (2017): Oxidative stress and gene expression profiling of cell death pathways in alpha-cypermethrin-treated SH-SY5Y cells. *Archives of Toxicology*, 91(5), 2151-2164.

Santos F., Hendrich B., Reik W., Dean W. (2002): Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Developmental Biology*, 241(1), 172-182.

Senekjian E. K., Potkul R. K., Frey K., Herbst A. L. (1988): Infertility among daughters either exposed or not exposed to diethylstilbestrol. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 158(3), 493-498.

Shekhar S., Sood S., Showkat S., Lite C., Chandrasekhar A., Vairamani M., Barathi S., Santosh W. (2017): Detection of phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) from maternal blood plasma and amniotic fluid in Indian population. *General and Comparative Endocrinology*, 241, 100-107.

Skakkebaek N. E., Toppari J., Soder O., Gordon C. M., Divall S., Draznin M. (2011): The exposure of fetuses and children to endocrine disrupting chemicals: A European Society for Paediatric Endocrinology (ESPE) and Pediatric Endocrine Society (PES) call to action statement. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(10), 3056-3058.

Soderlund D. M., Clark J. M., Sheets L. P., Mullin L. S., Piccirillo V. J., Sargent D., Stevens J. T., Weiner M. L. (2002): Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. *Toxicology*, 171(1), 3-59.

Sundrani D. P., Chavan Gautam P. M., Mehendale S. S., Joshi S. R. (2011): Altered metabolism of maternal micronutrients and omega 3 fatty acids epigenetically regulate matrix metalloproteinases in preterm pregnancy: a novel hypothesis. *Medical Hypotheses*, 77(5), 878-883.

Syme M. R., Paxton J. W., Keelan J. A. (2004): Drug transfer and metabolism by the human placenta. *Clinical Pharmacokinetics*, 43(8), 487-514.

Šerman L., Dodig D. (2011): Impact of DNA methylation on trophoblast function. *Clinical Epigenetics*, 3(1):7.

Šerman L., Sinčić, N., Vlahović M., Bulić-Jakuš F., Jurić-Lekić G., Šerman A., Katušić A. (2006): Foetal survival determined by 5-azacytidine impact on the placenta, *Acta clinica Croatica*, 45(2), 141-144.

Tabb M. M., Blumberg B. (2006): New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Molecular Endocrinology*, 20(3), 475-482.

Tachibana T., Wakimoto Y., Nakamuta N., Phichitraslip T., Wakitani S., Kusakabe K., Hondo E., Kiso Y. (2007): Effects of bisphenol A (BPA) on placentation and survival of the neonates in mice. *The Journal of Reproduction and Development*, 53(3), 509-514.

Tait S., Tassinari R., Maranghi F., Mantovani A. (2015): Bisphenol A affects placental layers morphology and angiogenesis during early pregnancy phase in mice. *Journal of Applied Toxicology*, 35(11), 1278-1291.

Tang W., Wang D., Wang J., Wu Z., Li L., Huang M., Xu S., Yan D. (2018): Pyrethroid pesticide residues in the global environment: an overview. *Chemosphere*, 191, 990-1007.

Vryer R., Saffery R. (2017): What's in a name? Context-dependent significance of 'global' methylation measures in human health and disease. *Clinical Epigenetics*, 9(2).

Xue Z., Li X., Su Q., Xu L., Zhang P., Kong Z., Xu J., Teng J. (2013): Effect of synthetic pyrethroid pesticide exposure during pregnancy on the growth and development of infants. *Asia-Pacific Journal of Public Health*, 25(4), 72S-79S.

Yang A. S., Estecio M. R., Doshi K., Kondo Y., Tajara E. H., Issa J. P. (2004): A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Research*, 32(3), e38.

Yang C., Lim W., Bazer F. W., Song G. (2018): Butyl paraben promotes apoptosis in human trophoblast cells through increased oxidative stress-induced endoplasmic reticulum stress. 33(4), 436-445.

Yavuz O., Kayir H., Yilmaz I., Ulusoy G., Cakir G., Macit E., Tayfun Uzbay L. (2009): Subchronic toxicity and neurobehavioural effects of alphacypermethrin in rats. *Fresenius Environmental Bulletin*, 18(8), 1417-1423.

Yuen R. K., Jiang R., Penaherrera M. S., McFadden D. E., Robinson W. P. (2011): Genome-wide mapping of imprinted differentially methylated regions by DNA methylation profiling of human placentas from triploidies. *Epigenetics Chromatin*, 4(1), 10.

Zhang N., Wang W. S., Li W. J., Liu C., Wang Y., Sun K. (2015): Reduction of progesterone, estradiol and hCG secretion by perfluorooctane sulfonate via induction of apoptosis in human placental syncytiotrophoblasts. *Placenta*, 36(5), 575-580.

Zhang S., Sun C., Zhao S., Wang B., Wang H., Zhang J., Wang Y., Cheng H., Zhu L., Shen R., Sun M., Xu T., Zhao L. (2020): Exposure to DEHP or its metabolite MEHP promotes progesterone secretion and inhibits proliferation in mouse placenta or JEG-3 cells. *Environmental Pollution*, 257:113593.

Zhao Y., Shi, H. J., Xie C. M., Chen J., Laue H., Zhang Y. H. (2014): Prenatal phthalate exposure, infant growth, and global DNA methylation of human placenta. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 56(3), 286-292.

<https://diethylstilbestrol.co.uk/endocrine-disruption-oestrogen-action/> (pristupljeno 16.2.2022.)



<https://international.neb.com/applications/epigenetics/dna-methylation-analysis/bisulfite-conversion> (pristupljeno 17.10.2021.)

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6c/Alpha-cypermethrin.svg>  
(pristupljeno 26.1.2022.)

<https://www.bdbiosciences.com/en-lu/learn/applications/immunohistochemistry#Overview>  
(pristupljeno 22.10.2021.)

<https://www.qiagen.com/us/knowledge-and-support/knowledge-hub/technology-and-research/pyrosequencing-resource-center/pyrosequencing-technology-and-platform-overview/>  
(pristupljeno 21.10.2021.)

<https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/substance/diethylstilbestrol2683556531>  
(pristupljeno 18.1.2022.)

USEPA (2012) US Environmental Protection Agency. Alpha-cypermethrin – Human Health Risk Assessment for New Active Ingredient. <https://www.regulations.gov/document?D=EPA-HQ-OPP-2012-0185-0005> (pristupljeno 26.1.2022.)

WHO/IPCS (2002) Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. World Health Organization/International Program on Chemical Safety. WHO/PCS/EDC/02.2. [www.who.int/pcs/emerg\\_site/edc/global\\_edc\\_ch5.pdf](http://www.who.int/pcs/emerg_site/edc/global_edc_ch5.pdf) (pristupljeno 26.3.2022.)

WHO (2016) Pesticide Evaluation Scheme, Vector Ecology and Management; World Health Organization, Geneva, Switzerland.

[https://www.who.int/neglected\\_diseases/resources/WHOPES/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/resources/WHOPES/en/) (pristupljeno 28.3.2022.)

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam u Zagrebu gdje sam 2016. godine završila program dvojezične nastave na engleskom jeziku IV. gimnazije. Iste sam godine upisala preddiplomski studij Znanosti o okolišu na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu. U rujnu 2019. godine upisala sam diplomski studij Molekularna biologija. Odlično poznajem engleski jezik u govoru i pismu, a imam dobro znanje njemačkog te osnovno znanje francuskog jezika. Za vrijeme studija sudjelovala sam na studentskom projektu „Mramorni i bodljobradi rak kao prijenosnici bolesti račje kuge u Hrvatskoj“. U sklopu tog projekta odradila sam laboratorijsku stručnu praksu u Laboratoriju za biologiju i genetiku mikroorganizama na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu u Zagrebu. Sudjelovala sam u predstavljanju Biološkog odsjeka na Smotri Sveučilišta u Zagrebu, te u manifestaciji Noć biologije. Za vrijeme studija imala sam priliku steći radno iskustvo u struci. Radila sam dijagnostiku genetskih bolesti za tvrtku Inovagen d.o.o., a u poliklinici SYNLAB radila sam RT-PCR dijagnostiku bolesti COVID-19.

### Publikacije:

Himmelreich Perić M., Krsnik D., Katušić Bojanac A., Merčep A., Petrina P., Neuberg M., Kozina G., Katić A. Histological assessment of foetal rat testes prenatally treated with  $\alpha$ -cypermethrin. 6th Croatian Congress of Toxicology with International Participation CROTOX 2021, Rabac, Hrvatska.