

Učinci prenatalne izloženosti α -cipermetrinu na endokrinu disrupciju reprodukcije i razvoja muških potomaka pokusnih štakora

Biličić, Lea

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:722629>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-10**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj, 2022.

Lea Biličić

3063/MB

**UČINCI PRENATALNE IZLOŽENOSTI
 α -CIPERMETRINU NA ENDOKRINU DISRUPCIJU
REPRODUKCIJE I RAZVOJA MUŠKIH POTOMAKA
POKUSNIH ŠTAKORA**

Rad je izrađen pod mentorstvom prof. dr. sc. Ksenije Durgo (Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu) u Jedinici za toksikologiju Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu, pod komentorstvom dr. sc. Anje Katić.

Ovaj diplomski rad je izrađen u sklopu internog projekta Instituta za medicinska istraživanja i medicinu rada pod nazivom „Procjena učinaka prenatalne izloženosti α -cipermetrinu na epigenetičko programiranje i endokrinu disrupciju reprodukcije i razvoja pokusnih štakora“, čiji je voditelj dr. sc. Anja Katić, dipl. ing. biotehn.

Prije svega, želim se zahvaliti svojoj obitelji. Hvala vam na svakom obliku pomoći koji ste mi sve ove godine nesebično pružali. Posebice hvala mojoj mami, bez tebe ništa od ovog ne bi bilo moguće.

Hvala mojim prijateljima, posebice Roberti, Maji i Antoneli, koji su mi svojim savjetima i podrškom pomogli u pisanju ovog diplomskog rada.

Hvala baka i deda, iako godinama niste fizički sa mnom, vaše postojanje osjećam svugdje oko sebe.

Zahvaljujem se komentorici dr. sc. Anji Katić i mentorici prof. dr. sc. Kseniji Durgo na razumijevanju i pomoći u izradbi ovog diplomskog rada te dr. sc. Ireni Brčić Karačonji na pruženoj prilici izrade diplomskog rada na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u Zagrebu.

Big thanks to my friend Harry, for giving me motivational speech when I needed it the most.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Diplomski sveučilišni studij: Molekularna biotehnologija

UČINCI PRENATALNE IZLOŽENOSTI α -CIPERMETRINU NA ENDOKRINU DISRUPCIJU REPRODUKCIJE I RAZVOJA MUŠKIH POTOMAKA POKUSNIH ŠTAKORA

*Lea Biličić, univ. bacc. biotech. et pharm. inv.
0335003063*

Sažetak:

Brojni pesticidi djeluju kao hormonski otrovi, koji ovisno o razdoblju izloženosti mogu pridonijeti razvoju reproduktivnih poremećaja kod muškaraca i žena. U ovom radu ispitan je utjecaj potencijalnog hormonskog otrova, piretroida α -cipermetrina, na endokrinu disrupciju reprodukcije i razvoja prenatalno izloženih muških potomaka pokusnih štakora. S ciljem utvrđivanja učinaka prenatalne izloženosti α -cipermetrinu na razvoj muških mladunaca F1 generacije promatrani su: anogenitalni razmak, postojanje areola/bradavica i vanjski znakovi spolnog sazrijevanja. Izmjerene su i tjelesne mase muških mladunaca u pubertetu te mase njihovih testisa. Učinci prenatalne izloženosti α -cipermetrinu na reprodukciju muških mladunaca F1 generacije ispitani su praćenjem parametara endokrine disrupcije prema odgovarajućim OECD protokolima. Također su procijenjene razine testosterona u serumu muških fetusa i razine testosterona i progesterona u serumu muških mladunaca u pubertetu imunokemijskom metodom ELISA.

Ključne riječi: *piretroid, hormonski otrov, reprodukcija, razvoj, steroidni hormoni*

Rad sadrži: 48 stranica, 13 slika, 6 tablica, 55 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Durgo

Komentor: dr. sc. Anja Katić, dipl. ing. biotehn., znan. sur., Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada (IMI)

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. prof. dr. sc. Višnja Gaurina Srček (predsjednik)
2. prof. dr. sc. Ksenija Durgo (mentor)
3. dr. sc. Anja Katić, znan. sur., IMI (član)
4. prof. dr. sc. Jasna Mrvčić (zamjenski član)

Datum obrane: 28. srpnja 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Biology and Microbial Genetics

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Biotechnology

Graduate university study programme: Molecular Biotechnology

EFFECTS OF PRENATAL EXPOSURE TO α -CYPERMETHRIN ON ENDOCRINE DISRUPTION OF REPRODUCTION AND DEVELOPMENT OF MALE LABORATORY RAT OFFSPRING

Lea Biličić, univ. bacc. biotech. et pharm. inv.
0335003063

Abstract:

A large number of pesticides act as endocrine disruptors. They could contribute to the development of reproductive disorders in men and women, depending on the period of exposure. In this research we investigated the effect of potential endocrine disruptor, pyrethroid α -cypermethrin, on endocrine disruption of reproduction and the development of prenatally exposed male laboratory rat offspring. In order to determine the effects of prenatal exposure to α -cypermethrin on the development of F1 male offspring anogenital distance, areola/nipple retention and external signs of sexual maturation were monitored. The body mass of pubertal male offspring and mass of their testes were measured. Effects of prenatal exposure to α -cypermethrin on the reproduction of F1 male offspring were investigated by monitoring parameters of endocrine disruption according to the appropriate OECD protocols. The levels of testosterone in foetal serum and testosterone and progesterone in serum of pubertal male offspring were measured using immunochemical method ELISA.

Keywords: *pyrethroid, endocrine disruptor, reproduction, development, steroid hormones*

Thesis contains: 48 pages, 13 figures, 6 tables, 55 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) form is deposited in: The Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: Ksenija Durgo, PhD, Full professor

Co-mentor: Anja Katić, PhD, M. Eng. Biotechn., *Research Associate*

Reviewers:

1. Višnja, Gaurina-Srček, PhD, Full professor
2. Ksenija, Durgo, PhD, Full professor
3. Anja, Katić, PhD, Research Associate, IMI
4. Jasna, Mrvčić, PhD, Full professor

Thesis defended: July 28th, 2022

1	UVOD.....	1
2	TEORIJSKI DIO	3
2.1.	HORMONSKI OTROVI.....	3
2.1.1.	Utjecaj hormonskih otrova na reproduktivni sustav ljudi	5
2.2.	SINTEZA TESTOSTERONA.....	7
2.3.	PESTICIDI.....	8
2.4.	PIRETROIDI.....	9
2.4.1.	T i CS sindrom	10
2.4.2.	Mehanizam djelovanja piretroida	11
2.5.	CIPERMETRIN.....	13
2.6.	BIOMARKERI ENDOKRINE DISRUPCIJE.....	15
2.6.1.	Anogenitalni razmak.....	15
2.6.2.	Postojanje bradavica kod mužjaka pokusnih štakora	17
3	EKSPERIMENTALNI DIO.....	18
3.1.	MATERIJALI.....	18
3.1.1.	Pokusne životinje	18
3.1.2.	Kemikalije.....	19
3.1.3.	Aparatura i pribor	20
3.2.	METODE	21
3.2.1.	Praćenje faza estrusnih ciklusa.....	21
3.2.2.	Odabir životinja za pokus i parenje životinja	23
3.2.3.	Razvrstavanje skotnih štakorica u pokusne skupine.....	24
3.2.4.	Uzorkovanja tkiva	25
3.2.5.	Praćenja parametara endokrine disrupcije razvoja muških mladunaca F1 generacije.....	26
3.2.6.	Praćenja parametara endokrine disrupcije reprodukcije muških mladunaca F1 generacije.....	27
3.2.7.	Određivanja steroidnih hormona u serumu muških mladunaca F1 generacije.....	27
3.3.	STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	28
4	REZULTATI I RASPRAVA	29
4.1.	UČINCI α -CYP NA RAZVOJ MUŠKIH MLADUNACA F1 GENERACIJE	30
4.1.1.	Anogenitalni razmak	30
4.1.2.	Postojanje bradavica.....	32
4.1.3.	Praćenje ulaska u pubertet	33
4.1.4.	Tjelesne mase i mase testisa	34

4.1.5. Razine steroidnih hormona u serumu	36
4.2. UČINCI α -CYP NA REPRODUKCIJU MUŠKIH MLADUNACA F1 GENERACIJE..	41
4.2.1. Parametri endokrine disrupcije reprodukcije	41
5 ZAKLJUČAK	43
6 LITERATURA.....	Error! Bookmark not defined.

POPIS KRATICA:

ED	Hormonski otrovi (engl. <i>Endocrine disruptors</i>)
OECD	engl. <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
ELISA	engl. <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FSH	Folikulostimulirajući hormon
LH	Luteinizirajući hormon
StAR	engl. <i>Steroidogenic acute regulatory protein</i>
LDL	engl. <i>Low-density lipoprotein</i>
HDL	engl. <i>High-density lipoprotein</i>
3 β -HSD	engl. <i>3β-hydroxysteroid dehydrogenase</i>
CYP11A	engl. <i>Cholesterol side-chain cleavage enzyme</i>
CYP	Cipermetrin
ATP	Adenozin trifosfat
LD ₅₀	engl. <i>50% Lethal Dose value</i>
3-PBA	3-fenoksibenzojeva kiselina
T sindrom	engl. <i>Tremor syndrome</i>
CS sindrom	engl. <i>Choreoathetosis with salivation syndrome</i>
NOAEL	engl. <i>No Observed Adverse Effect Level</i>
LOAEL	engl. <i>Lowest Observed Adverse Effect Level</i>
DG	Dan graviditeta
PD	Postnatalni dan
rGCs	engl. <i>Rat granulosa cells</i>

1 UVOD

Endokrini sustav osigurava usklađenu i preciznu komunikaciju između svih dijelova organizma. Sastoji se od endokrinih žlijezda koje pomoću hormona reguliraju metabolizam, tjelesnu temperaturu, elektrolitni sastav te omogućavaju pravilan rast i razvoj jedinke. U današnje vrijeme, sve veći je broj tvari koje narušavaju njegovo djelovanje i time otežavaju uspostavljanje ravnoteže organizma (Diamanti-Kandarakis i sur., 2009). Takvi štetni spojevi nose naziv hormonski otrovi. Najbrojniju skupinu hormonskih otrova čine pesticidi, čija primjena zadnjih pedesetak godina neprestano raste. Zakonske regulative zabranjuju uporabu mnogih pesticida, ali na tržištu se konstantno pojavljuju novi proizvodi sa sličnim mehanizmom djelovanja. Nove varijante pesticida smatraju se ekološki prihvatljivijom alternativom, no ubrzo se uočava njihov toksičan učinak. Jedan od takvih primjera je zamjena organofosfata manje toksičnim piretroidima. Alfa-cipermetrin (engl. *Alpha-cypermethrin*, α -CYP) se ubraja u piretroide širokog spektra djelovanja čija je primarna svrha zaštita poljoprivrednih usjeva od neželjenih insekata (Chrustek i sur., 2018). Piretroidi mogu modulirati aktivnost ionskih kanala što dovodi do remećenja prijenosa živčanih signala i hiperekscitabilnosti neurona. Zbog nespecifičnog i neselektivnog djelovanja mogu imati štetan učinak i na druge vrste. Brojni piretroidi su odgovorni za smanjenu plodnost i reproduktivne poremećaje kod muškaraca i žena.

Cilj ovog diplomskog rada bio je ispitati utjecaj potencijalnog hormonskog otrova α -CYP na endokrinu disrupciju reprodukcije i razvoja prenatalno izloženih muških mladunaca F1 generacije.

U svrhu procjene učinaka prenatalne izloženosti α -CYP na razvoj muških mladunaca F1 generacije promatrani su:

- Anogenitalni razmak
- Postojanje areola/bradavica
- Vanjski znakovi spolnog sazrijevanja (odvajanje prepucija)
- Mase muških mladunaca F1 generacije u pubertetu
- Mase testisa muških mladunaca F1 generacije u pubertetu

U svrhu procjene učinaka prenatalne izloženosti α -CYP na reprodukciju muških mladunaca F1 generacije ispitani su:

- Parametri endokrine disrupcije reprodukcije prema odgovarajućim OECD protokolima (engl. *Organisation for Economic Co-operation and Development*) – uspješnost parenja, duljina gestacije, ukupan broj okoćenih mladunaca, broj živih mladunaca, broj mrtvih mladunaca, stopa preživljenja, omjer spolova mladunaca, mase muških/ženskih mladunaca i mase legla

U svrhu procjene učinaka prenatalne izloženosti α -CYP na procese steroidogeneze izmjerene su razine steroidnih hormona imunokemijskom metodom ELISA. Procijenjene su razine testosterona u serumu muških fetusa i razine testosterona i progesterona u serumu muških mladunaca F1 generacije u pubertetu.

2 TEORIJSKI DIO

2.1. HORMONSKI OTROVI

Hormonski otrovi (engl. *endocrine disruptors*, ED) su egzogene tvari ili smjese tvari koje mijenjaju funkciju(e) endokrinog sustava i time dovode do štetnih učinaka na zdravlje organizma, njegovog potomstva ili (pod)populacija (WHO-IPCS, 2002). Djeluju na biosintezu, prijenos i degradaciju hormona i time narušavaju ravnotežu organizma. Hormonski otrovi obuhvaćaju različite vrste sintetskih spojeva poput industrijskih otapala (poliklorinirani bifenili), plastifikatora (ftalati), pesticida (piretroidi), farmaceutskih pripravaka, itd. Osim sintetskih spojeva, u hormonske otrove ubrajaju se i fitoestrogeni (kumesterol) koji oponašaju biološku aktivnost estrogena (Diamanti-Kandarakis i sur., 2009).

Pojedini hormonski otrovi pokazuju veći afinitet prema receptoru u usporedbi s prirodnim ligandom, tj. djeluju kao agonisti. Vezanjem za odgovarajući receptor dolazi do promjene konformacije receptora, pokretanja signalne kaskade i pripadajućeg staničnog odgovora. S druge strane, pojedini hormonski otrovi pokazuju antagonistički učinak. Vezanjem na receptor ne uzrokuju njegovu konformacijsku promjenu i aktivaciju, već samo onemogućavaju vezanje pripadajućeg liganda i samim time pokretanje staničnog odgovora. Hormonski otrovi mogu inhibirati enzime uključene u metabolizam hormona i proteinske nosače pa time utjecati na razinu i bioraspoloživost hormona u krvotoku. Osim toga, hormonski otrovi su često odgovorni za modifikaciju ekspresije gena putem epigenetičkih procesa poput metilacije DNA i posttranslacijske modifikacije histona. Metilacija DNA i deacetilacija histona rezultiraju utišavanjem ekspresije gena, dok acetilacija histona pridonosi aktivaciji transkripcije specifičnih gena. Dakle, remodeliranjem strukture kromatina dolazi do promjena ekspresije gena ključnih za procese steroidogeneze i spermatogeneze. Snižena razina androgena može nepovoljno utjecati na razvoj spermija što rezultira povećanom stopom strukturnih anomalija spermija (uvinuti, izlomljeni spermiji) (Sifakis i sur., 2017).

Posljedice toksičnosti hormonskih otrova ovise o načinu na koji dopijevaju u organizam (dermalnim, inhalacijskim ili oralnim putem), učestalosti i vremenskom razdoblju izloženosti, genetskoj predispoziciji te starosnoj dobi jedinke. Prisutnost drugih spojeva koji međusobno

međudjeluju također može pridonijeti toksičnijem efektu (aditivni/sinergistički učinak) (Lushchak i sur., 2018).

Sintetski hormonski otrovi izrazito su rezistentni spojevi, a njihovom razgradnjom obično nastaju još štetniji produkti. Pojedine vrste hormonskih otrova, poput organokloriranih pesticida iznimno su postojane. Vrijeme potrebno da se polovina početne koncentracije spoja razgradi, tj. vrijeme poluživota za pojedine pesticide iznosi čak 15 godina. Većina hormonskih otrova odlikuje se niskom topljivošću u vodenom mediju i visokom topljivošću u mastima što dovodi do njihovog nakupljanja u masnom tkivu izložene jedinke. Shodno tome, pretile osobe osjetljivije su na djelovanje hormonskih otrova u usporedbi s osobama normalne tjelesne mase (Sifakis i sur., 2017).

Zbog prekomjerne upotrebe hormonskih otrova i njihove visoke mobilnosti, zastupljeni su u gotovo svim segmentima okoliša. Otpadne vode su jedan od izvora hormonskih otrova; visoke koncentracije etinilestradiola (sintetski estrogen koji se koristi u proizvodnji kontracepcijskih pilula) i bisfenola A pronađene su u jezeru Dianchi u Kini u kojem je uočena feminizacija riba (Liu i sur., 2011).

Najveće koncentracije hormonskih otrova očekivano su pronađene u jetri, koja ima središnju ulogu u biotransformaciji i izlučivanju štetnih tvari. Hormonski otrovi se zbog svoje postojanosti nakupljaju u različitim tkivima što naposljetku rezultira biomagnifikacijom. Dakle, koncentracija štetnih tvari nakupljenih u članovima hranidbenog lanca proporcionalno se povećava s razinom hranidbenog lanca. Najviša koncentracija štetnih tvari zastupljena je u jedinkama najviše trofičke razine, unatoč tome što one nisu bile s njima u direktnom kontaktu (Du i sur., 2014). Samim time, hormonski otrovi često neočekivano postanu dio ljudske prehrane. Iako većina prehrambenih proizvoda sadrži pesticide samo u tragovima, uslijed dugotrajne konzumacije namirnica tretiranih pesticidima može doći do nakupljanja štetnih tvari, narušavanja ravnoteže organskih sustava i razvoja mnogih bolesti.

2.1.1. Utjecaj hormonskih otrova na reproduktivni sustav ljudi

Izloženost hormonskim otrovima u prenatalnom i postnatalnom razdoblju ostavlja daleko veće posljedice na zdravlje jedinke u usporedbi s kontaktom u kasnijim fazama života. Osim trenutnog štetnog učinka, posljedice djelovanja hormonskih otrova na razvojne procese fetusa mogu se manifestirati godinama nakon samog kontakta. U ranom postnatalnom razdoblju dolazi do značajnih razvojnih procesa hipotalamusa koji između ostalog kontrolira razvoj reproduktivnih organa. Stoga je izloženost u tom razdoblju uvelike odgovorna za nastanak reproduktivnih poremećaja u kasnijoj životnoj dobi. Bitno je naglasiti kako je odnos između doze hormonskih otrova i njihova djelovanja na organizam često nelinearan. Uobičajeno, najštetniji učinak ostvaruju visoke i niske doze, dok izloženost dozama srednjih vrijednosti predstavlja najmanju vjerojatnost za razvoj bolesti (engl. *U-shaped curves*) (Combarous, 2017).

2.1.1.1. Poremećaji ženskog reproduktivnog sustava

Razvoj i funkcija ženskog reproduktivnog sustava ovisi o koordiniranim biološkim procesima, a njihova interferencija s egzogenim faktorima poput hormonskih otrova može dovesti do brojnih reproduktivnih poremećaja.

Hormonski otrovi djeluju na receptore ženskih spolnih hormona ostvarujući antagonistički ili agonistički učinak što naposljetku može dovesti do smanjenog broja jajnih stanica, gonadalne disgeneze i prijevremenog zatajenja jajnika. Obzirom da hormonski otrovi prelaze posteljicu barijeru čest su uzrok komplikacija u trudnoći koje mogu rezultirati spontanim pobačajima i ispodprosječnom težinom novorođenčadi (Garcia i sur., 2017).

2.1.1.2. Poremećaji muškog reproduktivnog sustava

Hormonski otrovi često su odgovorni za kongenitalno genitourinarne malformacije kod muškaraca poput hipospadije (nepravilan položaj otvora mokraćne cijevi), kriptorhizma (poremećaj spuštanja testisa u mošnjju) i mikropenisa (Garcia i sur., 2017). Uvelike utječu na kvantitetu, mobilnost i vijabilnost spermija te su jedan od najčešćih uzroka neplodnosti kod muškaraca (Sifakis i sur.,

2017). Narušavaju razvoj reproduktivnih organa i spolnih žlijezda; pokusni štakori izloženi djelovanju pesticida razvili su prostatu manje mase u odnosu na kontrolnu skupinu štakora.

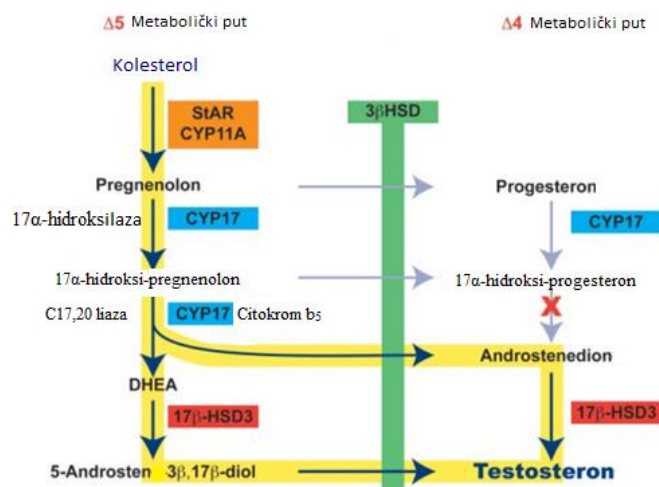
Estrogen ima bitnu ulogu u inicijaciji i progresiji raka prostate. Uočena je pozitivna korelacija između šest vrsta pesticida (jedan dio njih oponaša funkciju estrogena) s učestalošću pojave prostatične intraepitelijske neoplazije koja prethodi raku prostate. Poljoprivredni radnici koji su kontinuirano u kontaktu s pesticidima imaju minimalno dva puta veću vjerojatnost za razvoj raka prostate u usporedbi s pojedincima koji nisu dugotrajno izloženi pesticidima (Silva i sur., 2016). Također, kod žena čiji su partneri bili kronično izloženi pesticidima zabilježena je povišena stopa spontanih pobačaja (Petrelli i Mantovani, 2002).

Pojedini hormonski otrovi poput herbicida atrazina narušavaju funkciju endokrinog sustava izravnim djelovanjem na hipotalamus. Smanjenim lučenjem gonadotropin oslobađajućeg hormona, posljedično dolazi do smanjenog lučenja folikulostimulirajućeg (engl. *Follicle-stimulating hormone*, FSH) i luteinizirajućeg hormona (engl. *Luteinizing hormone*, LH) iz hipofize (Ramaswamy i Weinbauer, 2015). Receptori za FSH eksprimirani su u Sertolijevim stanicama koje su smještene u sjemenim kanalićima, dok se receptori za LH nalaze u intersticijskim Leydigovim stanicama. Sertolijeve stanice imaju ulogu u spermatogenezi, osiguravajući mehaničku i nutritivnu potporu potrebnu za razvoj spermalnih stanica, dok se u Leydigovim stanicama odvija steroidogeneza. Smanjeno lučenje LH i FSH negativno se odražava na razinu testosterona te na kvantitetu spermalnih stanica. Posljedično, dolazi do smanjene plodnosti i različitih oblika reproduktivnih poremećaja (Sharma i sur, 2014).

Provedeno je istraživanje koje je pokazalo kako izloženost hormonskim otrovima u perinatalnom razdoblju može utjecati na vrijeme ulaska u pubertet i razvoj sekundarnih spolnih karakteristika mladića. Ovisno o dozi i vremenu izloženosti, pubertet kod mladića nastupio je znatno ranije ili kasnije od prosjeka (Parent i sur., 2015).

2.2. SINTEZA TESTOSTERONA

Kolesterol je prekursor u sintezi estrogena, progesterona i testosterona. Većina njegove sinteze odvija se u jetri, a potom u obliku LDL (engl. *Low-density lipoprotein*) i HDL (engl. *High-density lipoprotein*) krvlju dolazi do Leydigovih stanica testisa. Enzim StAR (engl. *Steroidogenic acute regulatory protein*) prenosi kolesterol do matriksa mitohondrija. Prvi korak u biosintezi testosterona predstavlja oksidativno cijepanje bočnog lanca kolesterola pomoću enzima CYP11A (engl. *Cholesterol side-chain cleavage enzyme*) pri čemu nastaje pregnenolon. Potom slijedi prijenos pregnenolona od matriksa mitohondrija do glatkog endoplazmatskog retikuluma. Krajnji produkt pretvorbe pregnenolona djelovanjem 3 β -HSD (engl. *3 β -hydroxysteroid dehydrogenase*) i CYP17 je androstenedion. Pretvorba pregnenolona u preteču testosterona može se ostvariti pomoću dva različita metabolička puta; Δ^4 i Δ^5 (slika 1). Kod ljudi je dominantan Δ^5 metabolički put jer CYP17 pokazuje veći afinitet prema 17 α -hidroksi-pregnenolonu u usporedbi sa 17 α -hidroksi-progesteronom. S druge strane, sinteza testosterona kod štakora odvija se pomoću Δ^4 metaboličkog puta zbog većeg afiniteta CYP17 za 17 α -hidroksi-progesteron. Naposljetku, androstenedion se reducira djelovanjem 17 β -HSD (engl. *17 β -hydroxysteroid dehydrogenase*) u testosteron. Jedan dio testosterona otpušta se u krvotok gdje se veže za specifične proteine, dok se drugi dio testosterona veže za androgene receptore u citoplazmi ciljnih stanica (Scott i sur., 2009).



Slika 1. Metabolički put pretvorbe kolesterola u testosteron kod ljudi i viših sisavaca

(prema Scott i sur., 2009)

2.3. PESTICIDI

Veliku grupu hormonskih otrova zauzimaju već spomenuti pesticidi. Pretežito spadaju u organske spojeve, molekularne mase od 300 – 2000 Da (Combarous, 2017). Najviše se upotrebljavaju u poljoprivrednoj djelatnosti u svrhu povećanja prinosa i zaštite proizvoda od nametnika prilikom transporta i skladištenja. Kao posljedica njihove postojanosti, mobilnosti i neselektivnosti dolazi do smanjenja bioraznolikosti i funkcionalnosti ekosustava.

Postojanost pesticida ovisi o temperaturi medija, pH, salinitetu, turbiditetu i prisutnosti drugih ksenobiotika. Većina pesticida pokazuje optimalnu stabilnost pri pH 4, a podliježu procesu hidrolize pri neutralnom i bazičnom pH. Pojedini pesticidi podložni su fotolizi koja može biti direktna (apsorpcija UV zračenja) ili indirektna (interakcija sa slobodnim radikalima). Pesticidi mogu biti osjetljivi na djelovanje metabolizma mikrobioloških vrsta, stoga se postupci bioremedijacije sve više unaprjeđuju kako bi se što brže i učinkovitije provela detoksifikacija kontaminiranih područja. Biotransformacija se u eukariotskim organizmima dijeli na tri faze. U prvoj fazi pesticidi su podvrgnuti procesima oksidacije (djelovanjem monooksigenaza), redukcije i hidrolize (djelovanjem esteraza) kojima prelaze iz hidrofobnih u hidrofilne spojeve. Nastali produkti u drugoj fazi stupaju u reakciju s ugljikohidratima, reduciranim glutationom, sulfatima ili amino kiselinama (reakcije konjugacije) pri čemu nastaju metaboliti dobro topljivi u vodi koji se lako izlučuju iz organizma. Treća faza odnosi se na izlučivanje biotransformiranih ksenobiotika u ekstracelularni prostor djelovanjem transportera ovisnih o ATP (Lushchak i sur., 2018).

Pesticidi se prema namjeni dijele na insekticide (suzbijanje štetnih kukaca), fungicide (suzbijanje gljivičnih oboljenja biljaka) i herbicide (suzbijanje korova). Između ostalog, insekticidi djeluju na živčani i mišićni sustav ciljanih insekata, fungicidi inhibiraju biosintezu ergosterola i stanično disanje patogenih mikroorganizama, dok herbicidi inhibiraju fotosintezu, biosintezu pigmenata i uzrokuju disrupciju stanične membrane (Casida, 2008).

2.4. PIRETROIDI

Piretroidi su skupina sintetskih kemijskih spojeva koja zauzima bitnu poziciju na tržištu insekticida proteklih pedesetak godina. Najviše se upotrebljavaju u zaštiti poljoprivrednih usjeva, ali primjenjuju se i za suzbijanje prijenosnika zaraza, npr. komaraca koji su prijenosnici malarije. Piretroidi su zapravo analozi piretrina, organskih spojeva ekstrahiranih iz cvjetova dalmatinskog buhača (*lat. Chrysanthemum cinerariaefolium*). Piretrini su esteri ciklopropankarboksilne kiseline i cikloptenolona. Kemijskom modifikacijom piretrina sintetizirani su spojevi povećane selektivnosti, učinkovitosti, postojanosti te smanjenog stupnja bio i foto degradacije (Chrutek i sur., 2018).

Uzevši u obzir da srednja letalna koncentracija (engl. *50 % Lethal Dose value*, LD₅₀) za različite vrste piretroida ima raspon od 50 do 500 mg/kg, piretroidi spadaju u umjereno toksične spojeve. Ovisno o načinu unosa u organizam, učinci piretroida mogu uslijediti nedugo nakon izloženosti ili satima nakon primjene. Ukoliko je pesticid apliciran na pokusne životinje dermalnim putem, obično dolazi do niske akutne toksičnosti tek nekoliko sati nakon aplikacije zbog nedostatne apsorpcije putem kože. S druge strane, intravenozna aplikacija rezultira trenutnom akutnom toksičnošću. Kao što je već spomenuto, toksičnost hormonskih otrova ovisi o starosnoj dobi jedinke. Istraživanja su pokazala da piretroidi permetrin, deltametrin i cipermetrin (engl. *Cypermethrin*, CYP) ostvaruju šest do sedamnaest puta toksičniji učinak kod neonatalnih štakora u usporedbi s odraslim jedinkama (Soderlund, 2010). Jedno od mogućih objašnjenja je nedovoljno razvijen detoksifikacijski enzimski sustav. U uzroke veće osjetljivosti prema piretroidima pripadaju i specifične izoforme natrijevih ionskih kanala koje su eksprimirane u većem broju kod neonatalnih štakora u usporedbi s odraslim jedinkama (Soderlund, 2012).

Uočen je učinak deltametrina na razvoj centralnog živčanog sustava kod postnatalno izloženih pokusnih štakora. Zabilježena je povećana motorna aktivnost kod pokusnih štakora u dobi od četiri mjeseca koji su u postnatalnom razdoblju bili izloženi deltametrinu. Također, dugotrajna izloženost CYP rezultirala je smanjenim brojem receptora za dopamin, otežanim transportom dopamina te neurodegeneracijom dopaminergičkih neurona (Wakeling i sur., 2012).

Iako su piretroidi usmjereni na remećenje prijenosa živčanih signala kod insekata, oni mogu imati negativan učinak i na živčani sustav ljudi. Ustanovljena je pozitivna korelacija između razine

metabolita piretroida, 3-fenoksibenzojeve kiseline (engl. *3-phenoxybenzoic acid*, 3-PBA) i učestalosti pojave poremećaja pažnje s hiperaktivnošću kod djece. Istraživanjem provedenim u Kaliforniji u razdoblju od 2007. – 2009. godine u kojem je sudjelovalo 173 ispitanika, utvrđene su koncentracije 3-BPA u čak 62,4 % slučajeva (Tang i sur., 2018). Također, povišena razina 3-PBA detektirana je u urinu muškaraca sa znatno smanjenom koncentracijom, pokretljivošću i vijabilnosti spermata. U istraživanju je sudjelovalo 346 muškaraca u starosti od 20-50 godina koji su tijekom života povremeno bili izloženi manjoj količini pesticida (Jin i sur., 2011).

S obzirom na njihovu učestalu primjenu, piretroidi se nalaze u gotovo svim dijelovima biosfere. Najmanje su zastupljeni u vodama upravo zbog njihova hidrofobnog karaktera. Zbog velike mobilnosti i postojanosti značajne koncentracije piretroida i pripadajućih metabolita otkrivene su kilometrima udaljenim od mjesta upotrebe (Tang i sur., 2018).

2.4.1. T i CS sindrom

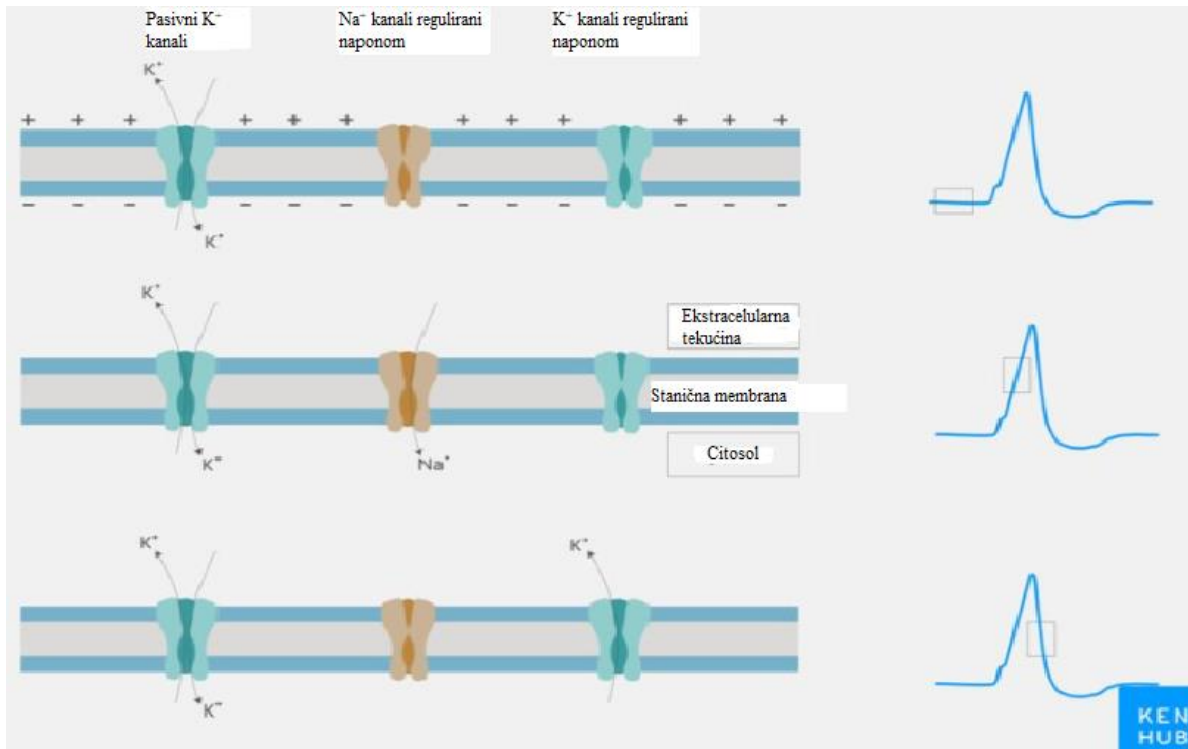
Postoji korelacija između kemijske strukture piretroida i simptoma toksičnosti koje piretroidi izazivaju. Esteri primarnih alkohola poput aletrina i resmetrina, pripadaju u piretroide tipa 1. Relativno su nestabilni pri vanjskim uvjetima, stoga se uglavnom koriste za suzbijanje insekata u kućanstvu. U većini slučajeva, piretroidi tipa 1 dovode do razvoja T sindroma (engl. *Tremor syndrome*, *T syndrome*) kojeg karakterizira povećana osjetljivost na vanjske podražaje, agresivnost, ritmični poremećaji pokreta (tremor) i povišena tjelesna temperatura. S druge strane, esteri α -cijano-3-fenoksibenzilnih alkohola (CYP i deltametrin) ubrajaju se u piretroide tipa 2 i oni su najčešće odgovorni za pojavu CS sindroma (engl. *Choreoathetosis with salivation syndrome*). Uvođenjem fenoksibenzilne skupine povećana je njihova stabilnost pri vanjskim uvjetima stoga imaju primjenu u zaštiti poljoprivrednih usjeva. Učestali simptomi CS sindroma su povišena salivacija, neritmični poremećaji pokreta, tj. trzaji (koreoatetoz), epileptični napadaji i snižena tjelesna temperatura. Iako su piretroidi tipa 1 odgovorni za nastanak T sindroma, postoje spojevi koji obzirom na kemijsku strukturu pripadaju piretroidima tipa 1, ali dovode do razvoja simptoma karakterističnih za CS sindrom (Breckenridge i sur., 2009).

2.4.2. Mehanizam djelovanja piretroida

Razlika u električnom naboju izvan i unutar ekscitabilne stanice naziva se membranski potencijal. Ekscitabilne stanice imaju sposobnost pretvorbe kemijskih i mehaničkih signala u električne impulse, a primjer takvih stanica su neuroni i mišićne stanice. Potencijal stanice u mirovanju iznosi -70 mV. Zbog razlike u koncentraciji različito nabijenih iona, unutrašnjost stanice je za 70 mV manje pozitivna od ekstracelularnog prostora.

Akcijski potencijal označava brzu reverzibilnu promjenu membranskog potencijala ekscitabilnih stanica. Mehanička sila ili vezanje neurotransmitera inducira otvaranje specifičnih ionskih kanala. Uslijed razlike u koncentraciji i naboju iona (elektrokemijski gradijent), određeni ioni imaju tendenciju ulaziti u stanicu putem ionskih kanala što uzrokuje promjenu naboja s obje strane membrane (Alberts B i sur., 2010). Promjena membranskog potencijala s -70 mV na -55 mV (početak akcijskog potencijala) izaziva konformacijsku promjenu i otvaranje velikog broja Na^+ kanala (slika 2).

Vezanjem za α podjedinicu, piretroidi usporavaju zatvaranje i inaktivaciju ionskih kanala što rezultira ulaskom većeg broja iona Na^+ pa naboj stanice postaje sve elektropozitivniji (hiperdepolizacija). Piretoridi tipa 1 zadržavaju Na^+ kanale otvorenima kraći vremenski period u usporedbi s piretroidima tipa 2. Piretroidi tipa 1 uzrokuju brze ponavljajuće promjene naboja, dok piretroidi tipa 2 uzrokuju ireverzibilnu depolarizaciju (Shafer i sur., 2005). Uslijed nedostatne repolarizacije dolazi do inhibicije prijenosa električnih impulsa duž aksona. Mehanizam djelovanja piretroida očituje se u hiperekscitabilnosti neurona što u kratkom periodu dovodi do njihove apoptoze (Wakeling i sur., 2012).



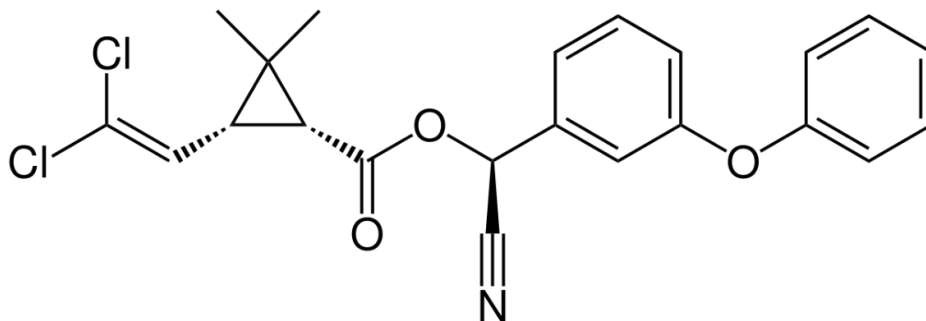
Slika 2. Prikaz promjene konformacije ionskih kanala uslijed promjene vrijednosti membranskog potencijala. Pasivni K^+ kanali konstantno su otvoreni; neovisno o vrijednosti membranskog potencijala. Na^+ kanali regulirani naponom su otvoreni za vrijeme depolarizacije dok su K^+ kanali regulirani naponom zatvoreni. Nakon postizanja amplitude akcijskog potencijala dolazi do zatvaranja Na^+ kanala i otvaranja K^+ kanala. Nakon uspostavljanja vrijednosti membranskog potencijala od -70 mV K^+ kanali regulirani naponom ponovno se zatvaraju (prema Vasković, 2022)

2.5. CIPERMETRIN

Cipermetrin (engl. *Cypermethrin*, CYP) (slika 3) nastaje kondenzacijom 2-hidroksi-2-(3-fenoksifenil)acetonitrila i 3-(2,2-diklorovinil)-2,2-dimetilciklopropankarboksilne kiseline ('Summary for CID 2912, Cypermethrin'). CYP se pojavljuje u obliku smjese cis i trans enantiomera u omjeru 40:60 (Romero i sur., 2017).

Alfa-CYP (engl. *Alpha-cypermethrin*, α -CYP) pripada skupini piretroida tipa 2, a na tržištu se pojavljuje u obliku kristalnog praha svijetlo žute boje (tablica 1) (Chrustek i sur, 2018). Pojavljuje se u obliku smjese cis i trans enantiomera u omjeru 1:1. CYP dostupan na tržištu obično sadrži 20-40% α -CYP te je nešto niže toksičnosti od α -CYP. Prihvatljivi dnevni unos za CYP iznosi do 0,05 mg/kg/tjelesne mase na dan (mg/kg tj. m./dan), dok za α -CYP iznosi 0,02 mg/kg tj. m./dan (Ritter i Greenlees, 2022). U ljudski organizam može dospjeti oralnim (gutanje tretiranih namirnica), dermalnim (česta pojava kod poljoprivrednih radnika) ili respiratornim putem (nalazi se u sastavu mrežica za suzbijanje komaraca).

u ljudski organizam može dospjeti oralnim, dermalnim ili respiratornim putem



Slika 3. Prikaz kemijske strukture CYP, naziv po IUPAC-u: [Cijano-(3-fenoksifenil)metil]3-(2,2-dikloroetenil)-2,2-dimetilciklopropan-1-karboksilat (prema PubChem, 2021)

Obzirom da ne postoji skoro niti jedan istraživački rad u kojem je praćen utjecaj izloženosti α -CYP na razvoj i reprodukciju pokusnih životinja, prikazani su dostupni podaci koji se odnose na piretroid CYP.

Postojanost CYP na tretiranim biljkama iznosi pet dana, dok se u vodi zadržava oko pedeset dana. Ovisno o sastavu tla i prisutnošću mikrobioloških vrsta, vrijeme poluživota CYP u tlu iznosi od

četiri dana pa čak do osam tjedana (Junquera, 2021). Detoksifikacijskim metabolizmom CYP prelazi u polarne produkte koji se potom vežu za čestice sedimenta. Zbog niske pokretljivosti u tlu mala je vjerojatnost daljnje kontaminacije podzemnih voda. Izrazito je stabilan u neutralnom i kiselom mediju, dok pri višim pH vrijednostima (pH 9) podliježe procesima hidrolize (Chrutek i sur., 2018). Kako bi se što duže održala postojanost CYP u ciljnom organizmu, često se koristi u kombinaciji s piperonil butoksidom. Piperonil butoksid djeluje kao sinergist jer inhibira citokrom P450 i time otežava degradaciju CYP.

Iako su slučajevi akutnog trovanja izazvanih CYP kod ljudi vrlo rijetki, pri dozi od 100-1000 mg/kg tj. m./dan dolazi do pojave osipa, svrbeža, spazma mišića, gubitka koordinacije pokreta, mučnina, urinarne inkontinencije i epileptičnih napadaja koji mogu rezultirati smrtnim ishodom (Aman i sur., 2018).

CYP pripada skupini hormonskih otrova koji ostvaruju negativno djelovanje na reprodukciju; CYP narušava procese steroidogeneze i spermatogeneze što dovodi do smanjene stope plodnosti. Direktno snižava ekspresiju gena koji kodiraju za enzime uključene u sintezu androgenih hormona te ekspresiju pripadajućih receptora. Tretman CYP u dozi od 25 mg/kg tj. m./dan kroz razdoblje od 3 tjedna, na pokusnim miševima u pubertetu rezultirao je sniženom razinom ekspresije mRNA P45017 α liaze (Jin i sur., 2011). Nadalje, toksično djelovanje CYP može izazvati hiperplaziju Leydigovih stanica, atrofiju seminiferne tubula, proširenje i začepljenje krvnih žila, hemoragiju, nakupljanje eksudata i edem testikularnog tkiva (Alaa-Eldin i El-Shafei, 2017).

Također, kod ženki pokusnih miševa perinatalno izloženih CYP u dozi od 12 mg /kg tj. m./dan, zabilježena je povišena stopa pobačaja i veći broj ženskih potomaka naspram muških što potvrđuje djelovanje CYP na endokrini i reproduktivni sustav (Xiangdong i Chaobin, 2014).

Slično kao i kod drugih piretroida, toksičan učinak CYP očituje se u remećenju prijenosa živčanih signala, povišenoj razini glukoze, lipida i malonildialdehida (marker oksidativnog stresa), smanjenoj razini inzulina i antioksidativnih enzima, promjeni ekspresije pro- i anti-apoptičkih gena, smanjenoj razini citokina IL-2, IL-8, IL-12 i IFN- γ , itd. Iako je primarni cilj djelovanja CYP neurološki sustav, posljedice njegove toksičnosti odražavaju se na cjeloukupan organizam (Chrutek i sur., 2018).

2.6. BIOMARKERI ENDOKRINE DISRUPCIJE

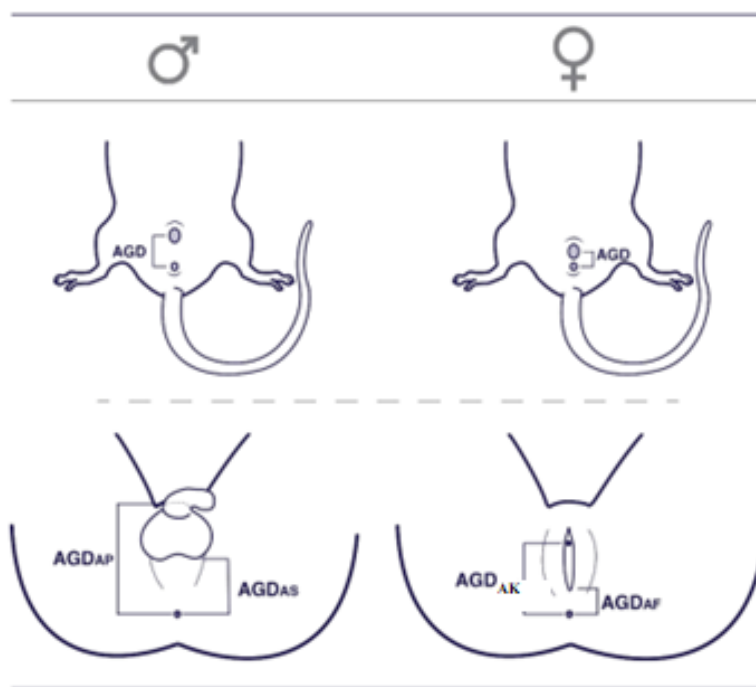
2.6.1. Anogenitalni razmak

Anogenitalni razmak (engl. *Anogenital distance*, AGD) odnosi se na udaljenost između analnog otvora i vanjskih genitalija (slika 4). Jedan je od ključnih parametara pri određivanju učinka određene kemikalije na endokrini sustav. Dakle, anogenitalni razmak je biomarker endokrine disrupcije i pokazatelj potencijalnih poremećaja reproduktivnog zdravlja. Brojna istraživanja potvrdila su korelaciju između duljine anogenitalnog razmaka i pojave reproduktivnih poremećaja kod muškaraca i žena. Znatno manji anogenitalni razmak od uobičajenog izmjeren je kod novorođenčadi s poremećajima mokraćno-spolnog sustava; hipospadije i kriptorhizma. Ispodprosječan anogenitalni razmak može ukazati na nisku razinu testosterona, smanjenu kvantitetu spermija i shodno tome nisku stopu plodnosti u odrasloj dobi. Zabilježena je veća učestalost tumora testikularnih germinativnih stanica kod muškaraca sa znatno kraćim anogenitalnim razmakom. Anogenitalni razmak kod mužjaka pokusnih štakora dvostruko je veći od anogenitalnog razmaka kod ženki pokusnih štakora. Naveden odnos vrijednosti anogenitalnih razmaka također je prisutan kod muškaraca i žena (Schwartz i sur., 2019).

2.6.1.1. Signalni put androgena

Niske vrijednosti anogenitalnog razmaka ukazuju na remećenje signalnih puteva potaknutih androgenim hormonima. Nakon difuzije testosterona u citoplazmu ciljne stanice dolazi do njegovog vezanja za androgene receptore. Jedan dio molekula testosterona redukcijom, djelovanjem 5 α -reduktaze, prelazi u dihidrotestosteron koji pokazuje puno veći afinitet vezanja za androgene receptore. Androgeni receptor pojavljuje se u obliku monomera, a nakon vezanja liganda dolazi do njegove dimerizacije i translokacije u jezgru. Kompleks liganda i receptora ujedno predstavlja transkripcijski faktor; vezanjem za specifične sekvence na DNA (androgen responzivne elemente) dolazi do aktivacije transkripcije specifičnih gena i pokretanja signalnih puteva ključnih za diferencijaciju muških reproduktivnih organa (Roy i sur., 1998). Testosteron potiče diferencijaciju dosjeminika i testisa, dok je dihidrotestosteron odgovoran za razvoj prostate,

penisa i perineuma (prostor između analnog otvora i skortuma). Niske razine testosterona i dihidrotestosterona uzrokuju ispodprosječan anogenitalni razmak te nepotpunu maskulinizaciju.



Slika 4. Prikaz mjerenja anogenitalnog razmaka kod pokusnih štakora i ljudi. Anogenitalni razmak kod pokusnih štakora mjeri se od analnog otvora do genitalnog tuberkula (preteča penisa kod mužjaka i klitorisa kod ženki). Anogenitalni razmak kod ljudi može se mjeriti na dva načina.

AGD_{AP}/AGD_{AK} označava udaljenost od analnog otvora do penisa/klitorisa, dok se AGD_{AS}/AGD_{AF} odnosi na udaljenost između analnog otvora i skortuma/frenuluma malih usana
(prema Fischer i sur., 2020)

Hormonski otrovi mogu inhibirati enzime ključne u sintezi i metabolizmu testosterona te djelovati kao antagonisti androgenih receptora. Osim što onemogućavaju vezanje testosterona i dihidrosterona za odgovarajuće receptore, ometaju translokaciju androgenih receptora s pripadajućim ligandom i njihovo vezanje za androgen responzivne elemente (Roy i sur., 1998).

2.6.2. Postojanje bradavica kod mužjaka pokusnih štakora

Jedan od neizostavnih biomarkera endokrine disrupcije prema OECD (engl. *Organisation for Economic Co-operation and Development*) protokolima je i pojava bradavica kod mužjaka pokusnih životinja. Kod mužjaka i ženki pokusnih štakora spolni dimorfizam očituje se u broju bradavica. Kod ženka je razvijeno 12 bradavica, dok kod mužjaka one nisu razvijene. “Kritično” razdoblje za maskulinizaciju u štakora nastupa od 15.5 do 18.5 dana od začeća. U tom prenatalnom razdoblju dihidrotestosteron potiče razvoj muških spolnih karakteristika te zaustavlja daljni razvoj primordiuma bradavica. Ukoliko su mužjaci pokusnih štakora u tom razdoblju izloženi hormonskim otrovima koji ometaju signalni put androgena dolazi do nepotpune maskulinizacije i razvoja bradavica karakterističnih za ženke. Pojava bradavica kod mužjaka uslijed izlaganja hormonskim otrovima u velikom broju slučajeva predstavlja ireverzibilnu promjenu (Schwartz i sur., 2021).

3 EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Pokusne životinje

U ovom istraživanju korišteni su štakori soja Wistar HsdBrlHan. Naveden soj karakterizira široka građa glave, duga uha i dužina repa koja je manja od tjelesne dužine. Prednosti korištenja navedenog soja su niža tjelesna težina (manji troškovi), jednostavan uzgoj i dug životni vijek. Primjerice, soj *Wistar Han* ima za 37 % veću stopu preživljenja u usporedbi sa sojem *Sprague Dawley*. Također, učestalost pojave tumora kod soja *Wistar Han* znatno je niža nego kod ostalih sojeva (ENVIGO BLOG, 2022).

Laboratorijski štakori korišteni u ovom istraživanju bili su iz vlastitog uzgoja 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).

U ovom istraživanju su korištene 72 spolno zrele ženke štakora u dobi od 3 mjeseca, koje su bile podijeljene u šest pokusnih skupina. Na početku samog pokusa ženke su izvagane te su im repovi označeni rimskim brojevima (I-IV). Potom su po četiri ženke nasumično smještene u jedan kavez srednje veličine za držanje malih pokusnih glodavaca (Techniplast, Italija; Ehret, Tulln, Austrija) na način da su im prosječne tjelesne mase po kavezu bile podjednake. Sve životinje su imale slobodan pristup (*ad libitum*) tekućini za napajanje i standardnom krmivu za pokusne glodavce (Complete feed for mice and rats 4RF21, Mucedola, Settimo Milanese, Italija) (slika 5). Tijekom parenja ženke su raspoređene u kaveze s mužjacima u omjeru 1:1. Skotne ženke su prebačene u male kaveze u kojima se nalaze s mladuncima sve do 21. dan nakon okoćenja kada nastupa odbijanje mladunaca. Nakon mjesec dana starosti, potomci su razvrstani po spolu i premješteni iz malih u kaveze srednje veličine.

Životinje su tijekom pokusa držane pod kontroliranim uvjetima sukladno zakonskim propisima: temperatura od 20 do 22 °C, vlaga od 40 do 60 % i izmjena ciklusa svjetlo/tama od 12 sati.



Slika 5. Razmještaj pokusnih životinja po kavezima (*vlastita fotografija*)

3.1.2. Kemikalije

- α -cipermetrin, analitički standard, PESTANAL® (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Njemačka)
- voda
- dietilstilbestrol (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Njemačka)
- kukuruzno ulje (Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Njemačka)
- anestetici: ketamin-narketan (Vetoquinol UK Ltd., Towcester, United Kingdom)
ksilazin-ksilapan (Vetoquinol UK Ltd., Towcester, United Kingdom)
- kit za progesteron: Progesterone rat/mouse ELISA Kit (DEV9988)
(Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Njemačka)
- kit za testosteron: Testosterone rat/mouse ELISA Kit (DEV9911)
(Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Njemačka)

Tablica 1. Usporedba fizikalnih svojstava α -cipermetrina i dietilstilbestrola

(prema PubChem, 2021)

	α -cipermetrin	dietilstilbestrol
IUPAC ime	[(S)-cijano-(3-fenoksifenil)metil] (1R,3R)-3-(2,2-dikloroetenil)-2,2-dimetilciklopropan-1-karboksilat	4-[(E)-4-(4-hidroksifenil)heks-3-en-3-il]fenol
Molekularna masa	416.3 g/mol	268.3 g/mol
Boja/forma	Žuti kristalični prah	Bijeli kristalični prah
Točka tališta	81.3 °C	169-172 °C
Točka vrelišta	200 °C	407.1±25.0 °C
Topljivost	Aceton, diklormetan,toulen	Aceton, kloroform,etanol
LogP	6.06	5.07

3.1.3. Aparatura i pribor

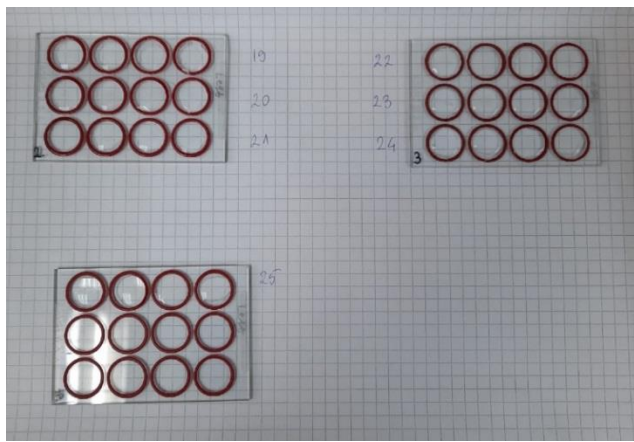
- Analitička vaga (New Classic MS303S, Mettler Toledo AG, Švicarska)
- Tehnička vaga (P 400, Mettler, Švicarska)
- Svjetlosni mikroskop (Zeiss Axiostar plus)
- Centrifuga (Eppendorf AG, Njemačka)
- Instrument za mjerenja razina hormona u serumu imunokemijskom metodom ELISA: Personal Lab instrument (IASON, Graz, Austria)
- Eppendorf pipete s nastavcima (Eppendorf AG, Njemačka)
- Staklena kapaljka, staklene pločice

3.2. METODE

3.2.1. Praćenje faza estrusnih ciklusa

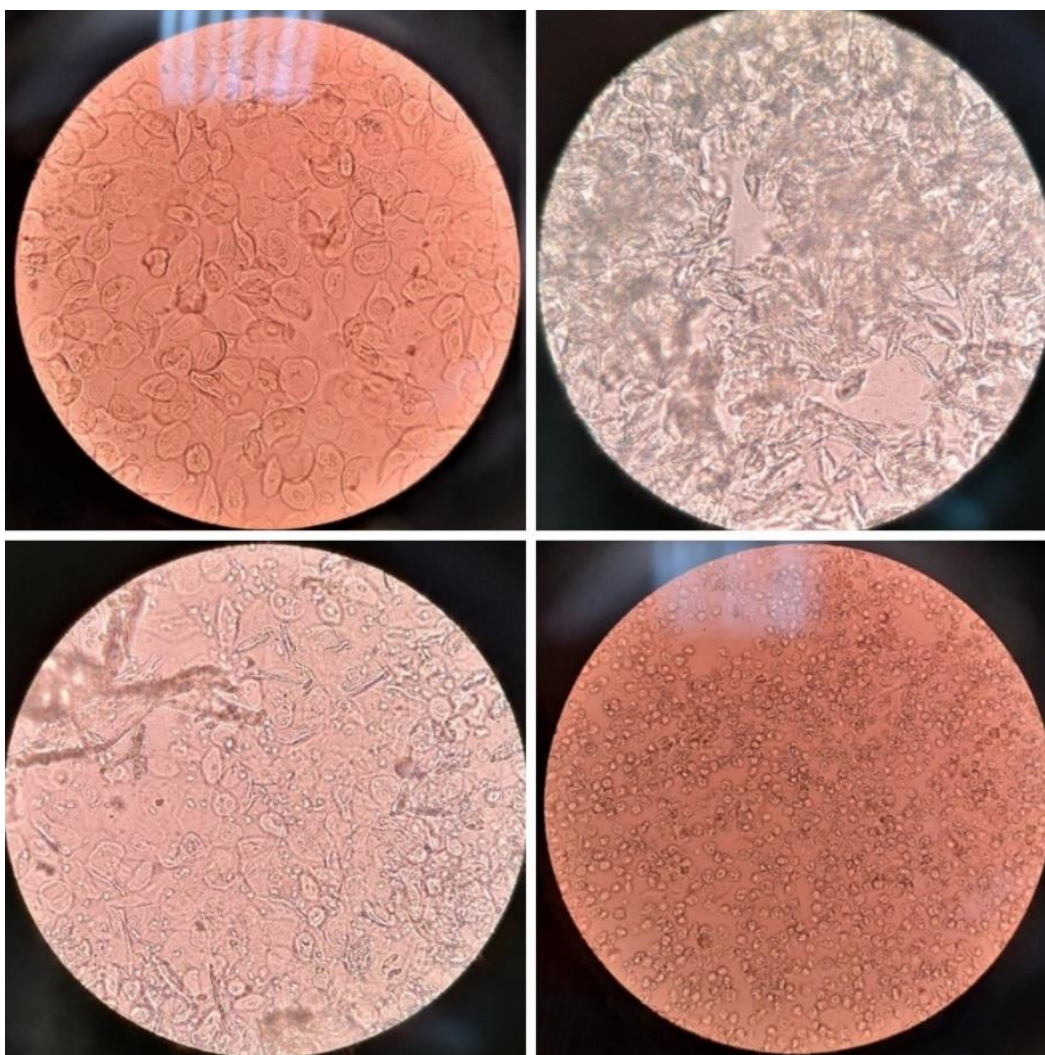
U svrhu utvrđivanja ženki s ujednačenim četverodnevnom estrusnim ciklusima, svakog jutra u razdoblju od četiri tjedna tehničko osoblje uzimalo je ispirke rodnice pomoću staklene kapaljke napunjene mlakom vodom iz vodovoda. Kapi s ispircima nanošene su redom (prema oznakama štakorica) na staklene pločice (slika 6). Pomoću svjetlosnog mikroskopa (Zeiss Axiostar plus) iz citoloških ispiraka promatrane su oljuštene stanice epitela rodnice sluzi. Ovisno o broju i vrsti stanica određena je faza estrusnog ciklusa te su podaci zabilježeni u dnevnik pokusa (slika 8).

Estrusni ciklus štakorica dijeli se na četiri faze: proestrus, estrus, metestrus i diestrus (slika 7). Obično traje 4-5 dana, a najduži period zauzima diestrus (48-72 h). Trajanje pojedine faze može varirati od ciklusa do ciklusa što je bio otežavajući faktor pri odabiru štakorica za parenje. Proestrus obično traje 14 h, u rodnikom ispirku dominantne su epitelne stanice s jezgrom. U estrusu su najbrojnije rožnate stanice, u ovoj fazi nastupa ovulacija te su štakorice spremne za kopulaciju s mužjacima. Metestrus karakterizira podjednaka zastupljenost svih vrsta stanica; leukocita, rožnatih stanica i epitelnih stanica s jezgrom. Rodnički ispirak štakorica u diestrusu izrazito je gust i sluzav, a leukociti su najzastupljenija vrsta stanica (Ajayi i Akhigbe, 2020).



Slika 6. Staklene pločice na koje su nanoseni ispirci rodnice (redom prema oznakama štakorica)

(vlastita fotografija)



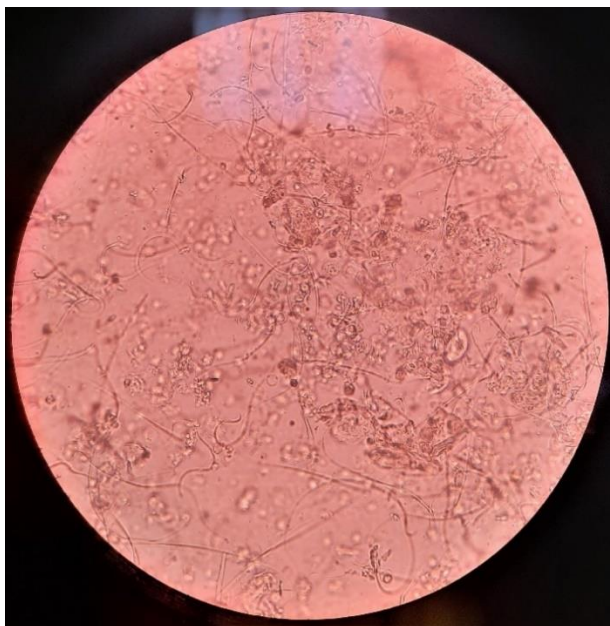
Slika 7. Faze estrusnog ciklusa štakorica (proestrus, estrus, metestrus, diestrus, *redom s lijeva na desno*) gledane pod svjetlosnim mikroskopom

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 8. Tablica u kojoj su bilježene faze estrusnog ciklusa štakorica određene na temelju zastupljenosti pojedinih stanica. U ispircima rodnice, ovisno o fazi uočene su rožnate stanice (C), epitelne stanice s jezgrom (NE) i leukociti (L) (*vlastita fotografija*)

3.2.2. Odabir životinja za pokus i parenje životinja

Nakon detaljnog proučavanja podataka o fazama estrusnog ciklusa svake pojedine ženke, izdvojene su štakorice kod kojih se faze estrusnog ciklusa pravilno izmjenjuju. Na dan proestrusa ženke su stavljene u rasplod s neizloženim mužjacima preko noći u omjeru 1:1. Sljedećeg jutra mužjaci su izvađeni iz kaveza, a ženke su pregledane da se utvrdi ukoliko je u otvoru rodnice zaostao sluzni čep nakon parenja, koji je pokazatelj da je ženka vjerojatno zaniijela. Ženkama kod kojih nije uočen sluzni čep u rodnicima su uzeti ispirci rodnice koji su pregledani pod svjetlosnim mikroskopom (Zeiss Axiostar plus). Ukoliko su u ispircima rodnice pronađeni spermiji, štakorice su proglašene sperm pozitivnima i skotnima (slika 9). S obzirom na neujednačene cikluse ženki, navedeni postupci ponavljani su kroz sljedećih nekoliko dana. Kod ženki koje su proglašene sperm pozitivnima, sljedećih par dana promatrani su citološki rodnički ispirci. Ukoliko su ženke zaniijele, zaustavljena je izmjena faza estrusnog ciklusa, tj. one više ne cikliraju. Dan u kojem je utvrđena prisutnost spermija u rodničkim ispircima ili sluzni čep u rodnici označen je kao prvi dan graviditeta (DG).



Slika 9. Sperm pozitivnan ispirak rodnice (*fotografirala Antonia Merčep*)

3.2.3. Razvrstavanje skotnih štakorica u pokusne skupine

Skotne štakorice su razvrstane u 6 pokusnih skupina od 12 životinja po svakoj skupini. Negativna kontrolna skupina uključivala je skotne štakorice izložene vodi, dok su skotne štakorice izložene kukuruznom ulju predstavljale kontrolu samog otapala. Tri pokusne skupine bile su izložene α -CYP u dozama od 1, 10 i 19 mg/kg tj. m./dan. Pozitivna kontrola bila je izložena dietilstilbestrolu u koncentraciji od 10 μ g/kg tj. m./dan. Navedene doze izloženosti α -CYP izračunate su prema trenutno dostupnim NOAEL (engl. *No Observed Adverse Effect Level*) i LOAEL (engl. *Lowest Observed Adverse Effect Level*) vrijednostima za reproduktivnu toksičnost u štakora, koje za α -CYP iznose 7.5 mg/kg/dan (NOAEL) i 37.5 mg/kg/dan (LOAEL) (WHO, 2019). Životinje su tretirane od 6. dana graviditeta (DG) do 21. DG odnosno do okoćenja, 1 mL/dan, peroralno želučanocrijevnom sondom kako bi se imitirao prirodan put unosa pesticida hranom i uz istovremenu sigurnost da je svaka životinja bila izložena točno željenoj koncentraciji spoja. Sve navedene skupine životinja držane su pod jednakim uvjetima.

3.2.4. Uzorkovanja tkiva

Dio skotnih ženki žrtvovan je 21. DG. Štakorice su uspavane 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). Nakon toga, prerezana je vratna arterija te izveden ventralni medijalni rez od kaudalnog dijela trupa do vrata. Potom je izvađena gravidna maternica s plodovima (slika 10) i jajnicima koja je detaljno pregledana. Gravidna maternica je razrezana te su otvoreni plodni mjehuri zarezivanjem ovojnice pri čemu su se prikazale posteljice i fetusi.

Muškim fetusima F1 generacije (slika 11) prikupljena je krv radi utvrđivanja razine testosterona u serumu. 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.



Slika 10. Gravidna maternica štakorice 21. DG (*fotografirala Antonia Merčep*)



Slika 11. Fetusi izolirani iz gravidne maternice štakorice 21. DG

(fotografirala Antonia Merčep)

Nakon što je kod muških mladunaca F1 generacije potvrđen ulazak u pubertet, dio mladunaca je izvagano i uspavano 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) te im je uzorkovana krv u svrhu određivanja razina progesterona i testosterona u serumu. 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. Uzorkovani su testisi koji su izvagani, a mase su zabilježene u tablice.

3.2.5. Praćenja parametara endokrine disrupcije razvoja muških mladunaca F1 generacije

S ciljem procjene učinaka α -CYP na razvoj prenatalno izloženih muških mladunaca F1 generacije praćeni su parametri endokrine disrupcije prema odgovarajućim OECD protokolima (OECD, 2018 a, b). Četiri dana nakon okoćenja muškim mladuncima izmjeren je anogenitalni razmak i podaci su zabilježeni u tablice (McIntyre i sur., 2002; Hotchkiss i sur., 2007; Van der Driesche i sur., 2011; Schwartz i sur., 2021).

Trinaest dana nakon okoćenja provjereno je postojanje areola/bradavica kod muških mladunaca (McIntyre i sur., 2002; Hotchkiss i sur., 2007; Schwartz i sur., 2021). Podaci su zabilježeni.

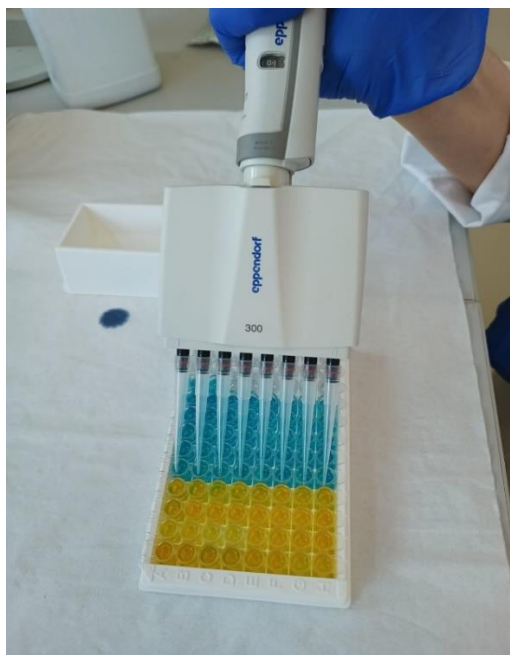
Također nakon odvajanja od majke (koje je nastupilo 21 dan nakon okoćenja) muškim mladuncima su svakodnevno promatrani vanjski znakovi spolnog sazrijevanja, odnosno odvajanje prepucija, kako bi se utvrdio ulazak u pubertet. Podaci su zabilježeni u pripremljene tablice.

3.2.6. Praćenja parametara endokrine disrupcije reprodukcije muških mladunaca F1 generacije

S ciljem praćenja učinaka α -CYP na reprodukciju muških mladunaca F1 generacije prenatalno izloženih α -CYP dio muških mladunaca kod kojih je potvrđen ulazak u pubertet stavljen je na parenje s neizloženim spolno zrelim štakoricama preko noći u omjeru 1:1 na jednak način kako su parene ženke F0 generacije. Na dan okota praćeni su parametri endokrine disrupcije reprodukcije mladunaca F1 generacije sukladno odgovarajućim OECD protokolima (OECD, 2018 a, b): uspješnost parenja, duljina gestacije, ukupan broj okoćenih mladunaca, broj živih mladunaca, broj mrtvih mladunaca, stopa preživljenja, omjer spolova mladunaca, mase muških/ženskih mladunaca, mase legla. Svi podaci su zabilježeni u pripremljene tablice.

3.2.7. Određivanja steroidnih hormona u serumu muških mladunaca F1 generacije

Pomoću imunokemijske metode ELISA (Personal Lab instrument, IASON, Graz, Austria) izmjerene su koncentracije testosterona u serumu muških fetusa i progesterona i testosterona u serumu muških mladunaca F1 generacije u pubertetu (slika 12). Analize su provedene korištenjem standardnih kitova za testosteron (Testosterone rat/mouse ELISA Kit (DEV9911), Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Njemačka) i progesteron (Progesterone rat/mouse ELISA Kit (DEV9988), Demeditec Diagnostics GmbH, Kiel, Njemačka). Koncentracije testosterona i progesterona u serumu su izražene u ng/mL. Donja granica osjetljivosti/detekcije za testosteron iznosi 0,066 ng/ml, a za progesteron 0.156 ng/ml.



Slika 12. Prikaz pripreme uzoraka za određivanje razine hormona imunokemijskom metodom
ELISA

(vlastita fotografija)

3.3. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička obrada podataka provedena je korištenjem licenciranog statističkog programskog paketa Statistica verzija 14.0.0.15 (TIBCO Software Inc.). Testirana je normalnost raspodjele podataka Shapiro-Wilkovim testom 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.

Vrijednosti anogenitalnog razmaka te parametara endokrine disrupcije reprodukcije između različitih pokusnih skupina uspoređene su pomoću neparametrijskog Kruskal-Wallisovog testa.

Vrijednosti masa mladunaca i testisa u pubertetu te koncentracija testosterona u fetusima muških mladunaca F1 generacije i koncentracija testosterona i progesterona u muških mladunaca F1 generacije u pubertetu statistički su obrađene parametrijskim testovima analizom varijance ANOVA i post hoc Fischer LSD testom.

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

4 REZULTATI I RASPRAVA

S ciljem utvrđivanja učinaka prenatalne izloženosti potencijalnom hormonskom otrovu α -CYP na razvoj muških mladunaca F1 generacije promatrani su anogenitalni razmak, postojanje areola/bradavica te vanjski znakovi spolnog sazrijevanja. Izmjerene su razine testosterona u serumu muških fetusa i razine testosterona i progesterona u serumu muških mladunaca u pubertetu F1 generacije. Također su izvagani testisi muških mladunaca F1 generacije u pubertetu.

S ciljem utvrđivanja učinaka prenatalne izloženosti potencijalnom hormonskom otrovu α -CYP na reprodukciju muških mladunaca F1 generacije praćeni su parametri endokrine disrupcije reprodukcije mladunaca F1 generacije u pubertetu prema odgovarajućim OECD protokolima.

Rezultati su raspodijeljeni u dva poglavlja te su prikazani u obliku 5 tablica. Prvi dio rezultata koji se odnosi na učinke prenatalne izloženosti α -CYP na razvoj muških mladunaca F1 generacije prikazan je u tablicama 2 - 5. Drugi dio rezultata koji se odnosi na učinke prenatalne izloženosti α -CYP na reprodukciju muških mladunaca F1 generacije prikazan je u obliku tablice 6.

4.1. UČINCI α -CYP NA RAZVOJ MUŠKIH MLADUNACA F1 GENERACIJE

4.1.1. Anogenitalni razmak

U tablici 2 prikazani su anogenitalni razmaci izmjereni kod muških mladunaca F1 generacije.

Tablica 2. Anogenitalni razmaci kod muških mladunaca F1 generacije prenatalno izloženih vodi (negativna kontrola – NK), α -cipermetrinu u dozi od 1 (α cyp1), 10 (α cyp10) i 19 mg/kg tj. m./dan (α cyp19), dietilstilbestrolu u dozi od 10 μ g/kg tj. m./dan (pozitivna kontrola – PK) i kukuruznom ulju (kontrola otapala – KO), od 6. DG do okoćenja, 1 mL/dan, *per os*.

POKUSNE SKUPINE	ANOGENITALNI RAZMAK (mm)
NK	6,70 (6,60-7,50)
α cyp1	6,90 (5,70-8,00)
α cyp10	6,40 (5,30-7,30)
α cyp19	7,10* (5,50-9,00)
PK	6,55 (5,80-7,50)
KO	7,30* (6,40-8,40)

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

* statistički značajna razlika u odnosu na α cyp10

Razina značajnosti $p < 0.05$

Nakon provedene statističke analize utvrđene su statističke značajne razlike (*) u vrijednostima anogenitalnog razmaka kod skupine tretirane α -CYP u dozi od 10 mg/kg tj. m./dan u odnosu na skupinu tretiranu α -CYP u dozi od 19 mg/kg tj. m./dan i kontrolu otapala. Vrijednosti anogenitalnog razmaka statistički su značajno niže kod skupine tretirane α -CYP u dozi od 10 mg/kg tj. m./dan u odnosu na skupinu tretiranu α -CYP u dozi od 19 mg/kg tj. m./dan i kontrolu otapala. Statistički značajne razlike u vrijednostima anogenitalnog razmaka nisu utvrđene kod preostalih pokusnih skupina.

Dobiveni rezultati su uspoređeni s rezultatima drugih istraživanja koja se bave sličnom tematikom, tj. ispitivanjem učinaka potencijalnih hormonskih otrova na endokrinu disrupciju razvoja.

U istraživanju u kojem je proučavan učinak α -CYP na steroidogenezu u testisima je 19. dana graviditeta izmjeren razmak kod muških fetusa koji su prenatalno bili izloženi α -CYP u dozama od 0.1, 1, 5, i 10 mg/kg tj. m./dan. Rezultati su pokazali kako ne postoje statistički značajne razlike u vrijednostima anogenitalnog razmaka između skupina izloženih α -CYP i kontrolne skupine životinja (Saillenfait i sur., 2017).

S druge strane, u istraživanju utjecaja CYP na promjenu anogenitalnog razmaka kod mužjaka pokusnih štakora u dobi od 3 tjedna izloženih CYP u dozi od 80 mg/kg tj. m./dan tijekom 30 dana pronađene su statistički značajno snižene vrijednosti anogenitalnog razmaka kod skupine izložene CYP u usporedbi s kontrolnom skupinom ($p < 0.05$ ili 0.01) (Chaobin i Xiangdong, 2012).

Brazil je jedan od najvećih potrošača pesticida u svijetu te je u skladu s time zabilježena visoka učestalost reproduktivnih poremećaja kod poljoprivrednih radnika. Provedeno je istraživanje koje je uključivalo 99 ispitanika iz ruralnih područja i 36 ispitanika iz urbanih dijelova. Utvrđene su statistički značajne razlike između vrijednosti anogenitalnog razmaka kod ispitanika iz ruralnih u odnosu na ispitanike iz urbanih područja. Vrijednosti anogenitalnog razmaka kod ispitanika iz ruralnih područja, čije su majke za vrijeme trudnoće bile izložene većoj količini pesticida, su bile znatno veće od vrijednosti anogenitalnog razmaka kod ispitanika iz urbanih područja (Cremonese i sur., 2017).

Nadalje, kod muških potomaka štakora koji su prenatalno bili izloženi herbicidu linuronu u dozi od 50 mg/kg tj. m./dan, anogenitalni razmak je bio za 8 % manji od anogenitalnog razmaka izmjerenog kod kontrolne skupine (McIntyre i sur., 2002).

Slično odstupanje vrijednosti anogenitalnog razmaka od prosjeka uočeno je pri analizi učinka farmaceutskog pripravka flutamida. Kod muških potomaka štakora, koji su prenatalno bili izloženi flutamidu u dozi od 100 mg/kg tj. m./dan, anogenitalni razmak je bio za 10 % manji od anogenitalnog razmaka izmjerenog kod kontrolne skupine (McIntyre i sur., 2001).

4.1.2. Postojanje bradavica

Bradavice su uobičajeno prisutne samo kod ženskih mladunaca, no uslijed djelovanja hormonskih otrova koji mogu utjecati na spolni razvoj moguća je pojava bradavica i kod muških potomaka (McIntyre i sur., 2002).

U provedenom istraživanju nije pokazan učinak na postojanje bradavica kod muških mladunaca prenatalno izloženih α -CYP u niti jednoj pokusnoj skupini. Kod jednog muškog mladunaca čija je majka bila izložena hormonskom otrovu dietilstilbestrolu uočeno je osam bradavica. Učinak dietilstilbestrola u skladu je s očekivanjima, s obzirom da je u mnogim istraživanjima već potvrđeno njegovo djelovanje na endokrinu disrupciju razvoja pokusnih životinja.

Osim što je navedeno istraživanje jedinstveno, nisu provedena ni istraživanja u kojem je praćen utjecaj drugih piretroida na postojanje bradavica u muških mladunaca. Shodno tome, proučavani su rezultati istraživanja u kojima je istražen utjecaj drugih vrsta insekticida na razvoj bradavica.

Osim što linuron utječe na anogenitalni razmak, istraživanja su potvrdila njegov utjecaj na pojavu bradavica kod muških mladunaca pokusnih štakora. Naime, kod muških mladunaca koji su prenatalno bili izloženi linuronu u dozi od 50 mg/kg tj. m./dan, zabilježena je pojava tri bradavice (McIntyre i sur., 2002).

Prenatalna izloženost insekticidu piriflukuinazonu u dozi od 100 mg/kg tj. m./dan rezultirala je pojavom 10 bradavica kod muških potomaka, a kod nekih jedinki anogenitalni razmak bio je snižen za 33 % (Schwartz i sur., 2021).

U većini provedenih istraživanja utvrđena je pozitivna korelacija između utjecaja hormonskih otrova na anogenitalni razmak i pojavu bradavica kod muških jedinki. Također, uočeno je da hormonski otrovi koji ciljano inhibiraju 5α -reduktazu i vezanje dihidrotestosteron za androgene receptore uzrokuju razvoj većeg broja bradavica kod muških jedinki. Hormonski otrovi koji inhibiraju sintezu T, pokazali su manji učinak na pojavu bradavica kod muških jedinki (Schwartz i sur., 2021).

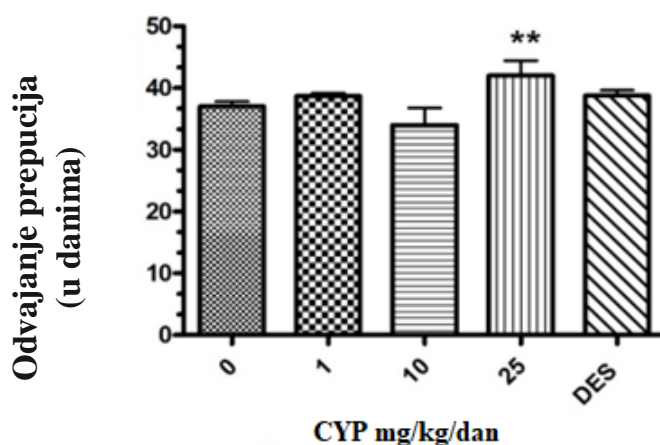
Pri utvrđivanju postojanja bradavica, izuzetno je bitno vrijeme u kojem se obavlja procjena. Ukoliko se postojanje bradavica određuje prerano (4. postnatalni dan) može doći do pogrešnih rezultata s obzirom da bradavice nisu dovoljno razvijene da bi se mogle identificirati. Procjenu je

najprikladnije provesti između 12. i 14. postnatalnog dana. U slučaju da se procjena obavlja u kasnijem razdoblju, prethodno je potrebno obrijati pokusne životinje kako dlaka ne bi utjecala na preciznost identifikacije (Schwartz i sur., 2021).

4.1.3. Praćenje ulaska u pubertet

U provedenom istraživanju prenatalna izloženost α -CYP nije utjecala na ulazak muških mladunaca u pubertet. Vanjski znakovi spolnog sazrijevanja (odvajanje prepucija) nisu se bitno razlikovali među pokusnim skupinama.

U istraživanju u kojem je proučavan učinak perinatalne izloženosti CYP na vanjske znakove spolnog sazrijevanja uočeno je kasnije odvajanje prepucija u muških mladunaca F1 generacije (Singh i sur., 2017). Kod kontrolne skupine odvajanje prepucija je nastupilo između 35. i 37. dana nakon okoćenja, dok je kod skupine perinatalno izložene CYP u dozi od 25 mg/kg tj. m./dan ono nastupilo između 39. i 45. dana nakon okoćenja (slika 13).



Slika 13. Utjecaj CYP na vanjske znakove spolnog sazrijevanja (odvajanje prepucija) kod muških mladunaca F1 generacije perinatalno izloženih CYP u dozi od 1,10 i 25 mg/kg tj. m./dan.

Rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine uz pripadajuće standardne devijacije, (n=20), $p \leq 0.001$ (prema Singh i sur., 2017).

4.1.4. Tjelesne mase i mase testisa

U tablici 3 prikazane su tjelesne mase i mase testisa muških mladunaca F1 generacije u pubertetu.

Tablica 3. Tjelesne mase i mase lijevog i desnog testisa muških mladunaca F1 generacije u pubertetu prenatalno izloženih vodi (negativna kontrola – NK), α -cipermetrinu u dozi od 1 (α cyp1), 10 (α cyp10) i 19 mg/kg tj. m./dan (α cyp19), dietilstilbestrolu u koncentraciji od 10 μ g/kg tj. m./dan (pozitivna kontrola – PK) i kukuruznom ulju (kontrola otapala – KO), od 6. DG do okoćenja, 1 mL/dan, *per os*.

POKUSNE SKUPINE	MASE LIJEVOG TESTISA (g)	MASE DESNOG TESTISA (g)	TJELESNE MASE (g)
NK	1,82 \pm 0,120	1,80 \pm 0,112	372 \pm 32,5
α cyp1	1,80 \pm 0,123	1,75 \pm 0,106	328 \pm 16,6
α cyp10	1,65 \pm 0,168	1,65 \pm 0,162	318 \pm 30,0
α cyp19	1,77 \pm 0,061	1,77 \pm 0,048	372 \pm 25,7
PK	1,71 \pm 0,090	1,68 \pm 0,106	336 \pm 28,6
KO	1,85 \pm 0,057	1,80 \pm 0,133	326 \pm 13,1

Rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine uz pripadajuće standardne devijacije.

Nakon statističke obrade podataka utvrđeno je kako ne postoje statistički značajne razlike u masama muških mladunaca F1 generacije u pubertetu te masama pripadajućih spolnih žlijezdi između pokusnih skupina. Najniže tjelesne mase životinja i najniže mase testisa zabilježene su kod muških mladunaca prenatalno izloženih α -CYP u dozi od 10 mg/kg tj. m./dan. Dakle, skupina kod koje je izmjeren najniži AGD, što je vidljivo iz tablice 2, je ujedno i skupina s najnižom tjelesnom masom i najnižom masom testisa. Navedena pozitivna korelacija između spomenutih parametara je u skladu s rezultatima drugih istraživanjima.

U već spomenutom istraživanju u kojem je utvrđen učinak perinatalne izloženosti CYP u dozi od 25 mg/kg tj. m./dan na odvajanje prepucija, također je zabilježen učinak na smanjenje tjelesne

mase muških mladunaca F1 generacije i pripadajućih testisa u različitim razvojnim fazama (postnatalni dani 22, 45 i 75) (Singh i sur., 2017).

Brojna druga istraživanja potvrdila su djelovanje CYP kao hormonskog otrova. Primjerice, perinatalna izloženost CYP u dozama od 0.12, 1.2 i 12 mg/kg tj. m./dan statistički je značajno utjecala na smanjenje tjelesne mase i mase testisa muških mladunaca F1 generacije (Xiangdong i Chaobin, 2014).

Osim istraživanja koja prate učinak prenatalne i perinatalne izloženosti potencijalnom hormonskom otrovu, provedena su istraživanja u kojem su pokusne životinje izložene piretroidima tek nakon ulaska u pubertet te se promatra njihov utjecaj kroz dulji vremenski period. Na taj način procjenjuju se učinci kronične izloženosti hormonskim otrovima, a dobiveni rezultati nastoje se upotrijebiti u praktičnom primjeru. Primjerice, uvode se povećane mjere zaštite poljoprivrednih radnika koji su svakodnevno u kontaktu s velikom koncentracijom različitih vrsta pesticida.

U jednom takvom istraživanju, spolno zreli štakori izlagani su različitim dozama permetrina (0.013, 0.13, i 1.3 mg/kg tj. m./dan) u razdoblju od 30, 45 ili 60 dana. Utvrđeno je statistički značajno smanjenje tjelesne mase te mase testisa u pokusnim skupinama izloženim permetrinu (0.013 i 1.3 mg/kg tj. m./dan) u razdoblju od 30 i 60 dana ($p \leq 0.05$) u odnosu na kontrolnu skupinu. Izloženost permetrinu (0.13 mg/kg tj. m./dan) u razdoblju od 45 dana nije pokazala statistički značajan učinak na masu životinja i pripadajućih testisa (Issam i sur., 2011).

Tretman piretroidom fenvaleratom, u dozi od 20 i 40 mg/kg tj. m./dan kroz razdoblje od 30 dana, na muškim štakorima u dobi od 90 dana rezultirao je statistički značajnim smanjenjem tjelesne mase i mase testisa u odnosu na kontrolnu skupinu što potvrđuje njegovo djelovanje kao hormonskog otrova na razvoj (Arena i sur., 2008).

4.1.5. Razine steroidnih hormona u serumu

U tablici 4 prikazane su razine testosterona izmjerene u krvnom serumu muških fetusa F1 generacije, dok su u tablici 5 prikazane razine testosterona i progesterona izmjerene u krvnom serumu muških mladunaca F1 generacije u pubertetu.

Tablica 4. Razine testosterona izmjerene u krvnom serumu muških fetusa F1 generacije prenatalno izloženih vodi (negativna kontrola – NK), α -cipermetrinu u dozi od 1 (α cyp1), 10 (α cyp10) i 19 mg/kg tj. m./dan (α cyp19), dietilstilbestrolu u dozi od 10 μ g/kg tj. m./dan (pozitivna kontrola – PK) i kukuruznom ulju (kontrola otapala – KO), od 6. DG do 21. DG., 1 mL/dan, *per os*.

POKUSNE SKUPINE	RAZINE TESTOSTERONA (ng/ml)
NK	0,835 \pm 0,287
α cyp1	1,13 \pm 0,363*
α cyp10	1,53 \pm 0,241*,**
α cyp19	0,792 \pm 0,106**,***
PK	1,36 \pm 0,257*, ****

Rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine uz pripadajuće standardne devijacije.

* statistički značajna razlika u odnosu na NK

** statistički značajna razlika u odnosu na α CYP1

*** statistički značajna razlika u odnosu na α CYP10

**** statistički značajna razlika u odnosu na α CYP19

Razina značajnosti $p < 0.05$

Nakon provedene statističke analize utvrđene su statističke značajne razlike u razinama testosterona između pojedinih pokusnih skupina.

Statistički značajne razlike (*) u srednjim vrijednostima za razinu testosterona u serumu muških fetusa pronađene su kod skupine negativne kontrole u odnosu na skupinu tretiranu α -CYP u dozi od 1 mg/kg tj. m./dan, skupinu tretiranu α -CYP u dozi od 10 mg/kg tj. m./dan i skupinu pozitivne kontrole. Razina testosterona kod skupine negativne kontrole statistički je značajno niža u odnosu

na skupinu tretiranu α -CYP u dozi od 1 mg/kg tj. m./dan, skupinu tretiranu α -CYP u dozi od 10 mg/kg tj. m./dan i skupinu pozitivne kontrole.

Statistički značajne razlike (**) u srednjim vrijednostima za razinu testosterona u serumu muških fetusa pronađene su kod skupine tretirane α -CYP u dozi od 1 mg/kg tj. m./dan u odnosu na skupinu tretiranu α -CYP u dozi od 10 mg/kg tj. m./dan i skupinu tretiranu α -CYP u dozi od 19 mg/kg tj. m./dan. Razina testosterona kod skupine tretirane α -CYP u dozi od 1 mg/kg tj. m./dan statistički je značajno niža u odnosu na skupinu tretiranu α -CYP u dozi od 10 mg/kg tj. m./dan. S druge strane, razina testosterona kod skupine tretirane α -CYP u dozi od 1 mg/kg tj. m./dan statistički je značajno viša u odnosu na skupinu tretiranu α -CYP u dozi od 19 mg/kg tj. m./dan.

Statistički značajne razlike (***) u srednjim vrijednostima za razinu testosterona u serumu muških fetusa pronađene su kod skupine tretirane α -CYP u dozi od 10 mg/kg tj. m./dan u odnosu na skupinu tretiranu α -CYP u dozi od 19 mg/kg tj. m./dan. Razina testosterona kod skupine tretirane α -CYP u dozi od 10 mg/kg tj. m./dan statistički je značajno viša u odnosu na skupinu tretiranu α -CYP u dozi od 19 mg/kg tj. m./dan.

Statistički značajne razlike (****) u srednjim vrijednostima za razinu testosterona u serumu muških fetusa pronađene su kod skupine tretirane α -CYP u dozi od 19 mg/kg tj. m./dan u odnosu na skupinu pozitivne kontrole. Razina testosterona kod skupine skupine pozitivne kontrole statistički je značajno viša u odnosu na skupinu tretiranu α -CYP u dozi od 19 mg/kg tj. m./dan.

Brojna istraživanja uočila su poveznicu između hormonskih otrova i snižene ekspresije gena koji kodiraju za enzime uključene u procese steroidogeneze. Snižena ekspresija gena i inhibicija enzima uključenih u procese steroidogeneze uslijed djelovanja hormonskih otrova uzrokuje sniženu koncentraciju testosterona. Osim direktnog djelovanja hormonskih otrova na proizvodnju testosterona, zamijećeno je i indirektno djelovanje putem osi hipotalamus-hipofiza.

U prethodno spomenutom istraživanju u kojem je proučavano djelovanje α -CYP na steroidogenezu u testisima, razina testosterona kod pokusnih skupina prenatalno izloženih α -CYP u dozi od 5 i 10 mg/kg tj. m./dan bila je statistički značajno niža od razine testosterona izmjenog kod kontrolne skupine ($p < 0.05$) (Sailienfait i sur., 2017). U navedenom istraživanju izmjerena je razina testosterona u testisima fetusa (*ex vivo*), dok je u istraživanju u sklopu kojeg je izrađen ovaj diplomski rad razina testosterona izmjerena u krvnom serumu fetusa. Dakle, trenutačno nije

provedeno niti jedno istraživanje s identičnom tematikom, stoga je provedena usporedba s radovima koji se bave sličnom tematikom.

Tablica 5. Razine testosterona i progesterona izmjerene u krvnom serumu muških mladunaca F1 generacije u pubertetu prenatalno izloženih vodi (negativna kontrola – NK), α -cipermetrinu u dozi od 1 (α cyp1), 10 (α cyp10) i 19 mg/kg tj. m./dan (α cyp19), dietilstilbestrolu u dozi od 10 μ g/kg tj. m./dan (pozitivna kontrola – PK) i kukuruznom ulju (kontrola otapala – KO), od 6. DG do okoćenja, 1 mL/dan, *per os*.

POKUSNE SKUPINE	RAZINE TESTOSTERONA (ng/ml)	RAZINE PROGESTERONA (ng/ml)
NK	6,21 \pm 4,06	2,87 \pm 1,76*
α cyp1	6,59 \pm 7,29	5,27 \pm 2,28
α cyp10	4,63 \pm 2,30	3,28 \pm 1,57*
α cyp19	4,92 \pm 2,50	3,39 \pm 2,36*
PK	3,91 \pm 3,49	3,96 \pm 1,80

Rezultati su prikazani kao aritmetičke sredine uz pripadajuće standardne devijacije.

* statistički značajna razlika u odnosu na α CYP1

Razina značajnosti $p < 0.05$

Utvrđene su statistički značajne razlike (*) u srednjim vrijednostim za razinu progesterona u serumu muških mladunaca u pubertetu kod skupine tretirane α -CYP u dozi od 1 mg/kg tj. m./dan, u odnosu na skupinu negativne kontrole, skupinu tretiranu α -CYP u dozi od 10 mg/kg tj. m./dan i skupinu tretiranu α -CYP u dozi od 19 mg/kg tj. m./dan. Razina progesterona je statistički značajno viša kod skupine tretirane α -CYP u dozi od 1 mg/kg tj. m./dan, u odnosu na skupinu negativne kontrole, skupinu tretiranu α -CYP u dozi od 10 mg/kg tj. m./dan i skupinu tretiranu α -CYP u dozi od 19 mg/kg tj. m./dan.

Nisu utvrđene statistički značajne razlike u razini testosterona u serumu muških mladunaca u pubertetu između pokusnih skupina. Uočene su snižene koncentracije testosterona u serumu

mladunaca u pubertetu prenatalno izloženih α -CYP u dozi od 10 mg/kg tj. m./dan i α -CYP u dozi od 19 mg/kg tj. m./dan u odnosu na negativnu kontrolu, ali razlike nisu bile statistički značajne.

Dakle, izloženost α -CYP utjecala je značajno na razinu testosterona kod fetusa, dok nije pokazala statistički značajan učinak na razinu testosterona kod muških mladunaca u pubertetu. Navedeni rezultati mogu se objasniti činjenicom da je izloženost α -CYP provedena samo prenatalno pa je prilikom odrastanja mladunaca učinak α -CYP bio slabiji.

Izloženost mužjaka pokusnih štakora (8 tjedana starosti) permetrinu u dozi od 70 mg/kg tj. m./dan u razdoblju od 6 tjedana rezultirala je statistički značajno nižom razinom testosterona (izmjerena u krvnom serumu žrtvovanih štakora) u odnosu na kontrolnu skupinu (Zhang i sur., 2007).

Još jedno istraživanje koje je proučavalo toksičnost permetrina potvrdilo je njegov učinak na steroidogenezu u testisima. Razina testosterona, izmjerena u krvnom serumu spolno zrelih štakora koji su u razdoblju od 60 dana bili izloženi permetrinu u dozi od 1.3 mg/kg tj. m./dan, bila je statistički značajno niža od razine testosterona u kontrolnoj skupini (Issam i sur., 2011).

Izloženost mužjaka pokusnih štakora (u dobi od 2,5 do 3 mjeseca) CYP u dozi od 0.26 mg/kg tj. m./dan u razdoblju od 15 dana nije uzrokovala statistički značajnu promjenu u razini testosterona u odnosu na kontrolnu skupinu, $p > 0.05$ (*ex vivo*; razina testosterona izmjerena je u testisima spolno zrelih štakora) (Triutomo, 2020).

S druge strane, u istraživanju u kojem su testirani učinci viših doza CYP zabilježena je značajna promjena u razini testosterona. Naime, utvrđene su statistički značajno snižene razine testosterona kod miševa perinatalno izloženih CYP u dozi od 1.2 i 12 mg/kg tj. m./dan u odnosu na kontrolnu skupinu. Mjerenje hormona provedeno je na PD 21,5 (dan odbacivanja od majki), PD 45,5 (juvenilno razdoblje) i PD 90,5 (spolno zreli miševi) te su u svim periodima razine testosterona bile značajno snižene u odnosu na kontrolnu skupinu (Xiangdong i Chaobin, 2014).

Obzirom da nema provedenih istraživanja koje se bave proučavanjem utjecaja izloženosti α -CYP na razinu progesterona kod muških mladunaca pokusnih štakora u pubertetu, provedena je usporedba s rezultatima drugih istraživanja koja se bave donekle sličnom tematikom.

Nisu utvrđene statistički značajne razlike u razinama progesterona izmjerenih u krvnom serumu spolno zrelih ženskih mladunaca perinatalno izloženih β -CYP (u dozi od 15 mg/kg tj .m./dan i 30 mg/kg tj. m./dan) u razdoblju od prvog dana graviditeta do PD 21 (Obinna i Agu, 2019).

Provedeno je istraživanje u kojem je promatran utjecaj fenvalerata na proizvodnju progesterona u staničnoj kulturi (engl. *Rat granulosa cells*, rGCs). Izloženost rGCs fenvaleratu u koncentraciji od 125 μ M rezultirala je statistički značajnom nižom razinom progesterona u usporedbi s kontrolom (Chen i sur., 2005).

4.2. UČINCI α -CYP NA REPRODUKCIJU MUŠKIH MLADUNACA F1 GENERACIJE

4.2.1. Parametri endokrine disrupcije reprodukcije

U tablici 6 prikazani su parametri endokrine disrupcije reprodukcije mladunaca F1 generacije u pubertetu.

Tablica 6. Parametri endokrine disrupcije reprodukcije mladunaca F1 generacije u pubertetu prenatalno izloženih vodi (negativna kontrola – NK), α -cipermetrinu u dozi od 1 (α cyp1), 10 (α cyp10) i 19 mg/kg tj. m./dan (α cyp19), dietilstilbestrolu u koncentraciji od 10 μ g/kg tj. m./dan (pozitivna kontrola – PK) i kukuruznom ulju (kontrola otapala – KO), od 6. DG do okoćenja, 1 mL/dan, *per os*.

	NK	α cyp1	α cyp10	α cyp19	PK	KO
Uspješnost parenja	0,5* (0-1)	1* (0-1)	1* (0-1)	1* (0-1)	1* (0-1)	1* (1-1)
Duljina gestacije (dana)	22 (22-22)	22 (22-22)	22 (22-22)	23 (21-24)	22 (22-23)	22 (22-22)
Ukupan broj okoćenih mladunaca	11 (11-11)	7 (3-9)	9 (6-11)	8 (3-13)	4 (3-9)	7 (5-9)
Broj živih mladunaca	11 (11-11)	7 (3-9)	9 (6-11)	8 (3-13)	4 (3-9)	7 (5-9)
Broj mrtvih mladunaca	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)
Stopa preživljenja (%)	100 (100-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	100 (100-100)	100 (100-100)
Broj M mladunaca	4 (4-4)	3 (1-6)	4 (4-8)	4 (0-7)	3 (1-4)	2 (2-2)
Broj F mladunaca	7 (7-7)	4 (1-6)	3 (2-5)	4 (2-9)	2 (1-5)	5 (3-7)
Postotak muških mladunaca (%)	36 (36-36)	43 (33-86)	67 (44-73)	50 (0-67)	44 (33-75)	31 (22-40)
Postotak ženskih mladunaca (%)	64 (64-64)	57 (14-67)	33 (27-56)	48 (33-100)	56 (25-67)	69 (60-78)
Masa legla (g)	69,3 (69,3-69,3)	46,9 (0,00-60,5)	39,0 (0,00-56,1)	57,0 (21,7-89,0)	33,0 (20,9-54,8)	41,5 (30,5-52,5)
Masa muških mladunaca (g)	26,1 (26,1-26,1)	20,2 (0,00-33,9)	25,1 (0,00-26,7)	27,4 (0,00-48,3)	24,5 (7,20-24,8)	12,8 (12,7-12,9)
Masa ženskih mladunaca (g)	43,2 (43,2-43,2)	25,1 (0,00-36,2)	12,3 (0,00-30,7)	26,4 (12,2-58,4)	13,7 (8,50-30,0)	28,7 (17,6-39,8)

* Uspješnost parenja je označena s 0 i 1 (0- neuspješno, 1- uspješno).

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

Nakon statističke obrade podataka utvrđeno je kako ne postoje statistički značajne razlike u parametrima endokrine disrupcije reprodukcije između različitih pokusnih skupina.

Dobiveni rezultati prikazani u tablici 6 podudaraju se s rezultatima drugih autora koji su u svojim istraživanjima dokazali da prenatalna izloženost α -CYP od 13. do 19. dana graviditeta (kritičan period za razvoj i diferencijaciju reproduktivnog sistema) u dozi od 10 mg/kg tj. m./dan nema učinak na parametre endokrine disrupcije reprodukcije muških mladunaca F1 generacije (Saillenfait i sur., 2017).

U prethodno spomenutom istraživanju u kojem je analiziran utjecaj fenvalerata na tjelesnu masu mužjaka i masu testisa, također je praćen učinak na parametre endokrine disrupcije reprodukcije. Primjerice, masa legla (izražena u obliku medijana) kod kontrolne skupine iznosila je 370,35 g dok je masa legla kod pokusne skupine u kojoj su mužjaci bili izloženi fenvaleratu u dozi od 40 mg/kg tj. m./dan iznosila 341,43 g (Arena i sur., 2008).

Iz tablice 6 možemo uočiti kako je masa legla pokusne skupine α -CYP10 niža od mase legla skupine negativne kontrole. Unatoč tome, nakon provedene statističke analize zaključeno je kako navedena razlika u masi nije od statističke značajne važnosti.

Stopa preživljenja okoćenih mladunaca F1 generacije prenatalno izloženih CYP u dozi od 1.2 mg/kg tj. m./dan statistički je bila značajno snižena u odnosu na stopu preživljenja okoćenih mladunaca kontrolne skupine ($p < 0.001$) (Guo i sur., 2018). Iz tablice 6 je vidljivo kako α -CYP u provedenom istraživanju nije imao utjecaj na stopu preživljenja.

5 ZAKLJUČAK

U ovom radu su istraženi učinci prenatalne izloženosti piretroidu α -CYP na endokrinu disrupciju reprodukcije i razvoja muških potomaka pokusnih štakora. Na temelju rezultata provedenog istraživanja možemo zaključiti sljedeće:

- Vrijednosti anogenitalnog razmaka bile su statistički značajno niže kod muških mladunaca F1 generacije prenatalno izloženih α -CYP u dozi od 10 mg/kg tj. m./dan u usporedbi s mladuncima prenatalno izloženima α -CYP u dozi od 19 mg/kg tj. m./dan i kontroli otapala.
- Prenatalna izloženost α -CYP nije imala učinka na postojanje bradavica kod muških mladunaca F1 generacije.
- Prenatalna izloženost α -CYP nije imala učinka na vanjske znakove spolnog sazrijevanja (odvajanje prepucija) kod muških mladunaca F1 generacije.
- Nije pokazan statistički značajan učinak α -CYP na tjelesnu masu i masu testisa prenatalno izloženih muških mladunaca F1 generacije u pubertetu.
- Parametri endokrine disrupcije reprodukcije spolno zrelih muških mladunaca F1 generacije prenatalno izloženih α -CYP nisu se statistički značajno razlikovali između pokusnih skupina.
- Prenatalna izloženost α -CYP je imala statistički značajan učinak na razinu testosterona u serumu muških fetusa F1 generacije i razinu progesterona u serumu muških mladunaca F1 generacije u pubertetu.

Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je da prenatalna izloženost α -CYP neznatno utječe na razvoj i reprodukciju muških potomaka pokusnih štakora, prvenstveno remećenjem razina steroidnih hormona u serumu. Provedeno istraživanje samo je dio kompleksne analize kojom se procjenjuje pripadnost pojedinog pesticida hormonskim otrovima. Potrebno je provesti daljnja istraživanja koja će dati dodatan uvid u djelovanje α -CYP kao hormonskog otrova. S ciljem dobivanja preciznijih i vjerodostojnijih rezultata, istraživanja je potrebno provesti na većem broju uzoraka.

6 LITERATURA

- Ajayi AF, Akhigbe RE (2020) Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertil Res and Pract* **6**, 5. <https://doi.org/10.1186/s40738-020-00074-3>
- Alaa-Eldin EA, El-Shafei D (2017) Individual and combined effect of chlorpyrifos and cypermethrin on reproductive system of adult male albino rats. *Environ Sci Pollut Res* **24**, 1532–1543. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7912-6>
- Alberts B, Roberts K, Raff M, Lewis J, Hopkin K, Bray D, i sur. (2010) *Essential Cell Biology*, 3. izd., Taylor & Francis Group, United States of America, str. 702–705.
- Aman S, Shipra R, Baljeet Y, Bhuvnesh Y (2018) Cypermethrin Toxicity: A Review. *J Forensic Sci & Criminal Inves* **9**, 1–3. <https://doi.org/10.19080/JFSCI.2018.09.555767>
- Arena AC, Fernandez C, Porto EM, Bissacot DZ, Pereira O, Kempinas WG (2008) Fenvalerate, A Pyrethroid Insecticide, Adversely Affects Sperm Production and Storage in Male Rats. *J Toxicol Environ Health Part A* **71**, 1550–1558. <http://doi.org/10.1080/15287390802392024>
- Breckenridge CB, Holden L, Sturgess N, Weiner M, Sheets L, Sargent D, i sur. (2009) Evidence for a separate mechanism of toxicity for the Type I and the Type II pyrethroid insecticides. *Neurotoxicology* **30**, 17–31. <http://doi.org/10.1016/j.neuro.2009.09.002>
- Casida JE (2008) Pest Toxicology: The Primary Mechanisms of Pesticide Action. *Chem Res Toxicol* **22**, 609–619. <https://doi.org/10.1021/tx8004949>
- Chaobin H, Xiangdong L (2014) Maternal Cypermethrin Exposure during the Perinatal Period Impairs Testicular Development in C57BL Male Offspring. *PLoS ONE* **9**, 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096781>
- Chen J, Chen H, Liu R, He J, Song L, Bian Q (2005) Effects of fenvalerate on progesterone production in cultured rat granulosa cells. *Reprod Toxicol* **20**, 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2005.01.013>.
- Chrustek A, Olszewska-Słonina D, Hołyńska-Iwan I, Dziembowska I, Bogusiewicz J, Wróblewski M, i sur. (2018) Current Research on the Safety of Pyrethroids Used as Insecticides. *Medicina* **54**, 1–15. <https://doi.org/10.3390/medicina54040061>
- Combarrous Y (2017) Endocrine Disruptor Compounds (EDCs) and agriculture: The case of pesticides. *C R Biol* **340**, 406–409. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2017.07.009>
- Cremonese C, Piccolia C, Pasqualottoc F, Clapauchd R, Koifmana RJ, Koifman S, i sur. (2017) Occupational exposure to pesticides, reproductive hormone levels and sperm quality in young Brazilian men. *Reprod Toxicol* **67**, 174–185. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.01.001>
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice L, Hauser R, Prins GS, Soto AM, i sur. (2009) Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev* **30**, 293–342. <http://doi.org/10.1210/er.2009-0002>

- Du B, Haddad SP, Luek A, Scott WC, Saari GN, Kristofco LA, i sur. (2014) Bioaccumulation and trophic dilution of human pharmaceuticals across trophic positions of an effluent-dependent wadeable stream. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **369**, 1656. <http://doi.org/10.1098/rstb.2014.0058>
- Fischer MB, Ljubicic ML, Hagen CP, Thankamony A, Ong K, Hughes I, i sur. (2020) Anogenital Distance in Healthy Infants: Method-, Age- and Sex-related Reference Ranges. *J Clin Endocrinol Metab* **105**, 2996–3004. <http://doi.org/10.1210/clinem/dgaa393>
- Garcia J, Alarcon R, Ventura MI, Requena M, Hernandez AF, Parron T (2017) Association of reproductive disorders and male congenital anomalies with environmental exposure to endocrine active pesticide. *Reprod Toxicol* **71**, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.04.011>
- Guo J, Xu J, Zhang J, An L (2018) Alteration of mice cerebral cortex development after prenatal exposure to cypermethrin and deltamethrin. *Toxicol Lett* **287**, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.01.019>
- Issam C , Zohra H, Monia Z, Hasseni BC (2011) Effects of dermal sub-chronic exposure of pubescent male rats to permethrin (PRMT) on the histological structures of genital tract, testosterone and lipoperoxidation. *Exp Toxicol Pathol* **63**, 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.02.016>
- Jana Vasković (2022) Action potential-Kenhub. <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/action-potential>. Pristupljeno 12. ožujka.
- Jin Y, Wang L, Ruan M, Liu J, Yang Y, Zhou C, i sur. (2011) Cypermethrin exposure during puberty induces oxidative stress and endocrine disruption in male mice. *Chemosphere* **84**, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.034>
- Junquera P (2021) Cypermethrin Safety-PARASITIPEDIA. <https://parasitipedia.net>. Pristupljeno 18. ožujka 2022.
- Liu J, Wang R, Huang B, Lin C, Wang Y, Pan X, i sur. (2011) Distribution and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in wild fish species from Dianchi Lake, China. *Environ Pollut* **159**, 2815–2822. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.05.013>
- Lushchak VI, Storey KB, Matviishyn TM, Husak VV, Storey JM (2018) Pesticide Toxicity: a Mechanistic Approach. *EXCLI J* **17**, 1101–1136. <https://doi.org/10.17179/excli2018-1710>
- Mangels R, Tsung K, Kwan K, Dean MD (2016) Copulatory plugs inhibit the reproductive success of rival males. *J Evol Biol* **29**, 2289–2296. <https://doi.org/10.1111/jeb.12956>
- McIntyre BS, Barlow NJ, Foster PM (2001) Androgen-Mediated Development in Male Rat Offspring Exposed to Flutamide in Utero: Permanence and Correlation of Early Postnatal Changes in Anogenital Distance and Nipple Retention with Malformations in Androgen-Dependent Tissues. *Toxicol Sci* **62**, 236–249. <https://doi.org/10.1093/toxsci/62.2.236>
- McIntyre BS, Barlow NJ, Foster PM (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. *Toxicol Sci* **65**, 62–70. <https://doi.org/10.1093/toxsci/65.1.62>

Obinna VC, Agu GO (2019) Beta cypermethrin exposure and perinatal reproductive development of female f1 generation of albino rats. *J Basic Appl Zool* **80**, 44. <https://doi.org/10.1186/s41936-019-0121-3>

OECD TG 443 Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study (EOGRTS) (2018a) <https://www.oecdilibrary.org/docserver/9789264304741en.pdf?expires=1658557031&id=id&accname=guest&checksum=4A38B3EC361CC193FCD421F998D7B074>
Pristupljeno 20. svibnja 2022.

OECD TG 221 Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test (OECD TG 421) and Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test (OECD TG 422) (2018b) <https://www.oecdilibrary.org/docserver/978926430474125en.pdf?expires=1658559032&id=id&accname=guest&checksum=09F4150F64D7F358DDDF25C979551BE>
Pristupljeno 20. svibnja 2022.

Parent AS, Franssen D, Fudvoye J, Gérard A, Bourguignon JP (2015) Developmental variations in environmental influences including endocrine disruptors on pubertal timing and neuroendocrine control: Revision of human observations and mechanistic insight from rodents. *Front Neuroendocrinol* **38**, 12–36. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.12.004>

Petrelli G, Mantovani A (2002) Environmental risk factors and male fertility and reproduction., *Contracept* **65**, 297–300. [https://doi.org/10.1016/s0010-7824\(02\)00298-6](https://doi.org/10.1016/s0010-7824(02)00298-6)

PubChem (2021) PubChem Compound Summary for CID 2912, Cypermethrin, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cypermethrin>. Pristupljeno 18. ožujka 2022.

Ramaswamy S, Weinbauer GF (2015) Endocrine control of spermatogenesis: Role of FSH and LH/ testosterone. *Spermatogenesis* **4**, 148-151. <https://doi.org/10.1080/21565562.2014.996025>

Ritter L, Greenlees K. (2022) Cypermethrin and alpha-cypermethrin-Inchem. <https://inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v53je05.htm>. Pristupljeno 15. svibnja 2022.

Romero A, Ramos E, Ares I, Castellano V, Martínez M, Martínez-Larrañagai MR, i sur. (2017) Oxidative stress and gene expression profiling of cell death pathways in alpha-cypermethrin-treated SH-SY5Y cells. *Arch Toxicol* **91**, 2151–2164. <https://doi.org/doi:10.1007/s00204-016-1864-y>

Roy AK, Lavrovsky Y, Song CS, Chen S, Jung MH, Velu NK, i sur. (1998) Regulation of Androgen Action. *Vitam Horm* **55**, 309–352. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(08\)60938-3](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(08)60938-3)

Saillenfait AM, Sabaté JP, Denis F, Antoine G, Robert A, Roudot AC, i sur. (2017) Evaluation of the effects of α -cypermethrin on fetal rat testicular steroidogenesis. *Reprod Toxicol* **72**, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.06.133>

Schwartz CL, Christiansen S, Hass U, Ramhøj L, Axelstad M, Löbl NM, i sur. (2021) On the Use and Interpretation of Areola/Nipple Retention as a Biomarker for Anti-androgenic Effects in Rat Toxicity Studies. *Front Toxicol* **3**, 730752. <https://doi.org/10.3389/ftox.2021.730752>

Schwartz CL, Christiansen S, Vinggaard AM, Axelstad M, Hass U, Svingen T, i sur. (2019) Anogenital distance as a toxicological or clinical marker for fetal androgen action and risk for reproductive disorders. *Arch Toxicol* **93**, 253–272. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2350-5>

Scott HM, Sharpe RM, Mason JL (2009) Steroidogenesis in the fetal testis and its susceptibility to disruption by exogenous compounds. *Endocr Rev* **30**, 883–925. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0016>

Shafer TJ, Meyer DA, Crofton KM (2005) Developmental Neurotoxicity of Pyrethroid Insecticides: Critical Review and Future Research Needs. *Environ Health Perspect* **113**, 123–136. <https://doi.org/10.1289/ehp.7254>

Sharma P, Singh R, Huq AU (2014) Cypermethrin-induced reproductive toxicity in the rat is prevented by resveratrol. *J Hum Reprod Sci* **7**, 99–106. <https://doi.org/10.4103/0974-1208.138867>

Sifakis S, Spandidos AD, Androutsopoulos VP, Tsatsakis AM (2017) Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. *Environ Toxicol Pharmacol* **51**, 56–70. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.02.024>

Silva JF, Aydos D, Mattos I, Luz LL, Carmo CN (2016) Exposure to pesticides and prostate cancer: systematic review of the literature. *Rev Environ Health* **31**, 11–27. <https://doi.org/10.1515/reveh-2016-0001>

Singh D, Bhagat S, Raijiwala P, Dighe V, Vanage G (2017) Perinatal exposure of pregnant rats to cypermethrin delays testicular descent, impairs fertility in F1 male progeny leading to developmental defects in F2 generation. *Chemosphere* **185**, 376–385. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.138>

Soderlund DM (2010) Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology, 3. izd., Academic Press, New York, str. 1665–1686.

Soderlund DM (2012) Molecular mechanisms of pyrethroid insecticide neurotoxicity: recent advances. *Arch Toxicol* **86**, 165–181. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0726-x>

Tang W, Wang D, Wang J, Wu Z, Li L, Huang M, i sur. (2018) Pyrethroid pesticide residues in the global environment: An overview. *Chemosphere* **191**, 990–1007. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.115>

Triutomo DH, Puspitasari I, Susidarti RA (2020) The effect of giving deltamethrin and cypermethrin insecticides on the level of intratesticular testosterone in male Wistar strain rats. *Indones J Pharm* **31**, 116. <https://doi.org/10.14499/indonesianjpharm31iss2pp116>

Wakeling EN, Neal AP, Atchison WD (2012) Pyrethroids and Their Effects on Ion Channels, R. Soundararajan (izd.), Pesticides - Advances in Chemical and Botanical Pesticides, *In Tech*, London. <https://www.intechopen.com/chapters/37969> doi: 10.5772/50330

WHO/IPCS (2002) Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. WHO/IPCS-World Health Organization/International Program on Chemical Safety. WHO/PCS/EDC/02.2, www.who.int/pcs/emerg_site/edc/global_edc_ch5.pdf. Pristupljeno 1.7.2022.

WHO (2019) Prequalification Team Vector Control Decision Document, Royal Sentry 2.0 (Long Lasting Mosquito Net Treated with Alpha-cypermethrin). WHO-World Health Organization, https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/vcp-documents/WHOPAR-VC_003-002_DD_20190206.pdf Pristupljeno 1.7.2022.

Zhang SY, Ito Y, Yamanoshita O, Yanagiba Y, Kobayashi M, Taya K, i sur. (2007) Permethrin May Disrupt Testosterone Biosynthesis via Mitochondrial Membrane Damage of Leydig Cells in Adult Male Mouse, *Endocrinology* **148**, 3941–3949. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1497>

(2022) 3 reasons why Wistar Han® could be the perfect model for your study-Envigo blog. <https://blog.envigo.com/3-reasons-why-wistar-han-could-be-the-perfect-model-for-your-study>. Pristupljeno 15. travnja 2022.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Ja Lea Biličić izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Vlastoručni potpis