

# Učinci prenatalne izloženosti alpha cipermetrinu na endokrinu disrupciju, razvoj i reprodukciju ženki Wistar štakora

---

Bošnjaković, Anja

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:217:006092>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-13**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Anja Bošnjaković

**Učinci prenatalne izloženosti  
 $\alpha$ -cipermetrinu na endokrinu disrupciju,  
razvoj i reprodukciju ženki Wistar štakora**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Anja Bošnjaković

**Effects of prenatal  $\alpha$ -cypermethrin  
exposure on endocrine disruption,  
development and reproduction of female  
Wistar rats**

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad izrađen je u Jedinici za toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, pod mentorstvom dr. sc. Anje Katić te komentorstvom prof. dr. sc. Domagoja Đikića sa Zavoda za animalnu fiziologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Diplomski rad je izrađen u sklopu internog projekta Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada pod nazivom „Procjena učinaka prenatalne izloženosti  $\alpha$ -cipermetrinu na epigenetičko programiranje i endokrinu disrupciju reprodukcije i razvoja pokusnih štakora“, čiji je voditelj dr. sc. Anja Katić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra eksperimentalne biologije.

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

---

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Učinci prenatalne izloženosti $\alpha$ - cipermetrinu na endokrinu disrupciju, razvoj i reprodukciju ženki Wistar štakora

Anja Bošnjaković

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Piretroidi su sintetski spojevi, pesticidnog djelovanja, dobiveni derivacijom prirodnih insekticida piretrina sadržanih u piretrumu. Budući da je dokazano da piretroidi mogu djelovati kao endokrini disruptori, cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj prenatalne peroralne izloženosti piretroidu  $\alpha$ -cipermetrinu na parametre endokrine disrupcije reprodukcije majki te parametre endokrine disrupcije razvoja i reprodukcije ženskih potomaka F1 generacije. Skotne Wistar štakorice izlagane su  $\alpha$ -cipermetrinu u dozama od 1, 10 i 19 mg/kg tj. m./dan (1 mL/dan, *per os*) od 6. dana graviditeta do okota. Usporedno su uspostavljene skupine negativne kontrole (voda), kontrole otapala (kukuruzno ulje) i pozitivne kontrole (dietilstilbestrol, 10  $\mu$ g/kg tj. m./dan). Parametri endokrine disrupcije reprodukcije praćeni su u majki štakorica pri okotu, a u ženskih potomaka F1 generacije praćeni su parametri endokrine disrupcije razvoja i reprodukcije do puberteta sukladno odgovarajućim OECD protokolima. Tijekom gestacije izmjerene su tjelesne mase majki i potrošnja hrane. Određene su razine steroidnih hormona u serumu ženskih potomaka u pubertetu imunokemijskom metodom ELISA. Peroralna izloženost  $\alpha$ -cipermetrinu tijekom gestacije ne utječe na reprodukciju majki i na razvoj i reprodukciju ženskih potomaka F1 generacije, kao ni na razine steroidnih hormona u pubertetu.

Ključne riječi: piretroid, endokrini disruptor, anogenitalni razmak, ulazak u pubertet, steroidni hormoni, potomci štakora

(37 stranica, 14 slika, 7 tablica, 56 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: dr. sc. Anja Katić

Komentor: prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Ocjenitelji:

Prof. dr. sc. Domagoj Đikić

Izv. prof. dr. sc. Anamaria Štambuk

Izv. prof. dr. sc. Duje Lisičić

Rad prihvaćen: 08.09.2022.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

---

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

# Effects of prenatal $\alpha$ -cypermethrin exposure on endocrine disruption, development and reproduction of female Wistar rats

Anja Bošnjaković

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Pyrethroids are synthetic compounds, with pesticidal action, obtained by derivation of natural pyrethrin insecticides contained in pyrethrum. Since it has been proven that pyrethroids can act as endocrine disruptors, this work aimed to investigate the effects of prenatal oral exposure to the pyrethroid  $\alpha$ -cypermethrin on the endocrine disruption parameters of maternal reproduction and the endocrine disruption parameters of F1 female offspring development and reproduction. Pregnant Wistar rats were exposed to  $\alpha$ -cypermethrin in doses of 1, 10, and 19 mg/kg b.w./day (1 mL/day, *per os*) from the 6<sup>th</sup> day of pregnancy until delivery. Groups of negative control (water), solvent control (corn oil), and positive control (diethylstilbestrol, 10  $\mu$ g/kg b.w./day) were established concurrently. The parameters of endocrine disruption of reproduction were monitored in mothers at delivery, and in F1 female offspring the parameters of endocrine disruption of development and reproduction were monitored until puberty following the appropriate OECD protocols. During gestation, maternal body mass and food consumption were measured. Levels of steroid hormones in the serum of pubertal female offspring were determined using immunochemical method ELISA. Oral exposure to  $\alpha$ -cypermethrin during pregnancy does not affect the reproduction of mothers and the development and reproduction of F1 female offspring as well as the levels of steroid hormones in puberty.

Keywords: pyrethroid, endocrine disruptor, anogenital distance, onset of puberty, steroid hormones, rat offspring

(37 pages, 14 figures, 7 tables, 56 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: Anja Katić, PhD, Research Associate

Co-mentor: Domagoj Đikić, PhD, Full Professor

Reviewers:

Prof. Domagoj Đikić  
Assoc. Prof. Anamaria Štambuk  
Assoc. Prof. Duje Lisičić

Thesis accepted: 08.09.2022.

# Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	1
1.1. Pesticidi.....	1
1.2. Piretrin .....	2
1.3. Piretroidi .....	3
1.4. $\alpha$ -cipermetrin.....	5
1.5. Endokrini disruptori.....	6
1.6. Endokrini sustav .....	8
1.7. Jajnik.....	10
1.8. Steroidogeneza jajnika.....	12
<b>2. Cilj istraživanja</b> .....	14
<b>3. Materijali i metode</b> .....	15
3.1. Pokusne životinje.....	15
3.2. Postupci tijekom pokusa .....	16
3.2.1. Praćenja faza estrusnih ciklusa .....	16
3.2.2. Odabir životinja za pokus i parenje životinja .....	18
3.2.3. Opis pokusnih skupina i tretiranje životinja .....	19
3.3. Praćenja tjelesnih masa i potrošnje hrane tijekom gestacije.....	20
3.4. Praćenja parametara endokrine disrupcije reprodukcije majki Wistar štakora.....	20
3.5. Praćenja parametara endokrine disrupcije razvoja ženskih potomaka F1 generacije .....	20
3.6. Uzorkovanje krvi za analize steroidnih hormona .....	21
3.7. Praćenja parametara endokrine disrupcije reprodukcije ženskih potomaka F1 generacije .....	21
3.8. Određivanja steroidnih hormona u serumu ženskih potomaka F1 generacije.....	21
3.9. Statistička obrada podataka .....	22
<b>4. Rezultati</b> .....	23
4.1. Tjelesne mase majki Wistar štakora .....	23
4.2. Prosječan dnevni unos hrane majki Wistar štakora .....	24
4.3. Parametri endokrine disrupcije reprodukcije majki Wistar štakora.....	25
4.4. Parametri endokrine disrupcije razvoja ženskih potomaka F1 generacije .....	26
4.4.1. Anogenitalni razmak.....	26
4.4.2. Ulazak u pubertet.....	27
4.5. Parametri endokrine disrupcije reprodukcije ženskih potomaka F1 generacije .....	27
4.6. Razine steroidnih hormona u serumu ženskih potomaka F1 generacije u pubertetu .....	28

<b>5. Rasprava .....</b>	<b>30</b>
<b>6. Zaključak .....</b>	<b>32</b>
<b>7. Literatura.....</b>	<b>33</b>



## Popis kratica

17 $\beta$ HSD – 17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza

3-PBA – 3-fenoksibenzojeva kiselina

3 $\beta$ HSD – 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza

ADI – prihvatljivi dnevni unos (eng. *Acceptable daily intake*)

AGD – anogenitalni razmak (eng. *Anogenital distance*)

cis-DCCA – cis-3-(2',2'-diklorovinil)-2,2-dimetilciklopropan karboksilna kiselina

CYP45017 $\alpha$ ; CYP17A1 – 17 $\alpha$ -hidroksilaza-17,20-desmolaza

CYP450arom; CYP19A1 – aromataza

DG – dan graviditeta

DHEA – dehidroepiandrosteron

E2 – 17 $\beta$ -estradiol

ED – endokrini disruptor

ELISA – eng. The enzyme-linked immunosorbent assay - enzimski povezan imunosorbentni test

FSH – folikulostimulirajući hormon

LH – luteinizacijski hormon

LOAEL – eng. *Lowest Observed Adverse Effect Level*- najniža uočena razina promatranog učinka

NOAEL – eng. *No Observed Adverse Effect Level*- nema uočenog štetnog učinka

OECD – *The Organisation for Economic Co-operation and Development*-

P450scc – citokrom P450

StAR – steroidogeni akutni regulacijski hormon

T – tremor

$\alpha$ -cyp –  $\alpha$ -cipermetrin

# 1. Uvod

## 1.1. Pesticidi

Svijet kakvog danas znamo nastao je na leđima konzumerizma i proizvodima koje nam je moderna industrija omogućila. Starije generacije, koje su prve imale doticaj s novim tvarima, poput plastike i pesticida, dobivenih preradom fosilnih sirovina, nisu razmišljale o dugoročnim posljedicama tih revolucionarnih otkrića koja su i danas prisutna. Kvaliteta života nakon njihova otkrivanja raste u materijalnom i ekonomskom pogledu ali, otkrićem preko 200 novih kemikalija u ljudskom organizmu, koje su sastavni dio naizgled bezopasnih stvari iz svakog kućanstva, u ekološkom i fiziološkom smislu, ova priča postaje ozbiljnija.

Porastom broja svjetskog stanovništva potrebe za proizvodnjom hrane razmjerno su se povećale. U takvim okolnostima poljoprivrednici, zbog zaštite usjeva i profita, posežu za pesticidima. Pesticidi su postali neizostavni dio poljoprivrede i gospodarstva te se procjenjuje da bi bez njihove upotrebe svjetska proizvodnja hrane pala za 30% (Biswas i sur. 2010). Problemi kao što su onečišćenja tla, voda i narušavanja ekosustava pesticidima već su dugi niz godina teme raznih istraživanja, jer su posljedice njihovog dugogodišnjeg korištenja otvorile pitanja koja su u kontekst stavila ljudsko zdravlje.

Da se ozbiljno mijenja globalna svijest o potencijalnim opasnostima i utjecajima korištenja pesticida, dokazuje činjenica da veliki dio medijskog prostora svakodnevno zauzimaju vijesti o povlačenju prehrambenih proizvoda kontaminiranih pesticidima. S druge strane prosječna globalna potrošnja poljoprivrednih pesticida povećala se sa 1,55 kg po površini usjeva u 1990. godini na 2,69 kg u 2019. godini. Svjetska potrošnja poljoprivrednih pesticida iznosila je 4,19 milijuna metričkih tona u 2019. (Fernández 2022).

Pesticid je uobičajen pojam za kemijske tvari koje se koriste za ubijanje, odbijanje i kontrolu nametnika različitih vrsta (Eldridge 2008). Kemijska struktura, vrsta organizma na koji djeluje određeni pesticid i njegove fizikalne karakteristike samo su neke od podjela kojima opisujemo pesticide i grupiramo ih po njihovim zajedničkim obilježjima.

## 1.2. Piretrin

Naziv piretroidi odnosi se na skupinu sintetskih pesticida nastalih iz piretrina kojeg nalazimo u prirodi u biljci Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium*), a ime je dobio po lat. sinonimu imena buhača *Pyrethrum cinerariifolium* (slika 1).



Slika 1. Dalmatinski buhač (*Tanacetum cinerariifolium*)  
(Izvor :<https://www.plantea.com.hr/buhac>)

S obzirom na to da je ova biljka samonikla u Dalmaciji, povijest otkrivanja njenih svojstava i put u komercijalnu upotrebu zabilježeni su u zapisima dubrovačkog farmakologa Antuna Dropca sredinom 19. stoljeća. Drobac je izučavao farmakološka djelovanja biljaka polazeći iz pučkih zapažanja od kojih su se neka prenosila s generacije na generaciju. Naročitu istraživačku pažnju posvetio je insekticidnom djelovanju buhača. Prašak koji se dobivao mrvljenjem osušenih cvjetova buhača postao je tražen na domaćem i vanjskom tržištu. Proizvodnja buhača nije se dugo zadržala samo na području Dalmacije. Zbog izrazito dobrog insekticidnog učinka, uzgoj buhača ubrzo se proširio po cijelom svijetu (Perić 1991).

Matuso (2019) u svom radu govori o povijesti otkrića piretrina na području Japana i usporedno govori o istraživanjima koja su dovela do otkrića molekularne strukture i sastava piretrina od strane japanskih znanstvenika. Spominje također i našeg nobelovca Lavoslava Ružičku i njegov rad na utvrđivanju strukture piretrina . Krajem 19. st. u Japanu počinje uzgoj buhača u svrhu suzbijanja ušiju i gnjida. Prah se počinje koristiti u krutom obliku i zapaljen kao sredstvo protiv komaraca.

Japanski kemičar, Umetaro Suzuki, vođen učinkovitim insekticidnim svojstvima buhača, sa svoja dva učenika 1923.g. objavljuje prvi znanstveni rad u kojem su uspjeli razjasniti njegovu kemijsku strukturu, navodeći da aktivni sastojak u biljci buhač sadrži ciklopropanski prsten. Samo godinu dana kasnije, naš nobelovac Lavoslav Ružička zajedno s kolegom Hermannom Staudingerom objavljuje rad u kojem se detaljnije opisuje struktura piretrina (Matuso 2019).

LaForge i Barthel konačno su 1944. godine uspostavili ispravne strukture piretrina I i piretrina II, te istodobno odvojili dva relevantnija spoja, cinerini I i II. Godine 1966., Godin i suradnici su izolirali su još dva srodna sporedna sastojka, jasmolin I i jasmolin II (Matuso 2019).

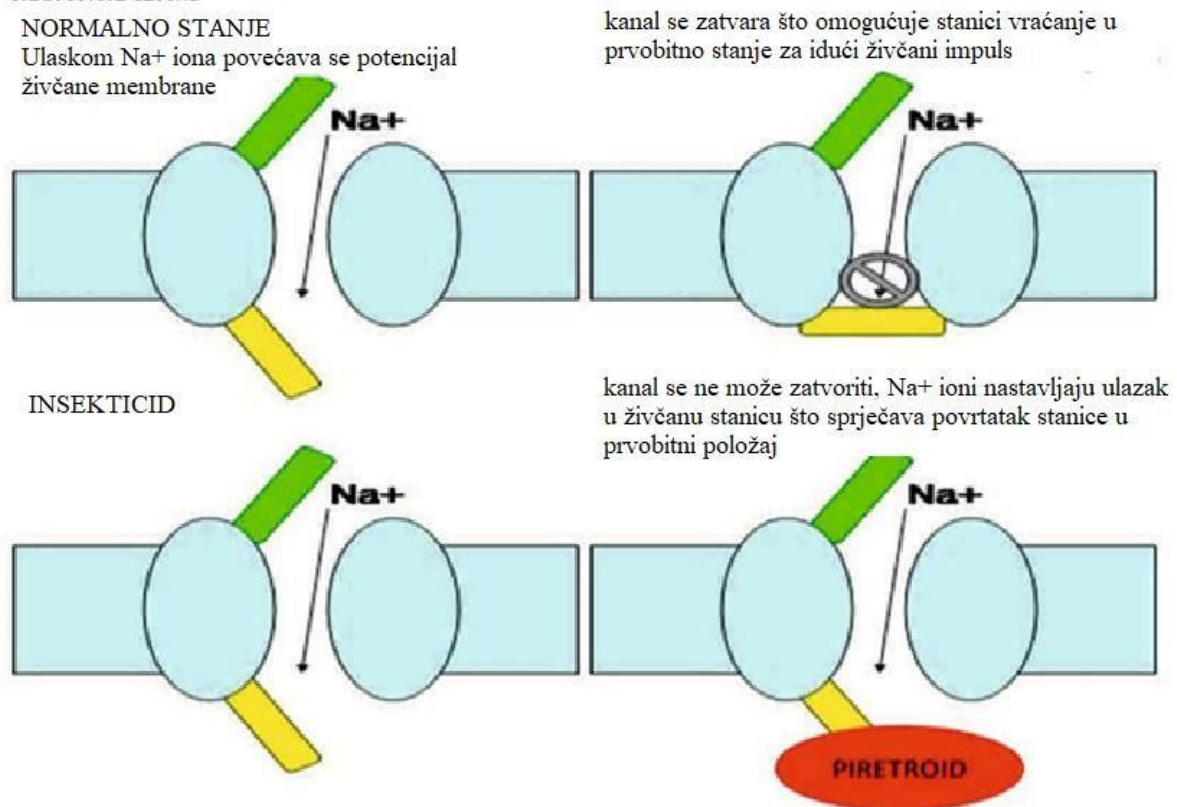
Zaključno, gotovo 40 godina trebalo je kako bi se dobila točna struktura aktivnih tvari biljke Dalmatinski buhač, a do danas se istražuju strukturne modifikacije ovog insekticida. Otkrivanje strukture piretrina je olakšalo određivanje njegovih ostalih svojstava. Glavna svojstva piretrina su niska toksičnost za sisavce, ali velika za insekte, te su nestabilni u prisustvu svjetla i vlage (Matuso 2019).

Spojevi piretrina viskozne su tekućine koje su netopive u vodi, ali su topive u organskim otapalima i uljima. Hidroliziraju se u vodi, a proces se ubrzava kiselinom ili lužinom. Piretrini su kontaktni insekticidi. Unutar želučanocrijevnog sustava se hidroliziraju na netoksične spojeve što ukazuje na nisku toksičnost kod sisavaca, dok kod insekata kontaktno djeluju na središnji živčani sustav što rezultira trenutnom paralizom (Matsumura 1985).

### **1.3. Piretroidi**

Piretroidi su sintetski spojevi, dobiveni derivacijom prirodnog insekticida piretrina. Sintetski dobiveni piretroidi su stabilniji od prirodnih piretrina zbog niže reaktivnosti bočnih lanaca. Njihova toksična svojstva slična su prirodnim piretrinima, s razlikama u relativnoj toksičnosti prema nekim vrstama insekata. Na tržištu su se pojavili 70-ih godina 20. stoljeća. Aletrin je bio prvi takav sintetski analog piretrinu. Bio je jeftin za proizvodnju i učinkovit protiv kućnih muha, stabilniji od prirodnog piretrina, ali ne i puno učinkovitiji na širem spektru djelovanja. Industrija je težila stabilnijim i boljim derivatima, a modifikacijom alkoholne i kisele strane molekule, postaju dovoljno stabilni spojevi da se mogu koristiti u poljoprivredne svrhe i s vremenom postaju najviše korištena skupina sintetskih insekticida. Piretroidi su prema mehanizmu svoga djelovanja živčani otrovi. Djeluju na prenošenje živčanih impulsa tako da pobuđuju natrij-kalijeve crpke za vrijeme depolarizacije, ali njihovo primarno mjesto djelovanja su natrijevi kanali. Točnije, piretroidi se vežu na membranu u neposrednoj blizini natrijevog kanala,

modificirajući tako kinetiku kanala (slika 2). Prepoznate su dvije različite vrste piretroida i razlikuju se na temelju osnovne strukture (prisutnost ili odsutnost cijano skupine u alfa položaju) i simptomima trovanja (Toxicological profile for pyrethrins and pyrethroids 2003).



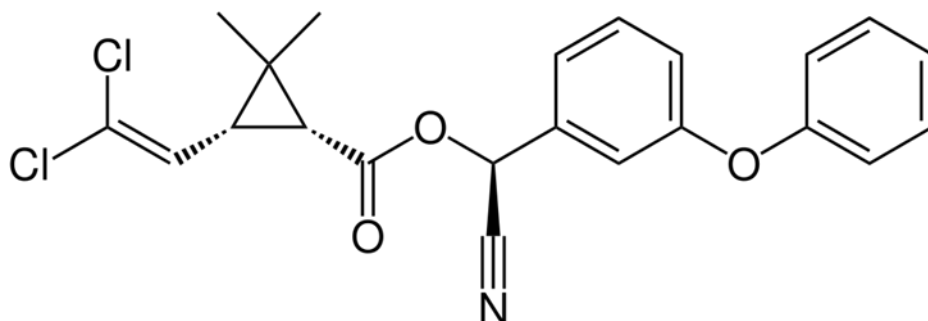
Slika 2. Prikaz mehanizma djelovanja piretroida na natrij kalijeve kanale kod živčanih stanica (Izvor: Juran i sur. 2012 )

Piretroidi koje svrstavamo pod tip I nemaju cijano skupinu u svojoj strukturi i uzrokuju ponavljajuća pucanja (kraća od 5 sekundi) senzornih živaca. Za tretiranu životinju to znači otežanu koordinaciju, izrazitu hiperaktivnost, agresivno ponašanje kod glodavaca, poremećaj svih metaboličkih sustava i brzi „knockdown“ efekt. Tremor je česta nuspojava kod tretiranja pokusnih životinja piretroidima tipa I i zbog toga se uz njih se veže pojam T-sindrom (T-tremor). Niske koncentracije prvog tipa piretroida dovoljne su za uočavanje prvih simptoma toksikološkog djelovanja. Kako bi se induciralo ponavljajuće pucanje živčanog impulsa, mora biti promijenjeno manje od 1% natrijevih kanala. Tip II piretroida sadrži cijano skupinu u svojoj strukturi i uzrokuje sporu depolarizaciju živčanih membrana. Potrebna je viša koncentracija kako bi se uočili početni simptomi djelovanja. Brz razvoj paralize i konvulzije glavni su simptomi kod piretroida drugog tipa, ali i koreoatetoza (nagli nekoordinirani pokreti ekstremiteta) te pretjerana salivacija pa se uz drugi tip piretroida veže pojam CS-sindroma. Manja doza potrebna je za uočavanje prvih simptoma, nego kod prvog tipa, a koncentracija koja je potrebna za usmrćivanje organizama manja je kod drugog tipa piretroida. (Juran i sur. 2012).

#### 1.4. $\alpha$ -cipermetrin

$\alpha$ -cipermetrin je u posljednjih nekoliko godina privukao veći interes znanstvene zajednice zbog masovne upotrebe u poljoprivredi. Dokazano je da uzrokuje visoku akutnu toksičnost za ribe i beskralješnjake i predstavlja opasnost za zdravlje ljudi, što se donedavno nije smatralo zbog sličnosti u svojstvima s bolje istraženim cipermetrinom iz kojega je sintetiziran. Pretpostavlja se da izaziva neurotoksičnost, imunotoksičnost, endokrinu disrupciju, reproduktivnu toksičnost, a također se smatra mogućim kancerogenom (Yao 2015)

$\alpha$ -cipermetrin ( $\alpha$ -cyp) (slika 3) spada u tip II piretroida, iako uzrokuje simptome koje izaziva tip I sintetički dobivenih spojeva iz skupine piretroida odnosno izaziva i T-sindrom i CS-sindrom. Cipermetrin ima osam diastereomera, koji pokazuju različitu biološku aktivnost. Samo dva izomera pokazuju insekticidna svojstva, a to su 1R-cis- $\alpha$ S i 1S-cis- $\alpha$ R izomeri (Liu i sur. 2019). Zbog navedenih negativnih svojstava, intenzivno se proučava metabolizam  $\alpha$ -cipermetrina.



Slika 3. Prikaz strukturne formule  $\alpha$ -cipermetrina  
(Izvor: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cypermethrin>)

Glavni put razgradnje u tlu, ali i u organizmu kod metaboličke biotransformacije spoja, je hidroliza. Molekula  $\alpha$ -cipermetrina u procesu hidrolize razlaže se na dva metabolita: 3-fenoksibenzojevu kiselinu (3-PBA) i cis-3-(2',2'-diklorovinil)-2,2-dimetilciklopropan

karboksilnu kiselinu (cis-DCCA). Zbog svoje antiestrogene aktivnosti 3-PBA je klasificirana kao endokrini disruptor i često pronađena u uzorcima tla i u nekim slučajevima kod ljudi.  $\alpha$ -cipermetrin se u nemetaboliziranom obliku smatra ekološki prihvatljivim i bezopasnim za ljude (Yao 2015).

Prije nego što dođe do hidrolize i biotransformacije  $\alpha$ -cipermetrina u organizmu, mora doći do apsorpcije. Mehanizam apsorpcije u želučanocrijevnom sustavu je nepoznat, ali uzimajući u obzir kako su piretroidi lipofilni spojevi, pretpostavlja se da prolaze kroz stanice probavnog trakta i prolaze u krvotok difuzijom kroz lipidne membrane. Raspodjela u organizmu nakon apsorpcije također ukazuje na lipofilni sastav spoja, zbog nakupljanja u tkivima s visokim udjelom lipida, kao što su živčano i masno tkivo (Toxicological profile for pyrethrins and pyrethroids 2003).

Mehanizmi izlučivanja piretroidnih spojeva iz organizma također nisu poznati, ali smatra se da su metaboliti  $\alpha$ -cipermetrina topljivi u vodi i molekularne veličine što ne predstavlja problem u prolasku kroz glomerularne membrane u bubrežima. Ograničavajući faktor kod izlučivanja spoja iz organizma predstavlja mogućnost vezanja metabolita za proteine plazme. Postoje podaci o izlučivanju spoja kroz majčino mlijeko, što se najvjerojatnije događa difuzijom lipida kroz membrane uz zadržavanje u mliječnoj masti (Toxicological profile for pyrethrins and pyrethroids 2003). Mehanizam toksičnosti  $\alpha$ -cipermetrina isti je kao i kod ostalih piretroida i prikazan je na slici u poglavlju pod podnaslovom piretroidi (slika 2.).

## **1.5. Endokrini disruptori**

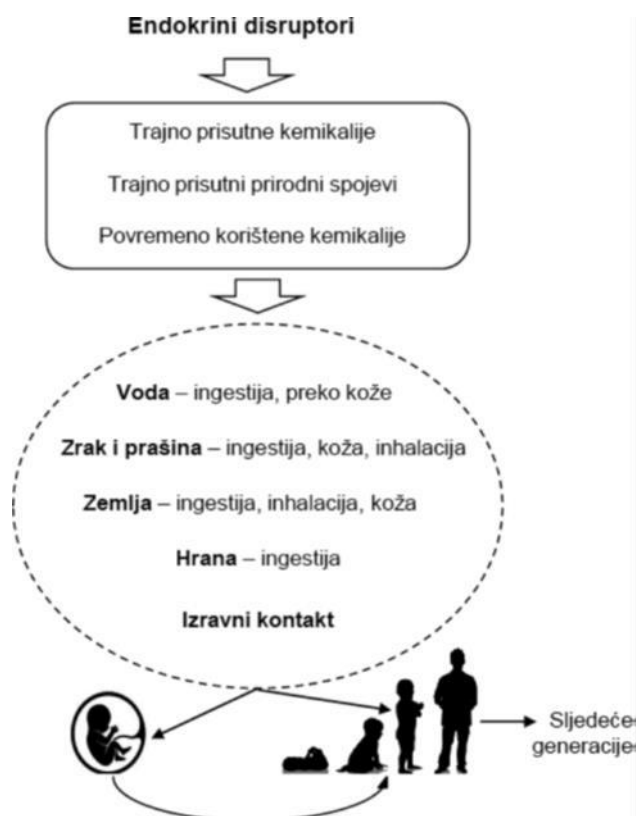
Tijekom proteklih 20 godina velika je pozornost posvećena učincima endokrinih disruptora (ED) u okolišu. Kemikalije koje ometaju rad endokrinog sustava uvelike se koriste u industriji i nalaze se gotovo u svemu što nas okružuje. (Lee i sur. 2012)

Svaka osoba ima jedinstvenu izloženost nizu poznatih i nepoznatih ED-a. Razlike u metabolizmu i građi tijela stvaraju značajnu varijabilnost u polživotu i postojanosti ED-a. Osjetljivost na ED može varirati, a rezultat kronične izloženosti malim količinama mješavine ED-a se očituje na ljudskom zdravlju. Razdoblje između izlaganja ED i pojave kliničkih poremećaja stvara problem kada se pokušava uspostaviti korelacija između izlaganja pojedinca spojevima sa disruptorskim djelovanjem na endokrini sustav. (Diamanti-Kandarakis i sur. 2009).



Hormonski otrovi ili endokrini disruptori su egzogene tvari ili smjese tvari koje mijenjaju funkciju(e) endokrinog sustava i posljedično dovode do štetnih učinaka na zdravlje zdravog organizma, njegovog potomstva ili (pod) populacija (WHO-IPCS 2002).

Većinski su heterogena skupina spojeva, od kojih su neki, npr. pesticidi (insekticidi, herbicidi, fungicidi), trajno prisutni u okolišu, a s drugima se u kontakt dolazi povremeno (proizvodi široke potrošnje, farmaceutske agensi, npr. dietilstilbestrol - DES) (Dodig i sur. 2019). ED ne moraju biti isključivo sintetizirane tvari. Mikotoksini i fitoestrogeni su neki od prirodnih spojeva koje također svrstavamo pod taj pojam. Ljudi mogu biti izloženi ED onečišćenom vodom, zemljom, zrakom i hranom (slika 4). Može se reći da se svaki dio hranidbenog lanca u jednom trenutku našao u doticaju sa spojevima koji se u našem organizmu ponašaju kao ED i kao takvi mogu utjecati na sljedeće generacije što predstavlja veći problem nego što se to dosad mislilo (Diamanti-Kandarakis i sur. 2009).



Slika 4. Prikaz izloženosti ljudi endokrinim disruptorima (Izvor: Dodig i sur. 2019)

Problematika kod istraživanja i deklariranja spojeva endokrinim disruptorima odnosi se na činjenicu da su tvari koje potencijalno mogu imati ulogu u endokrinom disruptorima jako različite i ne dijele nikakve strukturne sličnosti, osim male molekularne mase (<1000 Daltona).

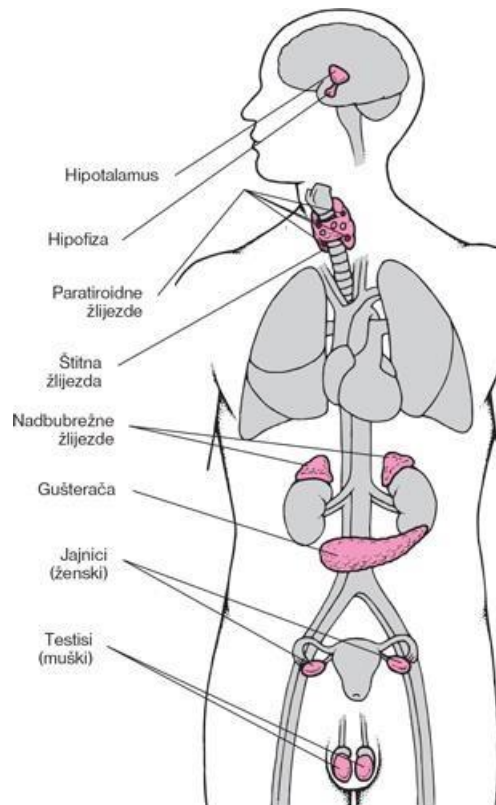
Na temelju funkcionalnih svojstava svake tvari i odgovora (razvoj bolesti) izmjerenih u odgovarajućim ispitnim sustavima, Europska Unija nastoji uvesti smjernice prema kojima će se odrediti pripadnost određenih kemijskih spojeva endokrinim disruptorima. Također se uzimaju u obzir životni izdaci koji se mogu pripisati određenoj bolesti, odnosno izravni troškovi zdravstvene skrbi, troškovi rehabilitacije, izgubljena produktivnost, učestalost bolesti u odnosu na veličinu populacije u riziku i slično (Trasande i sur. 2015). Službeni popis takvih kemikalija još uvijek nije izdan od strane Europske Unije, ali Međunarodni kemijski sekretarijat (ChemSec) izdao je listu s preko 100 kemijskih spojeva koje pokazuju štetna svojstva, a od tih stotinu, 32 tvari dodane su isključivo na temelju njihovog štetnog djelovanja na rad endokrinog sustava (ChemSec).

## **1.6. Endokrini sustav**

Razvoj i funkcija ženskog reproduktivnog sustava ovisi o koordiniranim biološkim procesima koji, ako su promijenjeni endogenim ili egzogenim čimbenicima tijekom kritičnih razdoblja razvoja ili tijekom različitih životnih faza, mogu imati značajne negativne učinke na zdravlje žena reproduktivnu funkciju i ishode trudnoće (Diamanti-Kandarakis i sur. 2009).

Takvi su koordinirani biološki procesi između različitih dijelova tijela i organa važni, kako bi tijelo na odgovarajući način moglo reagirati na bilo kakve vanjske ili unutarnje promjene koje narušavaju njegov pravilni rad, a time i zdravlje organizma. Za konstantno održavanje tjelesne ravnoteže, odgovorni su hormonalni (neuroendokrini) i živčani sustav. Živčani sustav odgovoran je za brzi prijenos (unutar djelića sekunde) informacija između različitih dijelova tijela, dok je hormonska komunikacija odgovorna za situacije koje zahtijevaju šire i dugotrajnije regulatorno djelovanje. Ta dva sustava se međusobno nadopunjuju i međusobno djeluju. Podražaji iz živčanog sustava mogu utjecati na oslobađanje određenih hormona i obrnuto. Organi endokrinog sustava su hipotalamus, hipofiza, nadbubrežne žlijezde, spolne žlijezde (tj. testisi i jajnici), štitnjača, paratireoidne žlijezde i gušterača (slika 5). Hormoni su glasničke molekule koje proizvode endokrine žlijezde i oslobađaju ih u krvotok, kao odgovor na specifične podražaje. Stanice na koje će djelovati određeni hormoni karakterizira prisutnost spojnih molekula (receptora). Receptori se nalaze na površini stanica ili unutar njih. Kada hormon dođe u kontakt s receptorima, pokreće se kaskada biokemijskih reakcija koje na kraju mijenjaju funkciju ili aktivnost ciljane stanice. Postoji nekoliko vrsta hormona koje uključuju steroide, peptide, proteine i derivate aminokiselina. Razlikuju se po općoj molekularnoj

strukturi i kao rezultat toga imaju različite mehanizme djelovanja (Hiller-Sturmhöfel i Bartke 1998).



Slika 5. Prikaz endokrinog sustava čovjeka (Izvor: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr>)

Mnoge tjelesne funkcije regulirane su hormonima koji reguliraju jedni druge. Na primjer, hormoni hipotalamusa reguliraju lučenje hormona hipofize, čiji hormoni odlaze u krvotok i kontroliraju rad drugih žlijezda te u konačnici utječu na ciljne organe. Kada se dosegnu određene razine hormona u krvi, hipotalamus i/ili hipofiza prestaju oslobađati hormone i to se zove mehanizam negativne povratne sprege koji osigurava pravilan rad hormonske kaskade. (Hiller-Sturmhöfel i Bartke 1998).

U prošlim desetljećima, zajedno s povećanom pojavnosti ženskih reproduktivnih poremećaj, porasla je i zabrinutost za potencijalni utjecaj štetnih tvari iz okoliša sa svojstvima ED na reproduktivni sustav. Činjenica da su te tvari otkrivene u biološkim uzorcima, pa čak i izravno u folikularnoj tekućini u jajnicima, naglašava važnost istraživanja utjecaja ED-a na steroidogenezu jajnika.

Proizvodnja steroidnih hormona u jajnicima ima ključnu ulogu u održavanju ženskog fenotipa kao i za redovite procese u jajnicima, uključujući rast folikula, sazrijevanje oocita i ovulaciju,

stoga je optimalna sinteza steroidnih hormona u jajnicima neophodan preduvjet za žensko reproduktivno zdravlje (Mlynarcikova i sur. 2014).

### **1.7. Jajnik**

Jajnik je parni organ i sastoji se od zametnih stanica (jajne stanice) i somatskih stanica (granulozne, tekalne i stromalne stanice) (Richards i Pangas 2010).

U jajniku se odvija ciklus sazrijevanja folikula (folikulogeneza), ovulacija i resorpcija žutog tijela, s ciljem izvršavanja njegovih uloga: stvaranje ženskih spolnih stanica (oocita) i proizvodnja spolnih hormona. (Mlynarcikova i sur. 2014)

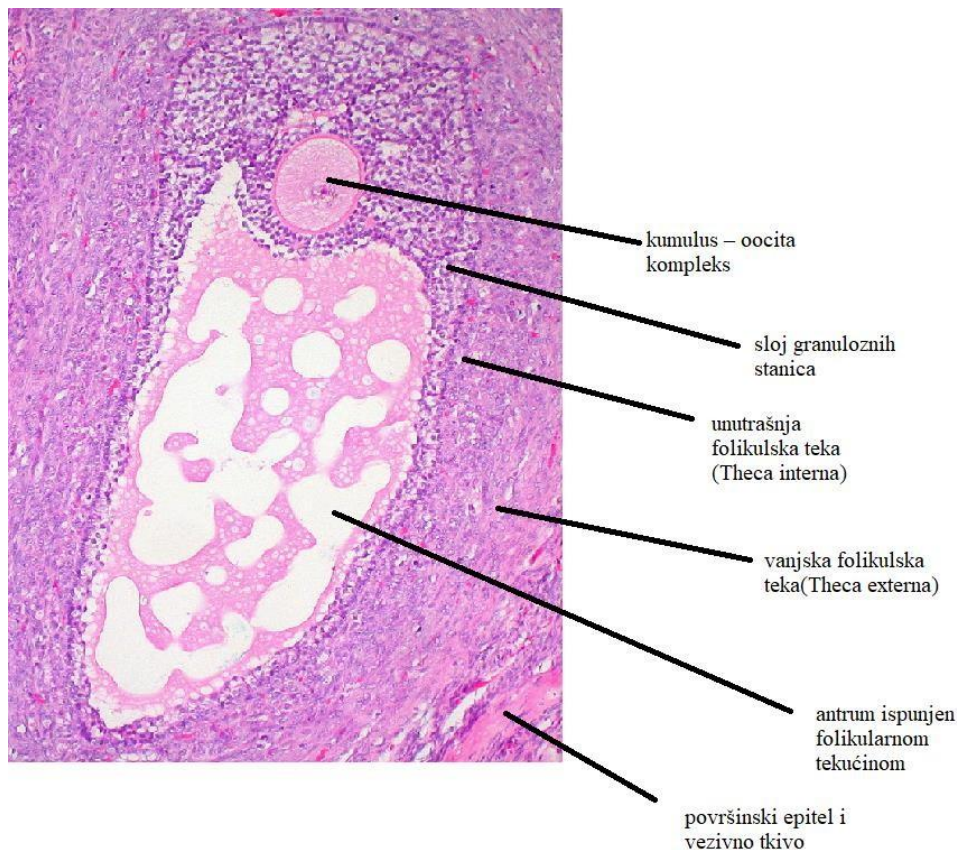
Folikul je funkcionalna jedinica jajnika i sastoji se od oocita koji je okružen slojevima somatskih stanica. U zreom preovulatornom folikulu (Graafov ili Antralni folikul) može se definirati nekoliko slojeva: a) površinski epitel,

b) vezivno tkivo,

c) dobro prokrvljeni sloj aktivan u steroidogenezi koji se zove unutrašnja folikulska teka (Theca interna),

d) sloj granuloznih stanica koji obavija antrum ispunjen folikularnom tekućinom,

e) kumulus – oocita kompleks koji zauzima ekscentrični položaj unutar folikula (slika 6) ( Tsafiriri i sur. 1993).



Slika 6. Histološki prikaz antralnog folikula ( Izvor: Ed Uthman, 2009)

Antralni folikuli glavni su izvori steroidnih hormona koje proizvodi jajnik i uz pravilnu stimulaciju luteinizirajućeg hormona (LH) koji se stvara u hipotalamusu, sposoban je za ovulaciju. Preostale stanice granuloze i teka stanice, nakon izbacivanja oocite iz folikula za vrijeme ovulacije, prolaze kroz proces diferencijacije poznat kao luteinizacija i postaju lutealne stanice. Nekadašnja folikularna struktura postaje *corpus luteum*, odnosno žuto tijelo koje proizvodi progesteron, hormon potreban za uspješnu implantaciju i održavanje trudnoće (Craig i sur. 2011).

Ukoliko ne dođe do oplodnje ili u slučaju neuspješne trudnoće, žuto tijelo ulazi u proces stanične smrti poznat kao luteoliza ili regresija žutog tijela. Dođe li do disrupcije u procesima stvaranja folikula i žutog tijela, posljedice su štetni reproduktivni ishodi kao što su izostanak ovulacije, neplodnost, nedostatak estrogena i prerano zatajenje jajnika (Craig i sur. 2011).

## 1.8. Steroidogeneza jajnika

Steroidogeneza jajnika je proces u kojem antralni folikul i žuto tijelo proizvode hormone potrebne za održavanje reproduktivnog tkiva, reguliranje funkcije jajnika i ovulacije te su odgovorni i u održavanju trudnoće (Craig 2018).

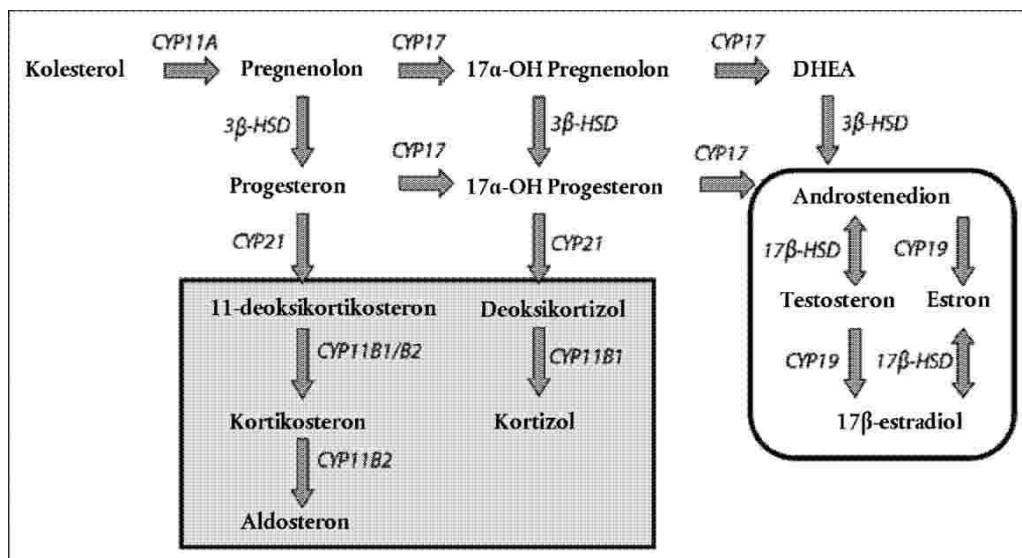
Razvoj folikula jajnika ovisi o sekvencijalnim učincima dvaju glavnih gonadotropina koje luči hipofiza, folikulostimulirajućeg hormona (FSH) i luteinizirajućeg hormona (LH). FSH djeluje na rane antralne folikule kako bi stimulirao rast (diobu stanica), steroidogenezu i ekspresiju LH receptora. (Andersen i Ezcurra 2014). Oba hormona, LH i FSH, su važna za steroidogenezu u teka i granulosa stanicama jajnika (Wood i Strauss 2002).

Teka stanice posjeduju receptore za LH, a stanice granuloze receptore za FSH. Kao što je već spomenuto, sloj teka stanica u antralnom folikulu dobro je prokrvljen. Stimulacija LH receptora regulira ulazak kolesterola iz krvi u teka stanice. Vežući se na receptor, LH signalizira stanici potrebu za povećanom transkripcijom gena koji kodiraju enzime za pretvaranje kolesterola u androgene (androstendion i testosteron). FSH nakon vezanja na receptore na granulosa stanicama, signalizira potrebu za povećanom transkripcijom gena koji kodiraju potrebne enzime za pretvaranje androgena iz teka stanica u estrogene (17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) i estron). Prije ovulacije, te dvije vrste stanica u antralnom folikulu odijeljene su bazalnom membranom i time je granulosa stanicama onemogućeno da same pretvaraju kolesterol u androgene jer nemaju kontakt s krvlju. Nakon ruptur folikula i stvaranja žutog tijela, granulosa stanice dolaze u izravan kontakt s prokrvljenim slojem i u mogućnosti su vezati kolesterol iz krvi. Proces stvaranja steroidnih hormona zapravo je ovisan o međusobnoj suradnji tih dviju stanica (Estrogen & Progesterone Production by Thecal & Granulosa Cells 2019).

Ključni korak u steroidogenezi je početna konverzija kolesterola (Andersen i Ezcurra 2014). Pomoću steroidogenog akutnog regulacijskog hormona (StAR), kolesterol se prenosi u mitohondrije. Unutar mitohondrija, enzim citokrom P450 (P450<sub>scc</sub>) cijepa bočni lanac kolesterola i pretvara ga u pregnenolon - steroid iz kojeg nastaju ostali spolni steroidni hormoni (Gamulin i sur. 2018). Pregnenolon prelazi iz mitohondrija u glatki endoplazmatski retikulum gdje se može pretvoriti u progesteron pomoću 3 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaza (3 $\beta$ HSD), ili u dehidroepiandrosteron (DHEA) pomoću 17 $\alpha$ -hidroksilaze-17,20-desmolaze (CYP45017 $\alpha$ ; CYP17A1). CYP17A1 i 3 $\beta$ HSD kataliziraju pretvorbu DHEA i progesterona u androstendion. Androstendion se u teka stanici može pretvoriti u testosteron pomoću 17 $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaze (17 $\beta$ HSD), ili može prijeći u granulosa stanicu. Aromataza (CYP450arom; CYP19A1) u granulosa stanici, može pretvoriti androstendion u estron, a testosteron u estradiol

(E2), ali i preko 17 $\beta$ HSD u granulosa stanici se može pretvoriti estron u E2 (Slika 7) (Craig i sur. 2011).

E2 se može dalje metabolizirati u 2-hidroksiestradiol pomoću CYP1A1/2 i CYP3A4, ili u 4-hidroksiestradiol putem CYP1B1, što dovodi do inaktivacije E2 i posljedično do oštećenja stanice. Promjene u sintezi i metabolizmu spolnih steroidnih hormona, uzrokovane promjenama u ekspresiji i katalitičkoj aktivnosti enzima, mogu dovesti endokrinog poremećaja (Craig i sur. 2011).



Slika 7. Shematski prikaz steroidogeneze (Izvor: <https://eur-lex.europa.eu>)

## **2. Cilj istraživanja**

Cilj ovog rada bio je istražiti utjecaj prenatalne peroralne izloženosti  $\alpha$ -cipermetrinu na parametre endokrine disrupcije reprodukcije majki Wistar štakora te parametre endokrine disrupcije razvoja i reprodukcije ženskih potomaka F1 generacije. U tu svrhu:

- izmjerene su tjelesne mase majki i potrošnja hrane tijekom tretiranja životinja u gestaciji
- praćeni su parametri endokrine disrupcije reprodukcije majki Wistar štakora pri okotu prema odgovarajućim OECD protokolima
- praćeni su parametri razvoja i reprodukcije u ženskih potomaka F1 generacije do puberteta prema odgovarajućim OECD protokolima.
- određene su razine steroidnih hormona u serumu ženskih potomaka F1 generacije u pubertetu imunokemijskom metodom ELISA.



### 3. Materijali i metode

#### 3.1. Pokusne životinje

U pokusu su korištene 72 skotne štakorice (soja Wistar HsdBrlHan) uzgojene u Jedinici za laboratorijske životinje Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada (Slika 8.). Životinje su držane u kavezima za držanje malih pokusnih glodavaca (Techniplast, Italija; Ehret, Tulln, Austrija) u kojima se redovito mijenjala sterilna stelja, u mikroklimatskim uvjetima sukladno zakonskim propisima (temperatura od 20 do 22 °C, vlaga od 40 do 60 % i 12 satna izmjena svjetla i tame). Svim životinjama je bio osiguran slobodan pristup tekućini za napajanje i standardnom krmivu za pokusne glodavce (Complete feed for mice and rats 4RF21; Mucedola, Settimo Milanese, Italija). Na početku pokusa štakorice su bile izvagane od strane tehničkog osoblja i označene na repu markerom te smještene u kaveze srednje veličine (po 4 životinje u 1 kavez). Tijekom skotnosti ženke su premještene u male kaveze i odvojene u zasebnu prostoriju do okoćenja, odnosno do odbijanja mladunaca 21. dana nakon okoćenja. Nakon odbijanja, mladunci su prebačeni u srednje kaveze, u koje su razvrstani po spolu. Istraživanje na životinjama odvijalo se u skladu sa Zakonom o zaštiti životinja (NN 135/06) i Pravilnikom o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13). Za provođenje pokusa dobivena je dozvola Etičkog povjerenstva Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada (Ur. Br.: 100-21/20-20).



Slika 8. Štakor soja Wistar HsdBrlHan (Izvor: <https://www.criver.com/products-services/find-model/wistar-han-igs-rat?region=3616>)

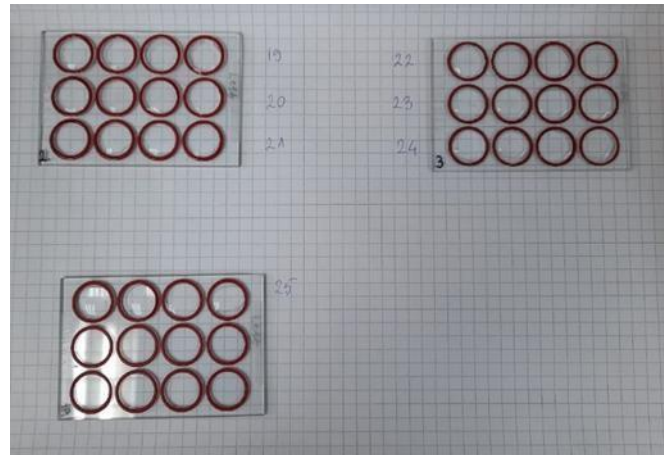
## 3.2. Postupci tijekom pokusa

### 3.2.1. Praćenja faza estrusnih ciklusa

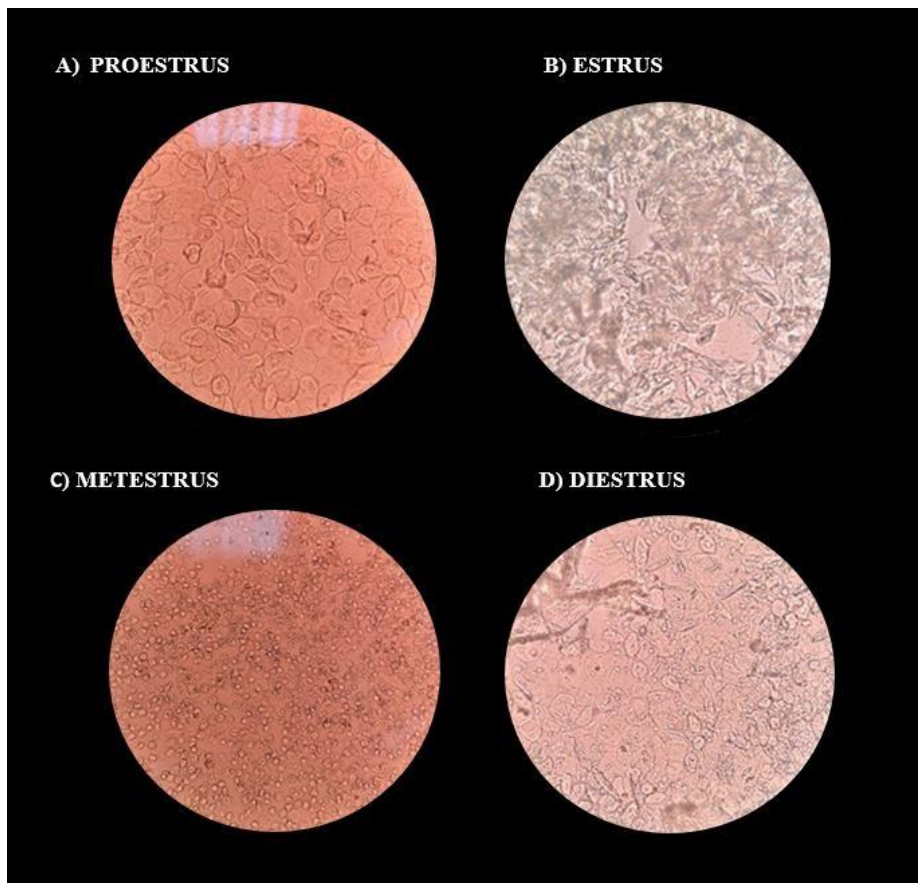
S ciljem utvrđivanja štakorica s ujednačenim četverodnevnom estrusnim ciklusima pratila sam faze estrusnog ciklusa štakorica. Tijekom 4 tjedna, svakog jutra u isto vrijeme, tehničko osoblje uzimalo je ispirke rodnice pomoću staklene kapaljke napunjene mlakom vodom (slika 9). Kapi s ispircima nanosile su se redom (prema oznakama štakorica) na staklenu pločicu (slika 10). U citološkim ispircima pod svjetlosnim mikroskopom (Zeiss Axiostar plus) promatrala sam oljuštene stanice epitela rodničke sluznice i na temelju brojčanog omjera i vrsta stanica procijenila faze estrusnog ciklusa toga dana: proestrus (P), estrus (E), metestrus (D1) i diestrus (D2) (slika 11). Faza proestrusa se određuje prisustvom i prevladavanjem epitelnih stanica s jezgrom, faza estrusa se određuje prevladavanjem rožnatih epitelnih stanica, faza metestrusa prevladavanjem leukocita, dok se faza diestrusa određuje prisutstvom svih triju vrsta stanica (Sanghai sur. 2011). Estrusni ciklus u štakorica traje 4 ili 5 dana i može varirati od ciklusa do ciklusa (Marcondes i sur. 2002, Paccola i sur. 2013). Podatke dobivene svakodnevnim praćenjem citoloških ispiraka rodnice bilježila sam u dnevnik pokusa u odgovarajuće tablice (slika 12).



Slika 9. Postupak uzimanja ispiraka rodnice staklenom kapaljkom (Izvor: Lea Biličić)



Slika 10. Staklene pločice s nanesenim ispirocima rodnice štakorica (Izvor: Lea Biličić)



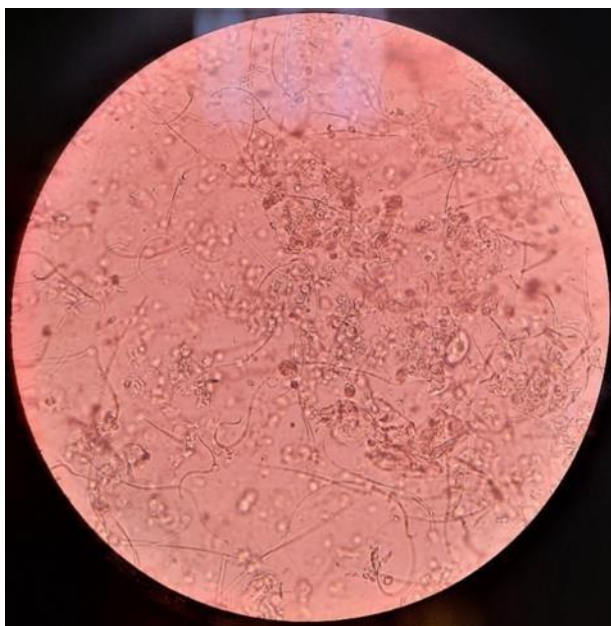
Slika 11. Mikroskopski prikaz oljuštenih stanica epitela rodnice sluznice u različitim fazama estrusnog ciklusa ženki štakora: A – faza proestrusa; B – faza estrusa; C – faza metestrusa; D – faza diestrusa (Izvor: Lea Biličić)

SPOLNO ZRELA ŽENKA ŠTAKORA		OZNAKA ŠTAKORA: K111 Dob:								
		Pokus:								
Dan	Datum	C	NE	L	Faza ciklusa	D1	D2	P	E	Opaske
1.	26.10.2021		X	XX		X →				
2.	27.10.2021	X	XX	XX			X			
3.	28.10.2021	X	XXX	X				→X		
4.	29.10.2021	XXX	X						→X	
5.										

Slika 12. Tablica u kojoj su bilježene faze estrusnog ciklusa štakorica (Izvor: Lea Biličić)

### 3.2.2. Odabir životinja za pokus i parenje životinja

Ženke kod kojih sam utvrdila ujednačeni četverodnevni estrusni ciklus na dan proestrusa su stavljane u rasplod s neizloženim mužjacima preko noći u omjeru 1:1. Sljedećeg su jutra mužjaci izvađeni iz kaveza, a ženka sam utvrđivala nalaze rodničkih ispiraka. Ženke kojima sam utvrdila prisutnost spermija u rodničkom ispirku (slika 13) ili im se stvorio makroskopski, tzv. vaginalni čep u otvoru rodnice smatrala sam oplođenima. Taj dan sam označila kao prvi dan graviditeta (DG1). Obzirom na različite cikluse ženki te da nisu sve isti dan u proestrusu i spremne za parenje, opisani postupci su se ponavljali tijekom nekoliko dana. Nadalje, u spermopozitivnim ženka promatrala sam rodničke ispirke još nekoliko dana kako bih, ukoliko su zanijele, utvrdila nalaze li se u D1/D2 fazi, što je dodatna potvrda da su skotne. Podatke sam bilježila u odgovarajuće tablice.



Slika 13. Pozitivan nalaz na prisutnost spermija u ispirku rodnice štakorice (Izvor: Lea Biličić)

### 3.2.3. Opis pokusnih skupina i tretiranje životinja

Skotne štakorice razvrstane su u pokusne skupine od 12 životinja po svakoj skupini. Štakorice su izlagane  $\alpha$ -cipermetrinu, a usporedo su uspostavljene i skupine negativne kontrole, kontrole otapala te pozitivne kontrole. Sve skupine su držane u jednakim uvjetima u pokusu.

Otopina  $\alpha$ -cipermetrina je priređena otapanjem  $\alpha$ -cipermetrina (PESTANAL®, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Germany) u kukuruznom ulju (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Germany). Doze  $\alpha$ -cipermetrina kojima su životinje bile izlagane izračunate su za reproduktivnu toksičnost u štakora prema dostupnim NOAEL i LOAEL vrijednostima – NOAEL 7.5 mg/kg/dan i LOAEL 37.5 mg/kg/dan (WHO, 2019). Prva skupina  $\alpha$ -cipermetrina tretirana je s 1 mg/kg tj. m./dan otopine druga s 10 mg/kg tj. m./dan, a treća s 19 mg/kg tj. m./dan otopine. Dietilstilbestrol (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Germany) je otopljen u kukuruznom ulju (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Germany) kako bi se dobila željena koncentracija od 10  $\mu$ g/kg tj. m./dan. Ove otopine su držane u tamno obojenim staklenim bocama i pohranjene u frižideru na +4°C.

Kontrolna skupina životinja je tretirana kukuruznim uljem (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Germany), a skupina negativne kontrole vodom. Sve su skupine tretirane s 1 mL/dan otopina u razdoblju od 6. dana graviditeta do okota (tablica 1).

Životinje je tretirao veterinar peroralnim putem želučanocrijevnom sondom. Ovakav način aplikacije najbolje imitira izloženost organizama pesticidima iz okoliša. (Lončar 2011).

Tablica 1. Tablični prikaz izlaganja pokusnih skupina

Pokusne skupine	NK	KO	$\alpha$ -cyp1	$\alpha$ -cyp10	$\alpha$ -cyp19	PK
Izloženost životinja (1 mL/dan) <i>per os</i>	VODA	KUKURUZNO ULJE	$\alpha$ -cyp 1 mg/kg tj. m./dan	$\alpha$ -cyp 10 mg/kg tj. m./dan	$\alpha$ -cyp 19 mg/kg tj. m./dan	DIETILSTILBESTROL 10 $\mu$ g/kg tj. m./dan
Vrijeme izloženosti	od 6. DG do okota	od 6. DG do okota	od 6. DG do okota	od 6. DG do okota	od 6. DG do okota	od 6. DG do okota

\*NK – negativna kontrola, KO – kontrola otapala, PK – pozitivna kontrola,  $\alpha$ -cyp –  $\alpha$ -cipermetrin, *per os* – peroralno, DG – dan graviditeta.

### 3.3. Praćenja tjelesnih masa i potrošnje hrane tijekom gestacije

Osim na DG1 tehničko osoblje je vagalo skotne ženke 6., 9., 12., 15., 18. i 21. DG, a tjelesne mase su zabilježene u pripremljene tablice. Iz zabilježenih podataka sam izračunala postotke prirasta tjelesnih masa majki tijekom gestacije između dana od interesa i prvog dana graviditeta, npr. (DG6/DG1)-1\*100.

Također, praćena je potrošnja hrane svakog trećeg dana tijekom tretiranja skotnih životinja do okota i podaci su zabilježeni u tablice. Iz zabilježenih podataka sam izračunala prosječan dnevni unos hrane izražen kao pojedena hrana u g/g tjelesne mase/dan.

### 3.4. Praćenja parametara endokrine disrupcije reprodukcije majki Wistar štakora

Na dan okota, u svrhu procjene učinaka  $\alpha$ -cipermetrina na reprodukciju majki, uz pomoć mentorice pratila sam parametre endokrine disrupcije reprodukcije: duljinu gestacije, ukupan broj okoćenih mladunaca, broj živih mladunaca, broj mrtvih mladunaca, stopu preživljenja, omjer spolova mladunaca, mase muških i ženskih mladunaca i mase legla, prema odgovarajućim OECD protokolima (OECD 2018 a, b). Sve podatke sam bilježila u pripremljene tablice.

### 3.5. Praćenja parametara endokrine disrupcije razvoja ženskih potomaka F1 generacije

Sukladno odgovarajućim OECD protokolima, pratila sam uz pomoć veterinaru i mentorice parametre endokrine disrupcije razvoja, kako bi se utvrdili učinci  $\alpha$ -cipermetrina na razvoj ženskih potomaka F1 generacije (OECD 2018 a, b, c).

Četvrtog dana nakon okota ženskim potomcima F1 generacije sam, uz pomoć veterinaru i mentorice, mjerila anogenitalni razmak (McIntyre i sur. 2002; Hotchkiss i sur. 2007; Van der Driesche i sur. 2011; Schwartz i sur. 2021).



Nakon odvajanja od majke i razvrstavanja potomaka F1 generacije po spolovima 21. dana nakon okota, ženskim potomcima sam svakodnevno, uz pomoć veterinar i mentorice, promatrala vanjske znakove spolnog sazrijevanja (otvaranje vagine) kako bih utvrdila ulazak u pubertet. Osim toga, ženama kod kojih smo zabilježili ulazak u pubertet su uzeti vaginalni ispirci koji su promatrani pod svjetlosnim mikroskopom kako bi utvrdili jesu li počele ciklirati. Podaci su zabilježeni u pripremljene tablice.

### **3.6. Uzorkovanje krvi za analize steroidnih hormona**

Dijelu ženskih potomaka, kod kojih je utvrđen ulazak u pubertet veterinar je uzorkovao krv iz srca nakon uspavlivanja životinja intraperitonealnim ubrizgavanjem kombinacije anestetika u dozi 0,8 mL/kg ketamina-narketana i 0,6 mL/kg ksilazina-ksilapana (Narketan i Xylapan, Vetoquinol UK Ltd., Towcester, Ujedinjeno Kraljevstvo). Krv je centrifugirana 2 puta na 3000 rpm/15 min/4°C (Eppendorf AG, Njemačka), a izdvojeni krvni serum pospremljen do analiza na -20 °C.

### **3.7. Praćenja parametara endokrine disrupcije reprodukcije ženskih potomaka F1 generacije**

Dio ženskih potomaka F1 generacije, kojima je utvrđen ulazak u pubertet, stavljen je na parenje preko noći s neizloženim muškim spolno zrelim štakorima u omjeru 1:1 s ciljem praćenja učinaka  $\alpha$ -cipermetrina na reprodukciju ženskih potomaka F1 generacije. Uz pomoć mentorice pratila sam parametre endokrine disrupcije reprodukcije: duljinu gestacije, ukupan broj okoćenih mladunaca, broj živih mladunaca, broj mrtvih mladunaca, stopu preživljenja, omjer spolova mladunaca, mase muških i ženskih mladunaca, mase legla, prema odgovarajućim OECD protokolima (OECD 2018 a, b). Podaci su zabilježeni u odgovarajuće tablice.

### **3.8. Određivanja steroidnih hormona u serumu ženskih potomaka F1 generacije**

Imunokemijskom metodom ELISA (Personal Lab Instrument, Iason, Graz, Austria) izmjerene su koncentracije testosterona i estradiola u serumu ženskih potomaka F1 generacije. Za određivanja razina hormona u serumu korišteni su standardni kitovi za testosteron (Testosterone rat/mouse ELISA Kit (DEV9911), Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Germany) i estradiol (Estradiol rat ELISA Kit (DEV9999), Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Germany). Prema proizvođaču, granica detekcije za testosteron bila je 0.066 ng/mL, a za estradiol 2.5 pg/ml.. Koncentracije testosterona u serumu izražene su u ng/mL, a estradiola u serumu u pg/mL.

### **3.9. Statistička obrada podataka**

Dobiveni podaci su statistički obrađeni korištenjem licenciranog statističkog programskog paketa Statistica verzija 14.0.0.15 (TIBCO Software Inc.). Shapiro-Wilkovim testom je testirana normalnost raspodjele podataka i podaci su prikazani kao srednje vrijednosti i standardne devijacije za normalno raspodijeljene podatke te kao medijani i rasponi za podatke koji nemaju normalnu raspodjelu.

Podatke koji su normalno raspodijeljeni usporedila sam parametrijskim testovima analizom varijance ANOVA i post hoc Tukey HSD testom, a podatke koji nisu normalno raspodijeljeni neparametrijskim Kruskal-Wallis testom.

Svi statistički testovi provedeni su na razini značajnosti  $p < 0,05$  (95 % - tni interval pouzdanosti).



## 4. Rezultati

### 4.1. Tjelesne mase majki Wistar štakora

Skotne ženke tretirane  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 1, 10 i 19 mg/kg tj. m./dan, dietilstilbestrolom u dozi od 10  $\mu$ g/kg tj. m./dan, kukuruznim uljem i vodom od 6. dana graviditeta (DG) do okota, bile su vagane na 6., 9.,12.,15.,18. i 21. DG kako bi se utvrdio utjecaj  $\alpha$ -cipermetrina na tjelesne mase. Podaci su prikazani u tablici 2.

Tablica 2. Promjene u postotku prirasta tjelesnih masa majki Wistar štakora tijekom gestacije tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 1 ( $\alpha$ -cyp1), 10 ( $\alpha$ -cyp10) i 19 mg/kg tj. m./dan ( $\alpha$ -cyp19), dietilstilbestrolom u dozi od 10  $\mu$ g/kg tj. m./dan (pozitivna kontrola – PK), kukuruznim uljem (kontrola otapala – KO) i vodom (negativna kontrola – NK) od 6. dana graviditeta (DG) do okota, 1 mL/dan, *per os*.

Pokusne skupine	NK	$\alpha$ -cyp1	$\alpha$ -cyp10	$\alpha$ -cyp19	PK	KO
DG6	5,01 $\pm$ 1,75	7,88 $\pm$ 3,01	5,54 $\pm$ 2,90	7,98 $\pm$ 5,56	5,50 $\pm$ 3,36	11,8 $\pm$ 7,53
DG9	7,79 $\pm$ 1,85	7,94 $\pm$ 3,68	4,46 $\pm$ 3,23*	2,65 $\pm$ 2,91*	6,72 $\pm$ 2,99*	12,5 $\pm$ 6,31
DG12	12,4 $\pm$ 2,47**	13,2 $\pm$ 3,21**	9,13 $\pm$ 3,04*	6,82 $\pm$ 2,92	8,89 $\pm$ 3,00*	16,1 $\pm$ 5,43**
DG15	18,8 $\pm$ 3,09	17,1 $\pm$ 4,96	12,7 $\pm$ 3,56*	12,2 $\pm$ 4,29*	14,3 $\pm$ 4,16	20,6 $\pm$ 8,32
DG18	29,0 $\pm$ 3,85	26,4 $\pm$ 8,63	21,2 $\pm$ 6,69	19,7 $\pm$ 6,19	23,3 $\pm$ 4,59	29,7 $\pm$ 11,8
DG21	37,0 $\pm$ 5,37	33,2 $\pm$ 11,6	30,9 $\pm$ 11,7	27,2 $\pm$ 10,1	33,5 $\pm$ 9,67	40,3 $\pm$ 15,7

Rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine uz pripadajuće standardne devijacije.

\*statistički značajna razlika u odnosu na KO

\*\*statistički značajna razlika u odnosu na  $\alpha$ -cyp19

Razina značajnosti  $p < 0.05$

Uočeno je da više doze  $\alpha$ -cipermetrina uzrokuju smanjeni prirast tjelesnih masa majki Wistar štakora tijekom gestacije, ali razlike nisu bile statistički značajne.

Pronađene su statistički značajne razlike u srednjim vrijednostima za priraste tjelesnih masa majki devetog danagraviditeta između skupine kontrole otapala u odnosu na skupine tretirane  $\alpha$ -cipermetrinom u dozama od 10 mg/kg/ tj. m./dan i 19 mg/kg tj. m./dan i skupinu tretiranu dietilstilbestrolom u dozi od 10  $\mu$ g/kg tj. m./dan. Srednja vrijednost za prirast tjelesne mase majki devetog graviditeta kod skupine kontrole otapala bila je statistički značajno veća u odnosu na skupine tretirane  $\alpha$ -cipermetrinom u dozama 10 mg/kg tj. m./dan i 19 mg/kg tj.

m./dan te skupinu tretiranu dietilstilbestrolom u dozi od 10 µg/kg tj. m./dan..

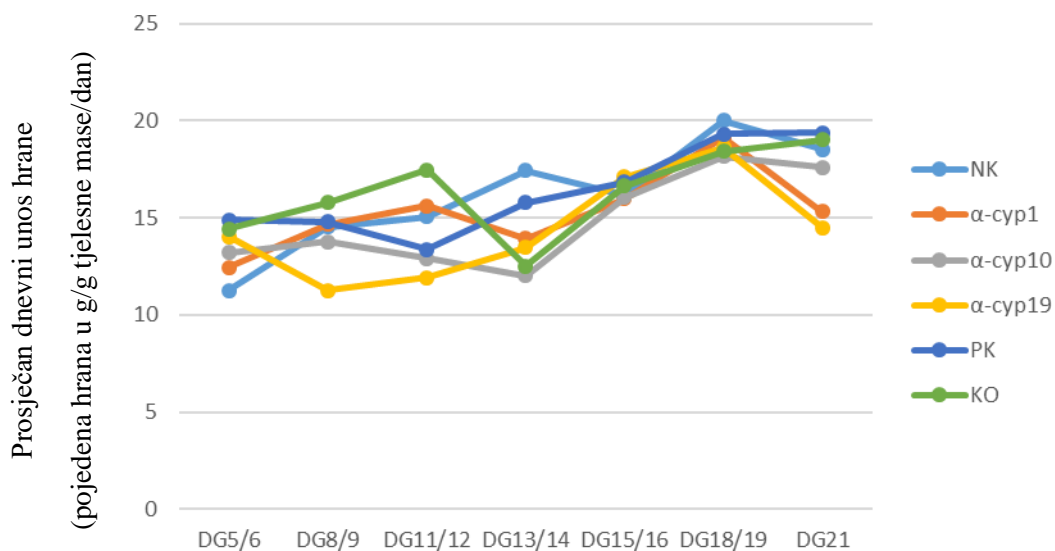
Statistički značajne razlike u srednjim vrijednostima za priraste tjelesnih masa majki dvanaestog dana graviditeta pronađene su između skupine tretirane  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 19 mg/kg tj. m./dan u odnosu na skupinu negativne kontrole, skupinu tretiranu  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 1 mg/kg tj. m./dani skupinu kontrole otapala. Srednja vrijednost za prirast tjelesne mase majki dvanaestog dana graviditeta bila je značajno manja kod skupine tretirane  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 19 mg/kg tj. m./dan u odnosu na skupinu negativne kontrole, skupinu tretiranu  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 1 mg/kg tj. m./dan i skupinu kontrole otapala.

Statistički značajne razlike u srednjim vrijednostima za priraste tjelesnih masa majki dvanaestog dana graviditeta pronađene su i između skupine pozitivne kontrole i skupine tretirane  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 10 mg/kg/ tj. m./dan u odnosu na skupinu kontrole otapala. Srednja vrijednost za prirast tjelesne mase majki na dvanaesti dan graviditeta bila je manja kod skupine pozitivne kontrole i skupine tretirane  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 10 mg/kg/ tj. m./dan u odnosu na skupinu kontrole otapala.

Petnaestog dana graviditeta pronađene su statistički značajne razlike u srednjim vrijednostima za priraste tjelesnih masa majki između skupine kontrole otapala i skupina tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 10 mg/kg/ tj. m./dan i 19 mg/kg tj. m./dan. Srednja vrijednost za prirast tjelesne mase majki petnaestog dana graviditeta kod skupine kontrole otapala bila je statistički značajno veća u odnosu na skupine tretirane  $\alpha$ -cipermetrinom u dozama 10 mg/kg tj. m./dan i 19 mg/kg tj. m./dan.

#### **4.2. Prosječan dnevni unos hrane majki Wistar štakora**

Za vrijeme izlaganja skotnih majki  $\alpha$ -cipermetrinu tijekom gestacije mjerila se potrošnja hrane i izračunao se prosječan dnevni unos hrane izražen kao pojedena hrana u g/g tjelesne mase/dan (slika 14). Statističkom obradom podataka nisu pronađene statistički značajne razlike u prosječnom dnevnom unosu hrane majki izloženih  $\alpha$ -cipermetrinu tijekom gestacije između pokusnih skupina.



Dani graviditeta (DG)

Slika 14. Prosječan dnevni unos hrane (pojedena hrana u g/g tjelesne mase/dan) majki Wistar štakora tijekom gestacije (DG5/6, DG 8/9, DG11/12, DG13/14, DG15/16, DG18/19, DG21), tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 1 ( $\alpha$ -cyp1), 10 ( $\alpha$ -cyp10) i 19 mg/kg tj. m./dan ( $\alpha$ -cyp19), dietilstilbestrolom u dozi od 10  $\mu$ g/kg tj.m./dan (pozitivna kontrola – PK), kukuruznim uljem (kontrola otapala – KO) i vodom (negativna kontrola – NK) od 6. dana graviditeta (DG) do okota, 1 mL/dan, *per os*.

#### 4.3. Parametri endokrine disrupcije reprodukcije majki Wistar štakora

Parametri endokrine disrupcije reprodukcije majki (duljina gestacije, ukupan broj okoćenih mladunaca, broj živih mladunaca, broj mrtvih mladunaca, stopa preživljenja mladunaca, broj muških mladunaca, broj ženskih mladunaca, postotak muških mladunaca, postotak ženskih mladunaca i masa legla) prikazani su u tablici 3. Nakon statističke obrade podataka utvrđeno je kako ne postoje statistički značajne razlike između pokusnih skupina.

Tablica 3. Parametri endokrine disrupcije reprodukcije majki Wistar štakora tretiranih  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 1 ( $\alpha$ -cyp1), 10 ( $\alpha$ -cyp10) i 19 mg/kg tj. m./dan ( $\alpha$ -cyp19), dietilstilbestrolom u dozi od 10  $\mu$ g/kg tj. m./dan (pozitivna kontrola – PK), kukuruznim uljem (kontrola otapala – KO) i vodom (negativna kontrola – NK) od 6. dana graviditeta (DG) do okota, 1 mL/dan, *per os* prema odgovarajućim OECD protokolima.

Pokusne skupine	NK	$\alpha$ -cyp1	$\alpha$ -cyp10	$\alpha$ -cyp19	PK	KO
Duljina gestacije (dana)	22,5 (22,0-23,0)	23,0 (23,0-23,0)	24,0 (23,0-24,0)	23,0 (23,0-23,0)	23,0 (23,0-23,0)	22,0 (22,0-22,0)
Ukupan broj okoćenih mladunaca	8,00 (7,00-9,00)	10,0 (9,00- 10,0)	10,0 (8,00-11,0)	12,0 (9,0-12,0)	12,5 (5,00-14,0)	12,0 (12,0-12,0)
Broj živih mladunaca	8,00 (7,00-9,00)	10,0 (9,00- 10,0)	10,0 (8,00-11,0)	12,0 (9,0-12,0)	12,5 (5,00-14,0)	12,0 (12,0-12,0)
Broj mrtvih mladunaca	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)
Stopa preživljenja (%)	100 (100-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	100 (100-100)
Broj muških mladunaca	3,50 (3,00-4,00)	6,00 (6,00-7,00)	6,00 (4,00-7,00)	5,50 (3,00-8,00)	5,00 (2,00-8,00)	7,00 (7,00-7,00)
Broj ženskih mladunaca	4,50 (4,00-5,00)	3,00 (3,00-4,00)	4,00 (4,00-4,00)	5,00 (4,00-9,00)	6,00 (2,00-10,0)	5,00 (5,00-5,00)
Postotak muških mladunaca (%)	43,7 (42,9-44,4)	66,7 (60,0-70,0)	60,0 (50,0-63,6)	51,39 (25,0-66,7)	55,0 (16,7-61,5)	58,3 (58,3-58,3)
Postotak ženskih mladunaca (%)	56,4 (55,6-57,1)	33,3 (30,0-40,0)	40,0 (36,4-50,0)	48,6 (33,3-75,0)	45,0 (38,5-83,3)	41,7 (41,7-41,7)
Masa legla (g)	70,1 (62,6-77,5)	81,1 (78,7-83,2)	69,2 (64,1-81,4)	79,6 (60,4-84,1)	83,1 (41,2-98,5)	106 (106-106)

Rezultati su prikazani kao medijani s rasponom najmanje do najveće vrijednosti u zagradi.

#### 4.4. Parametri endokrine disrupcije razvoja ženskih potomaka F1 generacije

##### 4.4.1. Anogenitalni razmak

Podaci izmjerenih anogenitalnih razmaka u ženskih potomaka F1 generacije su prikazani u tablici 4. Statistički značajne razlike u vrijednostima anogenitalnog razmaka pronađene su kod skupine pozitivne kontrole u odnosu na skupinu negativne kontrole, skupine tretirane  $\alpha$ -cipermetrinom u dozama od 1 mg/kg tj. m./dani 19 mg/kg tj. m./dan i skupinu kontrole otapala. Srednja vrijednost izmjerenog anogenitalnog razmaka kod skupine pozitivna kontrola bila je manja u odnosu na ostale usporedne skupine kod kojih je pronađena statistički značajna razlika.

Statistički značajne razlike u srednjim vrijednostima anogenitalnog razmaka pronađene su i između skupina kontrole otapala u odnosu na skupinu tretiranu  $\alpha$ -cipermetrinom u dozi od 10 mg/kg tj. m./dan i skupinu pozitivne kontrole. Srednja vrijednost izmjerenog anogenitalnog

razmaka kod skupine kontrola otapala bila je veća u odnosu na druge dvije usporedne skupine kod kojih je pronađena statistički značajna razlika.

Tablica 4. Anogenitalni razmaci kod ženskih potomaka F1 generacije prenatalno izloženih  $\alpha$ -cipermetrinu u dozi od 1 ( $\alpha$ -cyp1), 10 ( $\alpha$ -cyp10) i 19 mg/kg tj. m./dan ( $\alpha$ -cyp19), dietilstilbestrolu u dozi od 10  $\mu$ g/kg tj.m./dan (pozitivna kontrola – PK), kukuruznom ulju (kontrola otapala – KO) i vodi (negativna kontrola – NK) od 6. dana graviditeta (DG) do okota, 1 mL/dan, *per os*.

Pokusne skupine	Anogenitalni razmak (mm)
NK	4,50 * (4,00-5,00)
$\alpha$ -cyp1	4,50 * (4,00-4,70)
$\alpha$ -cyp10	4,30** (3,60-4,80)
$\alpha$ -cyp19	4,50* (3,80-5,40)
PK	3,90 ** (3,20-4,80)
KO	4,80* (4,80-5,00)

Rezultati su prikazani kao medijani s rasponom najmanje do najveće vrijednosti u zagradi.

\*statistički značajna razlika u odnosu na PK

\*\*statistički značajna razlika u odnosu na KO

Razina značajnosti  $p < 0.05$ .

#### 4.4.2. Ulazak u pubertet

Ulazak u pubertet i spolno sazrijevanje ženskih potomaka F1 generacije nije se značajno razlikovalo između pokusnih skupina.

#### 4.5. Parametri endokrine disrupcije reprodukcije ženskih potomaka F1 generacije

Parametri endokrine disrupcije reprodukcije ženskih potomaka F1 generacije (uspjeh parenja, duljina gestacije, ukupan broj okoćenih mladunaca, broj živih mladunaca, broj mrtvih mladunaca, stopa preživljenja mladunaca, broj muških mladunaca, broj ženskih mladunaca, postotak muških mladunaca, postotak ženskih mladunaca masa legla, masa muških mladunaca, masa ženskih mladunaca) prikazani su u tablici 5. Statističkom analizom podataka nisu pronađene statistički značajne razlike između pokusnih skupina.

Tablica 5. Parametri endokrine disrupcije reprodukcije ženskih potomaka F1 generacije prenatalno izloženih  $\alpha$ -cipermetrinu u dozi od 10 mg/kg tj. m./dan ( $\alpha$ -cyp10), dietilstilbestrolu u dozi od 10  $\mu$ g/kg tj. m./dan (pozitivna kontrola – PK) i vodi (negativna kontrola – NK) od 6. dana graviditeta (DG) do okota, *per os*.

Pokusne skupine	NK	$\alpha$ -cyp10	PK
Uspjeh parenja	1,00 (1,00-1,00)	0,50 (0,00-1,00)	1,00 (1,00-1,00)
Duljina gestacije (dana)	22,0 (22,0-22,0)	22,0 (22,0-23,0)	22,0 (22,0-23,0)
Ukupan broj okoćenih mladunaca	9,50 (9,00-10,0)	10,0 (9,00-11,0)	7,00 (6,00-13,0)
Broj živih mladunaca	9,50 (9,00-10,0)	10,0 (9,00-11,0)	7,00 (6,00-13,0)
Broj mrtvih mladunaca	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)
Stopa preživljenja (%)	100 (100-100)	100 (100-100)	100 (100-100)
Broj muških mladunaca	6,00 (5,00-7,00)	4,50 (3,00-6,00)	5,00 (3,00-8,00)
Broj ženskih mladunaca	3,50 (3,00-4,00)	5,50 (5,00-6,00)	4,00 (1,00-5,00)
Postotak muških mladunaca (%)	63 (56-70)	44 (33-55)	62 (43-83)
Postotak ženskih mladunaca (%)	37 (30-44)	56 (45-67)	38 (17-57)
Masa legla (g)	64,4 (58,6-70,1)	65,5 (65,5-65,5)	42,0 (38,8-45,2)
Masa muških mladunaca (g)	42,1 (34,5-49,7)	36,5 (36,5-36,5)	26,9 (20,7-33,0)
Masa ženskih mladunaca (g)	22,3 (20,4-24,1)	29,0 (29,0-29,0)	15,2 (5,80-24,5)

Rezultati su prikazani kao medijani s rasponom najmanje do najveće vrijednosti u zagradi. Uspješnost parenja izražena je s 0 i 1 (0- neuspješno, 1- uspješno).

#### 4.6. Razine steroidnih hormona u serumu ženskih potomaka F1 generacije u pubertetu

Koncentracije testosterona u serumu ženskih potomaka F1 generacije u pubertetu prikazane su u tablici 6. Nije bilo statistički značajnih razlika između pokusnih skupina.

Tablica 6. Koncentracije testosterona (ng/mL) u serumu ženskih potomaka F1 generacije u pubertetu prenatalno izloženih  $\alpha$ -cipermetrinu u dozi od 1 ( $\alpha$ -cyp1), 10 ( $\alpha$ -cyp10) i 19 mg/kg tj. m./dan ( $\alpha$ -cyp19), dietilstilbestrolu u dozi od 10  $\mu$ g/kg tj. m./dan (pozitivna kontrola – PK) i vodi (negativna kontrola – NK) od 6. dana graviditeta (DG) do okota, 1 mL/dan, *per os*.

Pokusne skupine	NK	$\alpha$ -cyp1	$\alpha$ -cyp10	$\alpha$ -cyp19	PK
Koncentracije testosterona (ng/mL)	0,460 $\pm$ 0,375	0,610 $\pm$ 0,333	0,489 $\pm$ 0,196	0,512 $\pm$ 0,140	0,542 $\pm$ 0,146

Rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine uz pripadajuće standardne devijacije.

Koncentracije estradiola u serumu ženskih potomaka F1 generacije u pubertetu prikazani su u tablici 7. Između pokusnih skupina nije bilo statistički značajnih razlika.

Tablica 7. Koncentracije estradiola (pg/mL) u serumu ženskih potomaka F1 generacije u pubertetu prenatalno izloženih  $\alpha$ -cipermetrinu u dozi od 1 ( $\alpha$ -cyp1), 10 ( $\alpha$ -cyp10) i 19 mg/kg tj. m./dan ( $\alpha$ -cyp19), dietilstilbestrolu u dozi od 10  $\mu$ g/kg tj. m./dan (pozitivna kontrola – PK) i vodi (negativna kontrola – NK) od 6. dana graviditeta (DG) do okota, 1 mL/dan, *per os*.

Pokusne skupine	NK	$\alpha$ -cyp1	$\alpha$ -cyp10	$\alpha$ -cyp19	PK
Koncentracije estradiola (pg/mL)	7,97 (2,38-23,5)	7,68 (5,08-38,6)	6,01 (3,64-18,6)	10,8 (4,33-44,4)	8,32 (3,78-15,7)

Rezultati su prikazani kao medijani s rasponom najmanje do najveće vrijednosti u zagradi.

## 5. Rasprava

Postojeća istraživanja pokazuju da insekticidi nisu bezopasni za ljudsko zdravlje te da se svaki insekticid mora koristiti s velikim oprezom. Budući da se radi o uobičajeno korištenim proizvodima koji su označeni kao sigurni za ljudsku upotrebu, potrebna su temeljita istraživanja koja se fokusiraju na dugoročne fizičke, neurorazvojne, neurobihevioralne, reproduktivne i opasnosti povezane s rakom, koje ovi piretroidi predstavljaju za skupine stanovništva s niskim i visokim rizikom za razvoj bolesti. Svjetska zdravstvena organizacija preporučuje upotrebu samo tri derivata pesticida iz skupine piretroida, a to su deltametrin, permetrin i  $\alpha$ -cipermetrin (Chrustek i sur. 2018).

Zbog složenosti ženskog reproduktivnog sustava, koji uključuje niz međusobno ovisnih i povezanih funkcija, učinci na ženske reproduktivne funkcije rijetko su proučavani (Thomas 1996).

Cilj ovog rada bio je po prvi puta istražiti utjecaj sintetskog piretroida  $\alpha$ -cipermetrina na parametre endokrine disrupcije reprodukcije majki Wistar štakora te parametre endokrine disrupcije razvoja i reprodukcije ženskih potomaka F1 generacije izloženih  $\alpha$ -cipermetrinu tijekom gestacije.

Do sada je uglavnom proučavana izloženost odraslih jedinki piretroidima i dostupno je vrlo malo informacija o učincima izloženosti tijekom kritičnih razdoblja u razvoju, kao što su razdoblja trudnoće i laktacije. Trenutno postoji malo podataka o reproduktivnom razvoju i plodnosti perinatalno izloženih potomaka kao i o mogućem prenošenju učinaka sintetskih piretroida preko ženske zametne linije, koji se baziraju uglavnom na istraživanjima izloženosti cipermetrinu (Singh i sur. 2019).

Cipermetrin obično sadrži 20-40%  $\alpha$ -cipermetrina.  $\alpha$ -cipermetrin obuhvaća dva toksikološki najaktivnija izomera cipermetrina.  $\alpha$ -cipermetrin i cipermetrin kvalitativno su slični u svojoj toksičnosti i metabolizmu, ali kako je omjer izomera u komercijalnim proizvodima cipermetrina varijabilan, toksičnost im varira. NOEL (*eng. no observable effect level*) za  $\alpha$ -cipermetrin je niži od onog za cipermetrin. ADI (*eng. acceptable daily intake*) koji je prethodno utvrđen za  $\alpha$ -cipermetrin mogao bi se primijeniti za oba spoja obzirom da je  $\alpha$ -cipermetrin toksičniji od cipermetrina. Kao što je već spomenuto, udio  $\alpha$ -cipermetrina u cipermetrinu može ovisiti o komercijalnom izvoru, zbog čega je teško utvrditi koji od ova dva spoja ima značajniji toksični učinak na organizam (Inchem.org 2004).



U provedenom istraživanju majke Wistar štakora tretirane višim dozama  $\alpha$ -cipermetrina imale su smanjene priraste tjelesnih mase tijekom gestacije, što ukazuje na štetne učinke većih doza spoja na regulaciju tjelesne mase. Dobiveni rezultati su u skladu s rezultatima sličnih istraživanja na piretroidima.

Istraživanje Sangha i sur. (2011) pokazalo je da je izloženost odraslih albino ženki štakora cipermetrinu u dozi od 50 mg/kg tjelesne težine u razdoblju od 2 do 4 tjedna utjecala na promijenjene tjelesne težine i težine organa u usporedbi s kontrolama.

U našem istraživanju nije pokazano da izloženost majki štakorica visokoj dozi  $\alpha$ -cipermetrina tijekom gestacije utječe na reproduktivni razvoj F1 ženskih potomaka, dok je istraživanje Singh i sur. (2019) pokazalo da perinatalna izloženost dozi od 25 mg/kg tj. m./dan cipermetrina može utjecati na zakašnjenje otvaranje vagine, kraće razdoblje proestrusa i duže razdoblje estrusa s ukupnim smanjenjem u duljini estrusnog ciklusa u odrasloj dobi F1 generacije ženskih potomaka.

Nekoliko istraživanja pokazalo je da određeni piretroidi i njihovi metaboliti imaju potencijalno značajnu ulogu u ometanju endokrinih funkcija kod žena. Piretroidi mogu imitirati ili inhibirati djelovanje estrogena, najvjerojatnije direktnim vezanjem na estrogenski receptor (ER), mogu djelovati poput estrogena na druge načine koji ne uključuju direktna vezanja na ER te kao endokrini modulatori (Marettova i sur. 2017).

U ovom istraživanju nisu pronađene promjene u koncentracijama steroidnih hormona estradiola i testosterona u serumu ženskih mladunaca F1 generacije u pubertetu, izloženih prenatalno  $\alpha$ -cipermetrinu.

Perinatalna izloženost cipermetrinu u dozama od 1 i 25 mg/kg tj. m./dan uzrokovala je promijenjene razine estradiola i testosterona u serumu ženskih mladunaca F1 generacije u peripubertetskoj i odrasloj dobi. Navedene promjene u razinama steroidnih hormona u skupinama izloženima cipermetrinu mogu biti uzrokom gubitka zametka prije i nakon implantacije, produljenog vremena parenja te smanjene plodnosti (Singh i sur. 2019).

U istraživanju kojeg su proveli Obinna i Kagbo (2017) utvrđeno je da  $\beta$ -cipermetrin nije imao značajan učinak na estrusni ciklus i razine spolnih hormona u serumu odraslih ženki albino štakora.

## 6. Zaključak

U ovom su radu po prvi puta istraženi učinci peroralne prenatalne izloženosti  $\alpha$ -cipermetrinu na parametre endokrine disrupcije reprodukcije majki Wistar štakora te na parametre endokrine disrupcije razvoja i reprodukcije ženskih potomaka F1 generacije.

Rezultati ovog istraživanja upućuju na sljedeće zaključke:

- peroralna izloženost  $\alpha$ -cipermetrinu tijekom gestacije blago smanjuje prirast tjelesnih masa majki Wistar štakora, a nije uočen značajan utjecaj na potrošnju hrane
- peroralna izloženost  $\alpha$ -cipermetrinu tijekom gestacije nije utjecala na parametre endokrine disrupcije reprodukcije majki Wistar štakora pri okotu
- prenatalna peroralna izloženost  $\alpha$ -cipermetrinu utjecala je na vrijednosti anogenitalnog razmaka u ženskih potomaka F1 generacije
- prenatalna peroralna izloženost  $\alpha$ -cipermetrinu nije utjecala je na ulazak u pubertet u ženskih potomaka F1 generacije
- prenatalna peroralna izloženost  $\alpha$ -cipermetrinu nije utjecala na parametre endokrine disrupcije reprodukcije ženskih potomaka F1 generacije
- prenatalna peroralna izloženost  $\alpha$ -cipermetrinu nije utjecala na razine steroidnih hormona, testosterona i estradiola, u serumu ženskih potomaka F1 generacije u pubertetu

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da peroralna izloženost  $\alpha$ -cipermetrinu tijekom gestacije ne utječe na reprodukciju majki Wistar štakora. Također, prenatalna izloženost  $\alpha$ -cipermetrinu ima neznatan utjecaj na razvoj ženskih potomaka F1 generacije, a utjecaj na reprodukciju nije pronađen kao ni na razine steroidnih hormona u serumu u pubertetu. Budući da trenutno nema provedenih istraživanja o učincima  $\alpha$ -cipermetrina kao endokrinog disruptora na razvoj i reprodukciju ženki štakora, dobiveni rezultati predstavljaju vrijedan doprinos istraživanjima djelovanja  $\alpha$ -cipermetrina kao endokrinog disruptora.

## 7. Literatura

- Andersen, C.Y., Ezcurra, D. (2014): Human steroidogenesis: implications for controlled ovarian stimulation with exogenous gonadotropins. **Reproductive Biology and Endocrinology** 12: 128.
- Biswas, A. K., Kondaiah, N., Anjaneyulu, A. S. R., Mandal P. K. (2010): Food safety concerns of pesticides, veterinary drug residues and mycotoxins in meat and meat products. **Asian Journal of Animal Sciences** 4: 46–55.
- ChemSec <https://sinlist.chemsec.org/the-science-behind/eloc-identification/edc/> (Pristupljeno 29.3.2022).
- Chrustek, A., Hołyńska-Iwan, I., Dziembowska, I., Bogusiewicz, J., Wróblewski, M., Cwynar, A. and Olszewska-Słonina, D. (2018): Current Research on the Safety of Pyrethroids Used as Insecticides. **Medicina** 54(4): 61.
- Craig, Z.R., Wang, W., Flaws, J.A. (2011): Endocrine-disrupting chemicals in ovarian function: effects on steroidogenesis, metabolism and nuclear receptor signaling. **Reproduction** 142(5): 633–646.
- Craig, Z.R. (2018): Plastic Compounds. U: Skinner, M.K. (ur.) Encyclopedia of Reproduction (Second Edition). Academic Press, str. 707-713.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C. (2009): Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. **Endocrine Reviews** 30(4):293–342.
- Dodig, S., Čepelak Dodig, D., Pavić, I. (2019): Moguće posljedice rane izloženosti endokrinim disruptorima . **Paediatrica Croatica** 63(4):153-158.
- Eldridge, B.F. (2008). Pesticide application and safety training for applicators of public health pesticides. Vector-Borne Disease Section, 1616.
- Estrogen & Progesterone Production by Thecal & Granulosa Cells (2019) <https://www.youtube.com/watch?v=8FCy5RIyBAc> (pristupljeno 1. 5. 2022.).
- Matsumura F. (1985): Toxicology of insecticides. Plenum Press, New York.
- Fernández, L. (2022) Pesticide use per area of cropland worldwide 1990-2019. <https://www.statista.com/statistics/1263369/global-pesticide-use-per->



Matsuo, N. (2019): Discovery and development of pyrethroid insecticides. **Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences** 95(7): 378–400.

McIntyre, B.S., Barlow, N.J., Foster, P.M.D. (2002): Male rats exposed to Linuron in utero exhibit permanent changes in anogenital distance, nipple retention, and epididymal malformations that result in subsequent testicular atrophy. **Toxicological Sciences** 65: 62-70.

Mlynarcikova, A., Fickova, M. and Scsukova, S. (2014): Impact of endocrine disruptors on ovarian steroidogenesis. **Endocrine regulations** 48(4): 201–24.

Obinna, V. and Kagbo, H. (2017): Endocrine Effect of Beta Cypermethrin on Female Albino Rats. **Journal of Advances in Medicine and Medical Research** 23(3):1–7.

OECD (2018 a), "Two-Generation Reproduction Toxicity Study (OECD TG 416)", in Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264304741-33-en> (pristupljeno 14.6.2022.).

OECD (2018 b), Test No. 443: Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264185371-en> (pristupljeno 14.6.2022.).

OECD (2018 c), "Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test (OECD TG 421) and Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test (OECD TG 422)", in Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264304741-25-en> (pristupljeno 14.6.2022.).

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: 677-683.

Perić, I. (1991): Uloga Antuna Dropca u javnom životu Dubrovnika. **Anali Zavoda za povijesne znanosti Hrvatske akademije znanosti i umjetnosti u Dubrovniku** 29: 277-287.

Sangha, G.K., Kaur, K., Khera, K.S., Singh, B. (2011): Toxicological effects of cypermethrin on female albino rats. **Toxicology International** 18: 5–8.

Schwartz, C.L., Christiansen, S., Hass, U., Ramhøj, L., Axelstad, M., Löbl, N.M., i sur. (2021): On the Use and Interpretation of Areola/Nipple Retention as a Biomarker for Anti-androgenic Effects in Rat Toxicity Studies. **Frontiers in Toxicology** 3: 730752.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2003. Toxicological profile for Pyrethrins and Pyrethroids. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.

<https://www.cdc.gov/TSP/ToxProfiles/ToxProfiles.aspx?id=787&tid=153> (pristupljeno 22.4.2022.).

Thomas J.A. (1996): Toxic response of the reproductive system. U: Klaassen, C.D. (ur.) Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons Vol. 5. New York, McGraw-Hill, str. 561–583.

Trasande, L., Zoeller, R.T., Hass, U., Kortenkamp, A., Grandjean, P., Myers, J.P., DiGangi, J., Bellanger, M., Hauser, R., Legler, J., Skakkebaek N.E., Heindel, J.J. (2015): Estimating Burden and Disease Costs of Exposure to Endocrine-Disrupting Chemicals in the European Union. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** 100(4):1245–1255.

Tsafriiri, A., Chun, S.Y., Reich, R. (1993): Follicular rupture and ovulation. U: Adashi, E.Y. i Leung C.K. (ur.) The Ovary. New York, Raven Press, str. 227-244.

Van den Driesche, S., Scott, H.M., MacLeod, D.J., Fisker, M., Walker, M., Sharpe, R.M. (2011):

Relative importance of prenatal and postnatal androgen action in determining growth of the penis and anogenital distance in the rat before, during and after puberty. **International Journal of Andrology** 34: 578-586.

WHO. (2009) The WHO recommended classification of pesticides by hazard and

World Health Organization/International Program on Chemical Safety (WHO/IPCS) (2002) Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors

[www.who.int/pcs/emerg\\_site/edc/global\\_edc\\_ch5](http://www.who.int/pcs/emerg_site/edc/global_edc_ch5) (Pristupljeno 14.6. 2022).

Wood, J. R., Strauss, J. F. (2002): Multiple signal transduction pathways regulate ovarian steroidogenesis. **Reviews in endocrine and metabolic disorders**, 3(1): 33-46.

Yao, G., Jing, X., Peng, W., Liu, X., Zhou, Z., Liu, D. (2015): Chiral Insecticide  $\alpha$ -Cypermethrin and Its Metabolites: Stereoselective Degradation Behavior in Soils and the Toxicity to Earthworm *Eisenia fetida*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 63(35): 7714–7720.

## 8. Životopis

Rođena sam u Zagrebu, ali odrastam u Ivanić Gradu gdje pohađam opću gimnaziju Ivan Švear. Upisujem se na Odjel za biologiju na Sveučilištu Josipa Juraja Strossmayera u Osijeku, gdje stječem zvanje sveučilišne prvostupnice biologije (univ. bacc. biol.). U Osijeku sudjelujem u organizaciji radionica pod nazivom Pijani mozak na 16. Tjednu mozga i volontiram unutar studentskih organizacija za vrijeme ostalih projekata popularizacije znanosti. Također sudjelujem u projektu "Solidarnost za okoliš" (SOLEN), projekt koji financira Erasmus +Program EU i organiziran je od strane udruge EKO (Grupa za poduzetništvo i socijalnu ekonomiju) iz Atene. Fakultetsko obrazovanje nastavljam na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu i upisujem diplomski studij Eksperimentalna biologija smjer Fiziologija i imunobiologija. Laboratorijsku stručnu praksu stječem kod profesora Damira Mihelića na Veterinarskom fakultetu u Zagrebu na Odjelu za patologiju. Za vrijeme studija volontiram kod profesorice Ane Galov, na projektu ČIGRA. Polažem specijalizirani tečaj za rad sa laboratorijskim životinjama u sklopu predmeta Laboratorijske životinje u znanosti.

### Publikacije:

Katić, Anja; Sulimanec Grgec, Antonija; Micek, Vedran; Merčep, Antonia; Bošnjaković, Anja; Biličić, Lea; Canjuga, Irena; Lucić Vrdoljak, Ana Prenatal exposure to  $\alpha$ -cypermethrin and endocrine disruption in mother rats and fetuses at term. // Abstracts of the 6th Croatian Congress of Toxicology with International Participation CROTOX 2021 ; u: Arhiv za higijenu rada i toksikologiju 72 (2021) (S1) / Lyons, Daniel Mark (ur.). ZAGREB: Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, 2021. str. 41-41 (poster, domaća recenzija, sažetak, znanstveni)